



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Variabilidad genética y detección molecular  
de poblaciones del hongo *Rhizoctonia  
solani* en regiones colombianas productoras  
de papa**

**Edisson Chavarro Mesa**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Bogotá-Colombia

2011



# **Variabilidad genética y detección molecular de poblaciones del hongo *Rhizoctonia solani* en regiones colombianas productoras de papa**

**Edisson Chavarro Mesa**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister  
en Ciencias Agrarias-Profundización Fitopatología

Director:

Ph.D., Jorge Evelio Ángel Díaz

Codirectora:

Ph.D., Celsa García Domínguez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Escuela de Posgrado

Bogotá-Colombia

2011



*A mi madre Alba Leonor Mesa Espinosa.*

*A mi hija Samara Chavarro Pérez.*

*A Adriana Y. Pérez Barragán y Lili Mesa Chaparro*



## **Agradecimientos**

El autor expresa sus agradecimientos al Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario-ICA (Área de Biología Molecular), Centro de Biotecnología y Bioindustria-CORPOICA (Laboratorio de Control Biológico), Universidad Nacional de Colombia-Bogotá (Facultad de Agronomía Posgrado en Ciencias Agrarias) y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-Colombia por la financiación del presente proyecto, y demás personas y entidades que participaron en la realización de este convenio.



## Resumen

Actualmente el complejo *Rhizoctonia solani* se divide en 14 grupos de anastomosis (AG1 al AG13 y AG-BI) (Carling et al. 2002). El GA-3 es el agente causal de la rhizoctoniasis siendo el grupo de anastomosis más recurrente en tubérculos de papa. El objetivo del presente estudio fue evaluar la variabilidad genética de *Rhizoctonia solani* y detectar mediante prueba molecular poblaciones del hongo y variantes AG en regiones colombianas productoras de papa. Los aislamientos fueron identificados mediante: compatibilidad de anastomosis, iniciadores específicos y secuenciación de la región ITS-B. Los análisis de variabilidad genética se realizaron amplificando marcadores moleculares (PCR-RFLP y RAMS) y secuenciación de la región ITS-B, utilizando prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para detectar el patógeno a partir de muestras de suelo se utilizó una PCR convencional específica y PCR en tiempo real Taq-Man. Con ITS-RFLP y secuenciamiento de la región ITS-2 se logró identificar dos grupos de anastomosis (AG-3 y AG-2), presentes para las tres regiones geográficas donde se desarrolló el estudio. Mediante marcadores RAMS se observaron dos agrupamientos dentro de *R. solani* AG-3, el Grupo I comparte un índice de similitud del 82% entre sí, en comparación con el Grupo II que presenta una similitud del 80% entre sus aislamientos. Se logró establecer relaciones filogenéticas preliminares con una secuencia parcial de la región ITS-2 para los aislamientos AG-3 de *R. solani*. Estos agrupamientos no están relacionados a su procedencia geográfica, pero sí al grupo de anastomosis a que pertenecen. Mediante PCR convencional y PCR en tiempo real se detectó la presencia del patógeno a partir de muestras de suelo. Los resultados de este estudio resultan de interés práctico para el desarrollo de perfiles moleculares tipo huella genética, análisis de variabilidad genética dentro de poblaciones y determinación de grupos de anastomosis, logrando diferenciar el GA-3 separándolo de los demás grupos de anastomosis. Se evidencia que *R. solani* no es un grupo monofilético y que cada grupo de anastomosis corresponde a una especie distinta o poblaciones divergentes de una sola especie lo cual confirma que es un complejo de especies (González, 2002). Se tienen métodos basados en PCR para la detección y cuantificación del patógeno a partir de muestras vegetales y de suelo, los cuales, pueden ser implementados en programas de certificación de semilla y áreas libres del patógeno.

**Palabras clave:** Grupos de anastomosis, detección molecular, ADNr, PCR-RAMS, RFLP, ITS-2, reconstrucción filogenética.

## Abstract

At present, the complex of *Rhizoctonia solani* is divided in 14 groups of anastomosis (AG1 al AG13 y AG-BI) (Carling et al. 2002). The GA-3 is the agent the causes rhizoctoniasis being this the most frequent group of anastomosis in potatoes. The objective of this study was to evaluate the genetic variability of *Rhizoctonia solani* and to detect using fungi and AG variants in different Colombian regions of potatoes production. The isolates were identified using compatibility of anastomosis, specific initiators and secuenciation of the region of ITS-B. The genetic variability analysis was realized maximizing some molecular markers (PCR-RFLP y RAMS) and secuenciation in the ITS-B region, using the PCR prove (Polymerase Chain Reaction). To detect the pathogen using soil samples conventional specific PCR was used and real time Taq-Man PCR was also used. With ITS-RFLP and sequence of ITS-2, it was able to identify to anastomosis groups (AG-3 y AG-2), that are now a days in the three studied zones. Using RAMS to different groups were observed in *R. solani* AG-3, the Group 1 shares an 82% of similitude between themselves, compared with group 2 that has an 80% of similitude. With this information, it was established phylogenetic relationships with a partial sequence of the ITS-2 region for AG-3 de *R. solani* isolates. Using conventional PCR and real time PCR, it was able to detect the presence of the pathogen in the soil. The results of this study are useful in the development to create profiles of molecular genetic fingerprint, analysis of genetic variability within populations and determination of anastomosis groups, making the AG-3 differentiates parately from other anastomosis *R. Solani* is not a monophyletic group and each anastomosis corresponds to a determined different specie or divergent population of a unique specie (González, 2002). New methods have been developed for detection and quantification of the pathogen using vegetables of the ground that may be implemented in certification of seeds.

**Keywords:** Anastomosis groups, Molecular detection, rDNA, PCR-RAMS, RFLP, ITS-2.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas .....	XIII
Introducción.....	1
1. Objetivos del estudio.....	3
2. Marco teorico.....	4
3. <b>Capítulo 1</b> .....	23
Implementación de una metodología para la detección molecular e identificación de <i>Rhizoctonia solani</i> GA-3	
4. <b>Capítulo 2</b> .....	53
Análisis de una secuencia parcial ITS-2 de <i>Rhizoctonia solani</i> GA-3 en regiones de Colombia productoras de papa	
5. <b>Capítulo 3</b> .....	44
Variabilidad genética de <i>Rhizoctonia solani</i> GA-3 en regiones de Colombia productoras de papa	
6. <b>Conclusiones</b> .....	65
<b>Anexo A:</b> Protocolo de extracción de ADN en hongos .....	67
<b>Anexo B:</b> Matriz binaria de los RAMS para los tres iniciadores .....	69
<b>Anexo C:</b> Matriz binaria de los RAMS para el análisis de reproducibilidad .....	73
<b>Anexo D:</b> Alineamiento múltiple con la subrutina CLUSTAL W.....	75
<b>Anexo E:</b> Amplificación PCR-ITS 2.....	77
<b>Anexo F:</b> Amplificación ITS-completo.....	78
<b>Anexo G:</b> Digestión enzimática PCR-RFLP .....	79
<b>Anexo E:</b> Marcadores moleculares RAMS.....	80
<b>Bibliografía</b> .....	81

## Lista de figuras

**Figura 1.** Diagrama de ubicación de las regiones ITS.

**Figura 2.** Esquema de la técnica RAMS.

**Figura 3.** Amplificación PCR con iniciadores específicos para la detección *R. solani* AG3

**Figura 4.** Amplificación PCR con iniciadores específicos para la detección *R. solani* AG3 a partir de muestras de suelos inoculados en el laboratorio.

**Figura 5.** Curva estándar ng/ $\mu$ l de ADN obtenida por PCR en tiempo real para la cuantificación de *R. solani* AG3 a partir de muestras de suelo inoculados en el laboratorio.

**Figura 6.** Cuantificación de *R. solani* AG3 a partir de muestras de suelos inoculados en el laboratorio mediante PCR en tiempo real.

**Figura 7.** Perfiles obtenidos para *R. solani* AG3 y *R. solani* AG 2-1 por PCR-RFLP en la región ITS-5.8S y marcadores RAMS.

**Figura 8.** Árbol fenético de distancias genéticas para las 121 secuencias. Método UGPMA con un bootstrap de 1225 replicas, mediante el Programa PAUP (Swofford, 2002). Version 4.0.

**Figura 9.** Árbol fenético de distancias genéticas para los 36 secuencias.

**Figura 10.** Hipótesis filogenética Máxima Parsimonia (MP) para los 36 secuencias variables.

**Figura 11.** Dendrograma de *R. solani* con iniciadores RAMS por medio del índice de similitud de Dice (1945).

**Figura 12.** Análisis de Coordenadas Principales, confirma lo visto en el dendrograma.

## Lista de tablas

**Tabla 1.** Relación de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* estudiados.

**Tabla 2.** Aislamientos pertenecientes a AG-3 +/- según el análisis de secuencias ITS-B y porcentaje de máxima similitud comparados con el aislamiento AF354107 (AG-3) y DQ355130 (AG2-1).

**Tabla 3.** Detección de *R. solani* GA-3 en suelos inoculados artificialmente y mantenidos en condiciones de laboratorio.

**Tabla 4.** Aislamientos de *Rhizoctonia solani* estudiados.

**Tabla 5.** Relación de los aislamientos colombianos de *Rhizoctonia solani* estudiados.

**Tabla 6.** Secuencias variables escogidas para los análisis de distancias genéticas y máxima parsimonia.

**Tabla 7.** Nucleótidos variables en la filogenia resultante con MP en accesiones de *R solani*.



## Introducción

La papa (*Solanum tuberosum*) como producto alimenticio presenta una fuerte expansión en el mundo, situándose como el cuarto alimento básico en la década de los noventa, después del trigo, el arroz y el maíz. Figura entre los diez alimentos más importantes producidos en los países en desarrollo. Esta expansión se deriva de su gran capacidad de adaptación a los distintos climas y sistemas de cultivo, lo cual ha permitido el aumento en su producción y consumo, especialmente en los países más poblados como China y la India. A esto se le suma su gran valor alimenticio, pues es una fuente rica en proteína, carbohidratos, potasio, vitamina C, otras vitaminas y minerales en menor proporción (Espinal et al., 2006). En Colombia, es la principal actividad agrícola de las zonas andinas desarrollada por cerca de 90.000 familias (Cevipapa.org.co). En su estado fresco es un producto consumido básicamente por sectores de la población de niveles de ingreso medio e inferior, que destinan cerca del 3% de su gasto en alimentos, a la compra de este tubérculo.

Los aislamientos de *R. solani* en papa, generalmente se han identificado como miembros del grupo de anastomosis 3 (AG3) (Anguiz y Martin et al., 1988; Bandy et al. 1988; Carling y Leiner, 1986; Otrysko et al., 1985); sin embargo, otros grupos de anastomosis también se han aislado de diferentes partes de la planta, incluyendo tallos, estolones, raíces, esclerocios en tubérculos o en suelos donde recientemente se cultiva papa y quedaron éstos como inóculo (Muñoz et al., 2001 citado de Carling et al. 1989). Estos grupos son: AG2-1 (Cedeño et al., 2001; Lehtonen et al., 2008; Woodhall et al., 2007), AG 4 (Anguiz y Martin et al., 1988; Balali et al., 1995), AG5 (Balali et al., 1995), AG1 y AG9 (Elbakali et al., 2003 citado de Chand and Logan, 1983; Carling y Leiner, 1986). Análisis de variación en las secuencias ribosomales definieron dos grupos filogenéticos dentro del AG3 que corresponden a los asociados a enfermedades en papa (AG3-PT) y tabaco (AG3-TB) (Kuninaga et al., 2000), definido también por análisis AFLP (Ceresini et al., 2002a).

*R. solani* puede causar lesiones en el tallo en más del 90% de las plantas y reducir significativamente el rendimiento hasta en un 31,5% (Carling et al., 1989). En Colombia está presente en todas las áreas de producción de papa y afecta tubérculos, tallos y raíces en el cultivo, logrando reducir los rendimientos hasta en un 50% (Beltran et al., CBB).

*Rhizoctonia solani* AG3 es un habitante natural del suelo y a su vez el hongo de mayor asociación con papa (Anguiz y Martin et al., 1988; Bandy et al., 1988; Carling y Leiner, 1990), siendo el agente causal de una enfermedad conocida como "Rhizoctoniasis" o costra negra, provocando también el cáncer de tallo y estolón (Hooker, 1986), además reduce la emergencia de los brotes, el vigor de la planta y frecuentemente, los tubérculos infectados se agrietan o se deforman (Powelson et al., 1993), los esclerosios formados son estructuras de conservación, que consisten en una masa de hifas cubiertas por una pared de melanina. (Cadenas, UNALM).

La disponibilidad para diagnosticar de forma simple y específica un patógeno en suelo, contribuye de manera importante a la agricultura colombiana, ya que con esto se pueden evitar pérdidas económicas en la agricultura, por tal motivo se realiza la detección en suelo de *Rhizoctonia solani* AG3 por medio de iniciadores especie específicos. De igual manera, con el fin de obtener mayor información sobre este patógeno a nivel genotípico, es necesario realizar un análisis de variabilidad genética del grupo de anastomosis 3 por medio de los marcadores moleculares RAMS, PCR-RFLPs y secuenciación de la región ITS-2.

## Objetivo General:

Evaluar la variabilidad genética de *Rhizoctonia solani* y detectar mediante prueba molecular poblaciones del hongo y variantes AG en regiones colombianas productoras de papa.

## Objetivos Específicos:

- Detectar mediante prueba molecular la presencia de *R. solani* en tubérculo de papa y suelo (Capítulo 1).
- Determinar las relaciones filogenéticas y grupos de anastomosis (AG) mediante la amplificación y secuenciación de las regiones ITS (Espaciadores Internos Transcritos) (capítulo 2).
- Definir la existencia de subgrupos dentro del grupo anastomótico 3 utilizando marcadores moleculares de tipo RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) y RAMS (amplificación aleatoria de microsatélites) (capítulo 3).
- Realizar análisis in silico sobre secuencias ITS de *R. solani* (Capítulo 1 y 2).

## Marco Teórico

### Antecedentes

#### Detección de *Rhizoctonia solani* GA-3

LEES, A.; CULLEN, D.; SULLIVAN, L. y NICOLSON, M. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. 2002. En la detección de *Rhizoctonia solani* AG3 fueron analizados ensayos de sensibilidad y especificidad; desarrollaron iniciadores específicos a partir de la región ITS para la detección por PCR convencional y PCR en Tiempo Real.

BUDGE, G. E.; SHAW, M. W.; COLYER, A.; PIETRAVALLE, S. y BOONHAM, N. Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. 2009. Los autores desarrollan iniciadores a partir de la región ITS y del gen  $\beta$ -Tubulina para detectar a 11 diferentes grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* por PCR en Tiempo Real. Adicionalmente, logran detectar en suelo niveles de  $10^{-7}$  g esclerocio/g suelo de AG 2-1, combinando un kit de extracción de ADN de alimentos con un procesador magnético de partículas.

BOUNOU, Salim; JABAJI-HARE, Suha; HOGUE, Richard y PIERRE Charest. Polymerase chain reaction-based assay for specific detection of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates. 1999. Desarrollan el uso de SCARs a partir de iniciadores RAPD para la detección de *Rhizoctonia solani* AG-3, aunque para su diferenciación necesitan de la digestión con una enzima de restricción. Detectan el patógeno en suelo pero sin analizar la sensibilidad de la técnica de detección.

THORNTON, C. R.; O'NEILL, T. M.; HILTON, G. y GILLIGAN, C. A. Detection and recovery of *Rhizoctonia solani* in naturally infested glasshouse soils using a combined baiting, double monoclonal antibody ELISA. 1999. Los autores desarrollan una

---

metodología basada en la utilización de suelos trampa con el fin de aumentar a niveles detectables el inóculo del patógeno presente en suelos naturales y con esto detectar a *Rhizoctonia solani* por medio de anticuerpos monoclonales ELISA.

### **Variabilidad de *Rhizoctonia solani***

ELBAKALI, Abdessamad.; LILJA, Arja.; HANTULA, Jarkko y MARTÍN, María. Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. 2003. En la identificación de *Rhizoctonia solani* en aislados españoles de papa por grupos de anastomosis, ITS-RFLP y RAMS-huella genética, se trabajaron 40 aislamientos del norte de España y 4 de Finlandia, los cuales fueron analizados por agrupaciones de anastomosis, RFLP en ITS y RAMS. El grupo de anastomosis 3 fue claramente diferenciado y separado de los demás grupos por cualquiera de las técnicas. Los marcadores moleculares RAMS arrojaron mejor variabilidad genética en comparación con los RFLP.

CERESINI, Paulo; SHEW, David; VILGALYS, Rytas y CUBETA, Marc. 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. Los autores quieren ratificar la evidencia de dos subgrupos dentro de AG3 en el norte de Carolina, para lo cual, 68 aislamientos entre patógenos de papa y tabaco son analizados por AFLPs. Demuestran la evidencia de estos subgrupos y encuentran una alta variabilidad en AG3 TB y por el contrario una baja variabilidad para AG3 PT.

KUNINAGA, Shiro; CARLING, Donald; TAKEUCHI, Toru y YOKOSAWA, Ryozi. Comparison of rDNA-ITS sequences between Potato and Tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. 2000. En la comparación de secuencias rDNA-ITS entre papa y tabaco en cepas de *Rhizoctonia solani* AG-3, fue analizada la diversidad genética de 51 aislamientos de AG-3 en donde indican la presencia de dos subgrupos distintos, AG-3 PT (tipo papa) y AG-3 TB (tipo tabaco) ellos concluyen que los AG-3 PT no son patogénicos para tabaco y AG-3 TB no son patogénicos para papa. El diseño de los iniciadores específicos para la detección de los dos subgrupos fue desarrollado a partir del alineamiento de las secuencias rDNA-ITS.

JOHNK, Stevens; JONES, R.; SHEW, H. D. y CARLING, D. E. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG3 from potato and tabaco. 1993. En este proyecto se realizan las pruebas de afinidad para grupos de anastomosis, apariencia de cultivos,

requerimiento de tiamina, análisis de ácidos grasos y pruebas de patogenicidad, con lo cual logran diferenciar dos grupos dentro de AG3 pertenecientes a los patógenos para papa y tabaco.

LAROCHE, J. P.; JABAJI-HARE, S. H. y CHAREST P. M. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. 1992. Por medio del análisis de isoenzimas, los autores logran diferenciar tres posibles subgrupos dentro del grupo de anastomosis 3, encontrando que estas agrupaciones están relacionadas a la procedencia según sus zonas geográficas.

ARIZA, Nancy; ANGEL, Jorge y GIRALDO, Julio. Caracterización molecular y análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, en cultivos de papa de Cundinamarca y Nariño. 2003. El patógeno fue aislado e identificado morfológicamente por microscopía; adicionalmente cada aislamiento fue analizado mediante la PCR usando cuatro secuencias de regiones ITS, incluyendo el gen 5.8S. De estas amplificaciones se obtuvieron productos de 312, 437 y 735 pb. La variabilidad genética se determinó por la técnica RAPD, para la cual se probaron 43 diferentes decaoligonucleótidos, de los cuales 5 mostraron polimorfismo.

CHAVARRO, Edisson; SASTOQUE, Leonardo; BELTRAN, Camilo; ANGEL, Jorge y COTES, Alba. Detección de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa utilizando secuencias de ADN-ITS en tres regiones de Colombia. 2007. Este trabajo muestra un análisis de secuencias parciales ITS-B para la identificación de *R. solani* y grupos de anastomosis sobre aislamientos nativos obtenidos a partir de cultivos de papa en tres zonas productoras de Colombia; las secuencias analizadas demostraron la presencia de AG3 predominante en papa y algunos AG 2-1.

### **Importancia del cultivo de la Papa (*Solanum tuberosum*)**

**Cultivo de Papa en el Mundo.** Según estudios internacionales, el cultivo de la papa juega un rol importante en el sistema de alimentación global, contribuye a los requerimientos energéticos y de nutrientes de más de dos mil millones de personas en los países en desarrollo (Espinal *et al.*, 2006 citado de FPRI, 2002).

La papa como producto alimenticio presenta una fuerte expansión en el contexto mundial situándose como el cuarto producto básico en la década de los noventa, después del trigo, el arroz y el maíz. Los 5 principales productores (China, Rusia, Polonia, India y

---

Estados Unidos) concentran el 53% de la 311 millones de toneladas que se producen en el mundo. Los principales exportadores son los Países Bajos, Francia, Alemania, Bélgica-Luxemburgo y Canadá, que concentran el 63% de las 7,8 millones de Ton que se exportan. Sin embargo estos mismos países, además de Italia, España y los Estados Unidos, se constituyen como los mayores importadores de papa para consumo, concentrando el 62% de las importaciones. La papa a nivel mundial presenta un crecimiento moderado, el cual ha aumentado a una tasa anual del 1,6% (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2004).

**Cultivo de Papa en Colombia.** Colombia ha pasado de 15,3 Ton/Ha en 1990 a 17,4 Ton/Ha en el 2000. El incremento en los rendimientos obedece a la introducción de variedades como la Diacol capiro para atender las demandas de la industria y a los avances de la tecnología. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2004).

En el 2004 el cultivo de la papa en Colombia ocupó el quinto lugar en la producción agropecuaria nacional, con 2,8 millones de Tm., fue el noveno cultivo en extensión con 161.873 Ha.4 y el sexto en valor de la producción. En términos constantes, el valor de la producción en el lapso 1992-2004, creció a una tasa del 0,6%, inferior a la tasa de crecimiento que presentó el valor de la agricultura sin café (1,6%). (Espinal *et al.*, 2006).

La papa es el producto de origen agrícola de mayor consumo per cápita en el país 64.3 Kg/hab. Si bien a nivel mundial se considera alto, ya que está por encima del promedio mundial (50 Kg/Hab), éste se encuentra por debajo del registrado por los países de la UE con 119 Kg/Hab y la CAN (67,5 Kg/año). Respecto a otros países de la región, el consumo per cápita de papa en Colombia es mayor al registrado en MERCOSUR (23 Kg/Hab). (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2004 citado de Agrocadenas.gov.co, 2002).

La producción está ubicada en 14 departamentos, siendo cuatro los que concentran el 90% de la misma y el 91% de la superficie cultivada. Los mayores productores son: Cundinamarca (41%), Boyacá (25.8%), Nariño (13.2%) y Antioquia (7.6%). (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2004).

**Producción del Cultivo de Papa en Colombia.** Una de las características principales del cultivo de la papa en Colombia es la dependencia casi total del régimen de lluvias, lo cual se traduce en una muy definida estacionalidad en su producción. Sólo un pequeño

porcentaje de la producción se adelanta bajo condiciones de riego artificial (Sabana de Bogotá y Samacá en Boyacá, principalmente), por lo que en general, la cosecha depende de los dos períodos de lluvias que se presentan en el año. El primer período se da de Marzo a Junio, época de mayor distribución y abundancia de lluvias, de cosecha y producción regular, y por consiguiente, la de mayor oferta del producto y menores precios. El segundo período se presenta de Septiembre a Noviembre (Espinal *et al.*, 2006).

La producción de papa en Colombia presentó en el lapso 1961- 2004 un crecimiento anual promedio de 3,9%, de esta forma la producción pasó de 551.300 Tm. en 1961 a 2'836.187 Tm. en el 2004. El mayor nivel de producción en los últimos 42 años se presentó en el año 1994, cuando se alcanzaron 2.938.631 Tm. En cuanto a la superficie total cultivada de papa, esta creció a una tasa del 2.6% durante estas cuatro décadas. No obstante, la producción de papa ha visto reducida su dinámica de crecimiento durante las dos últimas décadas, toda vez que en los 80's creció a una tasa promedio anual del 2,1% y en la década de los noventas tan sólo al 1,2%. Los mayores incrementos se presentaron en la década de los setentas, cuando la tasa de crecimiento anual promedio fue de 10,4%. (Espinal *et al.*, 2006).

La elasticidad precio de la oferta de la papa es positiva; es decir, tanto el área como la cantidad producida responden rápidamente a los cambios en los precios, dado que los agricultores atienden efectivamente los incentivos económicos. No obstante, en el cultivo de la papa, la elasticidad del área (0,51) y la elasticidad de la producción (0,84) muestran que ante incrementos en los precios, los agricultores actúan mejorando la productividad (más producción en la misma superficie) y menos con aumentos en el área cultivada. En otras palabras, la demanda por tierra de los agricultores de papa es inelástica, mientras que la producción es elástica, esta última aumenta ante al estímulo de los precios. (Espinal *et al.*, 2006 citado de Ramírez *et al.*, 2005).

### ***Principales enfermedades de la papa en Colombia***

Anteriormente se pensaba que la gota o tizón tardío, causada por *Phytophthora infestans* era la única enfermedad de importancia económica en el cultivo de la papa, salvo problemas muy localizados. En el presente, el panorama ha cambiado y la gama de enfermedades de importancia es mucho más amplia. Además de la gota, se deben incluir

---

varios virus y sus respectivos vectores, y algunos patógenos que viven en el suelo (García *et al.* 2000).

La planta de papa es susceptible a por lo menos 75 agentes diferentes entre insectos plaga, microorganismos, fitopatógenos, nematodos y desórdenes no parasíticos, muchos de los cuales causan pérdidas en la producción en áreas del cultivo. Tradicionalmente los agricultores suelen seleccionar para semilla aquella papa que no pueden comercializar, o basados en criterios como la forma y tamaño del tubérculo, pero sin tener en cuenta su sanidad. Muy frecuentemente los tubérculos seleccionados son portadores de diversas enfermedades, lo que ocasiona bajos rendimientos cuando son sembrados, lo cual a su vez constituye un factor de importancia para la diseminación de insectos plaga y de enfermedades (Herrera *et al.* 2001).

Varias enfermedades de la papa, como la marchitez causada por el hongo *Verticillium* sp. y diversas virosis (PLRV, PVX, PVY, PVS, y PYVV) no muestran síntomas visibles en el tubérculo. En otras enfermedades como la roña (*Spongospora subterranea*), la mortaja (*Rosellinia* spp.) y la rhizoctoniasis (*R. solani*) es posible observar algunos signos leves de enfermedad sobre los tubérculos. Sin embargo, sólo después de la siembra en la fase de crecimiento del cultivo dichas enfermedades se manifiestan, infestan el lote y afectan la producción (Zapata, 2000; Herrera *et al.* 2001).

Los patógenos que infectan el tubérculo han cobrado importancia debido al aumento en su incidencia en casi todas las zonas productoras. Las pérdidas en la cosecha de papa son cercanas al 20% de la producción, afectando significativamente la productividad y la rentabilidad del cultivo (Morales *et al.* 2000). Aún cuando regiones como Cundinamarca y Boyacá tienen la mayor área de producción, son pocos los estudios desarrollados acerca de los patógenos del suelo. De otra parte, Arcila (1996) citado por Morales *et al.* (2000) evaluó y cuantificó las pérdidas en los municipios de Túquerres, Pupiales, Guachucal y en la ciudad de Pasto (Nariño) encontrando en precosecha y cosecha de papa, pérdidas del 21.1% del total cosechado, siendo las enfermedades y los insectos plaga los causantes de dichas pérdidas. Aunque en Colombia no se han desarrollado muchos trabajos sobre el impacto de *R. solani*, en la región productora de Caldas se encontró en tubérculo-semilla hasta 42% de incidencia de este patógeno (Martínez *et al.* 1988. citado por Rodríguez *et al.* 2000).

***Rhizoctonia solani* Kühn**

*Rhizoctonia solani* fue descrito por Julios Kühn en 1858. Este hongo, perteneciente a la Clase Basidiomycete no produce esporas asexuales (conidios) y únicamente en condiciones especiales produce esporas sexuales (basidiosporas). En la naturaleza *R. solani* se reproduce asexualmente y existe como micelio vegetativo, el cual forma estructuras de resistencia o esclerocios, que son masas de hifas estrechamente entrelazadas con superficies duras y resistentes. El estado sexual se conoce como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Domsch *et al.* 1980).

Jager, *et al.* (1982) citado por Ávila *et al.* (1994), mencionó que el fitopatógeno *R. solani* puede atacar 250 especies de plantas y que se presenta tanto en campo como en el sitio de almacenamiento de tubérculos que van a ser usados como material de propagación. También indica, que de estas 250 especies que ataca el fitopatógeno, 52 corresponden a plantas arvenses asociadas al cultivo de papa.

Este fitopatógeno se presenta en casi todos los suelos porque tiene una amplia gama de hospedantes; sobrevive en los residuos de plantas y en forma de esclerocios. En papa *R. solani* ocasiona la enfermedad denominada rhizoctoniasis o cáncer de raíces o tallos y costra negra cuando se presenta como esclerocios en la superficie de los tubérculos. Se desarrolla a temperaturas muy diversas en zonas cálidas, templadas y frías, ocasionando daño considerable en los brotes emergentes del tubérculo cuando las condiciones no favorecen su rápida emergencia; por ejemplo, en suelos húmedos, ácidos y fríos (suelos inundables) (Nieto, 1988; CIP, 1996). La enfermedad es común en todas las regiones donde se cultiva papa, encontrándose tanto superficialmente como en estratos profundos del suelo (CIP, 1980).

La rhizoctoniasis es una enfermedad persistente, muy adaptable, versátil y con capacidad de causar daños importantes al tejido vegetal colonizado (Nieto, 1988; Chung *et al.* 1988; Dijst, 1990; Prado *et al.* 2001; Yildiz y Timur, 2002), logrando ocasionar lesiones importantes en las raíces, el tallo y tubérculos de papa.

De acuerdo con observaciones realizadas *in vitro* se determinó la habilidad que presenta el fitopatógeno para fusionar sus hifas (anastomosis), según esta característica este hongo se clasifica en grupos de anastomosis (AG), que se diferencian morfológica y fisiológicamente en rangos de hospederos, por requerimientos nutricionales, por

---

características bioquímicas, moleculares y secuencias de ADN, habiendo descrito y caracterizado al menos 13 AG usando las reacciones de anastomosis (Carling *et al.* 2002).

A pesar de los daños que puede ocasionar *R. solani* en diversos cultivos, este patógeno es bastante versátil ya que dentro de esta misma especie también se incluyen grupos de anastomosis binucleados tales como el np-R (Sneh *et al.* 1998) y un aislamiento no patogénico del AG3 (Bandy *et al.* 1988) capaces de ejercer un control biológico efectivo de *R. solani* en el cultivo de papa. Esta especie también incluye grupos de anastomosis como el AG5 que es considerado como un patógeno débil en papa (Abe y Tsuboki, 1978) y que puede hacer asociaciones micorrícicas en orquídeas (Uetake *et al.* 1998 citado por Sneh *et al.* 1998).

Los aislamientos de *R. solani* correspondientes al grupo de anastomosis AG3 se caracterizan por ser los de mayor incidencia en plantas de papa (Hooker, 1981), se asocian con lesiones que ocasionan chancros y la infestación de los tubérculos ocasionando costras negras, ya que en su superficie forman esclerocios que soportan temperaturas variables (Bandy *et al.* 1988; Hofman y Jongebloed, 1988; Carling y Leiner, 1990; Jeger *et al.* 1996 citado por Oicata, 2001). El AG4 es el más patogénico, no forma esclerocios, soporta temperaturas altas, afecta otros cultivos incluyendo la papa (Anguiz y Martín, 1990 citado por Torres, 2002) y produce volcamiento y pudrición de raíces (Anderson, 1982). Sin embargo, de este mismo grupo también se han encontrado aislamientos no patogénicos en papa (Ichielevich-Auster *et al.* 1985).

Varios aislamientos del género *Rhizoctonia* spp. constituyen un grupo de endófitos asociados con raíces de orquídeas que pueden vivir como simbioses, siendo esenciales en muchos casos para la germinación de semillas y para el desarrollo de la planta, entre los aislamientos de *Rhizoctonia* spp. muchos muestran especificidad por su hospedero mientras otros tienen un amplio rango sin haber sido identificados a especie (Currah *et al.* 1990 citado por Sneh *et al.* 1998).

**Grupos de anastomosis AG.** Los criterios de anastomosis hifal han sido usados exhaustivamente por quienes han clasificado a *Rhizoctonia* en grupos taxonómicamente distintos llamados grupos de anastomosis. En la práctica, la anastomosis es determinada de varias maneras. El ensayo más comúnmente empleado involucra el emparejamiento de dos aislados de *Rhizoctonia* sobre un porta objeto y permitir su crecimiento juntos. El

área de unión de las hifas es teñida y examinada al microscopio para el resultado de la interacción de hifas. El emparejamiento entre AGs no resulta solamente de la fusión de hifas, sino que indica grandes diferencias genéticas entre aislados (Ceresini, 1999).

El proceso de fusión perfecta de las hifas de *R. solani* es resumido de la siguiente manera: crecimiento hifal, secreción de una o más sustancias atrayentes, atracción por las sustancias, contacto de hifas, cese del crecimiento hifal, formación de una proyección semejante a una rama, disolución de las paredes celulares y conexión de protoplasmas. La fusión imperfecta difiere en que la disolución de las paredes celulares es seguida por la muerte celular. Un aislado de un AG puede reconocer y fusionarse solamente con miembros de su mismo AG (Ogoshi, 1987). Según Priyatmojo (1999), cuando ocurre el apareamiento de aislados por anastomosis hifal, la punta de la rama de una hifa (Y) muestra tropismo hacia la rama de la otra hifa (X). Este fenómeno ocurre cuando las dos hifas están a una distancia de 34  $\mu\text{m}$  o incluso a una distancia de 100  $\mu\text{m}$ . Como resultado de esto, la dirección del crecimiento de la hifa es cambiada aproximadamente a un ángulo de 42°. El cambio de dirección y el crecimiento de la hifa Y hacia la hifa X son causados por la producción de atrayentes difundidos por la hifa X. Sobre la atracción, la tasa de crecimiento de la hifa Y incrementa casi dos veces, en cambio, la tasa de crecimiento de la hifa X no es tan rápida como la hifa Y.

Se conoce muy poco sobre los mecanismos genéticos que controlan este proceso de reconocimiento en *Rhizoctonia*, en otros hongos filamentosos la incompatibilidad somática es controlada por algunos genes con alelos múltiples (Ceresini, 1999).

Según Woodhall *et al.* (2007), los criterios para delimitar los grupos de anastomosis fueron establecidos por Macnish *et al.* (1993), quien distinguió cuatro clases de reacción de acuerdo al grado de interacción entre las hifas de los aislamientos que corresponden a C0= no hay reconocimiento observado entre hifas; C1= hay contacto de hifas, conexión de paredes pero no hay contacto entre membranas; C2= la fusión de hifas resulta de la muerte de las células fusionadas y adyacentes y C3= hay fusión de paredes y membranas sin evidenciarse muerte de células. Para determinar estos grupos de anastomosis, los aislamientos se colocan en caja de petri con agar agua distanciados 2-3 cm, observando fusión hifal y muerte de células fusionadas en los aislamientos pertenecientes al mismo AG.

---

El complejo *R. solani* se divide en 14 grupos de anastomosis (AG1 al AG13 y AG-BI) (Carling *et al*, 2002), los cuales difieren en características bioquímicas, genéticas y patogénicas.

*R. solani*, es un hongo no especializado, sin embargo existe una relación no perfecta entre grupos anastomosis y especificidad por los huéspedes. Por ejemplo los aislamientos AG1 afectan principalmente a la familia gramínea (AG-1 IA) y leguminosas (AG-1 IB). Un gran número de aislamientos AG-2-1 afectan a la familia cruciferae, mientras AG-2-2 afectan a la familia Chenopodiaceae, principalmente remolacha. La mayoría de los aislamientos AG-3 afecta a la familia solanaceae. Los grupos de anastomosis son consistentes con el rango de huéspedes. Por esto, la patogenicidad de *R. solani* puede ser estudiada sobre la base de los grupos de anastomosis (Akino y Ogoshi, 1995).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En 1983, Mullis desarrolló un procedimiento que permitía realizar copias de un fragmento de ADN de forma rápida y económica y que se denominó reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares en los laboratorios de microbiología, por su sencillez y facilidad de aplicación. La PCR se basa en la repetición de tres procesos: (1) desnaturalización térmica del ADN; (2) hibridación de cebadores (oligonucleótidos) específicos al ADN de cadena sencilla, y (3) extensión enzimática del ADN. El proceso se lleva a cabo en un bloque térmico denominado termociclador. En cada repetición se duplica la cantidad de ADN específico, así en una reacción típica de 30–40 ciclos se generan 2<sup>30</sup>–40 moléculas del DNA de interés (amplicones).

1. Desnaturalización: Consiste en separar la doble hebra de ADN y convertirla en hebra sencilla. Típicamente se usa una temperatura de 95°C - 97°C, por 15 a 40 segundos (el tiempo depende del tamaño del genoma).
2. Apareamiento de los iniciadores: Los cebadores “primers” previamente diseñados, reaccionan con la hebra sencilla de ADN y se pegan en lugares específicos por complementariedad de bases. Para esto, se baja la temperatura, esta y el tiempo puede variar entre cebadores según sea el caso.

3. Polimerización o Extensión: Una Polimerasa de ADN extiende los “primers”, en el espacio comprendido entre ambos “primers”, y coloca dinucleotidos trifosfatados (dNTP's) de 5'a 3' leyendo el ADN de 3'a 5'. De estas forma sintetiza la secuencia complementaria de las hebras de ADN molde, se efectúa a 70°C por 1½ minutos (puede variar según sea necesario).

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR)**

Esta técnica es una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultanea, de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación. Existen diversos formatos de detección que, en teoría, se pueden utilizar con todos los equipos de PCR en tiempo real, aunque cada fabricante recomienda el formato más adecuado para su(s) sistema(s).

El formato más sencillo es el que usa moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble, siendo la más utilizada SYBR® Green (menos tóxica que el bromuro de etidio). El uso de intercaladores fluorescentes, sin embargo, presenta algunos inconvenientes, como que cualquier producto amplificado (específico o inespecífico) producirá fluorescencia o que no se puede utilizar para detectar productos múltiples, aunque hay técnicas para solventarlos. El resto de formatos de detección se basan en la hibridación de sondas internas con el fragmento amplificado, existiendo diversos sistemas de generación de la señal fluorescente. Dentro de estos sistemas, los más conocidos son los siguientes: Sondas TaqMan®. Diseñadas por Applied Biosystems, hacen uso de la actividad 5' exonucleasa de la Taq (Thermus aquaticus) ADN polimerasa. Estas sondas tienen un marcador fluorescente en el extremo 5' y una molécula que absorbe ("quencher") la fluorescencia emitida por el marcador en el otro extremo. La sonda hibrida con el fragmento específico (si está presente) y, a medida que se sintetiza la hebra complementaria al fragmento, la sonda se va degradando por la acción exonucleasa, liberando el marcador que ahora sí emite fluorescencia. Cebadores fluorescentes ("Molecular Beacons"). En estos tipos, la molécula fluorescente y la molécula que absorbe la fluorescencia se mantienen próximas mediante la formación de una horquilla de hibridación.

---

Doble sonda marcada o sondas de hibridación (sondas "LightCycler"). En este caso se emplean dos sondas marcadas con moléculas fluorescentes en posición 5' (sonda A) y 3' (sonda B) y que hibridan en regiones adyacentes del ADN diana. Cuando se produce la hibridación, la primera sonda emite fluorescencia que excita al colorante de la segunda sonda, produciendo una señal detectable. La visualización de los resultados se consigue mediante la integración de la señal fluorescente y se refleja en una curva de amplificación, considerándose que hay un resultado positivo cuando la señal emitida es superior al umbral establecido; el ciclo en que se considera que se obtiene la señal positiva está relacionado con la cantidad inicial de ADN molde.

### **Regiones Espaciadoras Internas Transcritas (ITS)**

Los genes ribosomales y los espacios entre ellos proveen sitios diana atractivos para la detección molecular y estudios filogenéticos porque en ellos ocurre un alto número de copias, poseen secuencias conservadas como también variables y pueden ser amplificados y secuenciados con iniciadores universales basados en sus secuencias conservadas. Los genes 5.8S, 18S y 28S (figura 1) para el RNA ribosomal nuclear en hongos son organizados normalmente en tándem con repeticiones idénticas de 60-200 copias por genoma haploide (Henson y French, 1993).

A pesar de la conservación de los genes del RNA de los hongos, existe la variación suficiente en las secuencias para permitir su uso como sitios diana para la amplificación diferencial. Considerablemente, la variación de secuencia más grande es encontrada en los espacios internos transcritos (ITS), regiones entre los genes rRNA dentro de una unidad repetitiva de rRNA. Entonces, algún organismo o incluso cepas diferentes aisladas de un mismo organismo que tengan repeticiones del rDNA, pueden ser detectados específicamente por la selección de iniciadores basados en los espaciadores de las regiones variables (Henson y French, 1993).

Las regiones ITS son secuencias de ADN altamente específicas, que se encuentran entre los genes que codifican para el RNA ribosomal. Estas regiones son utilizadas en el estudio de poblaciones puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener una buena información filogenética y taxonómica de los individuos (Liu *et al.*, 1992).

Las regiones ITS son de evolución rápida y por consiguiente su variabilidad permite la realización de análisis filogénicos, evolutivos y biogeográficos entre órdenes, géneros y especies relacionados, siendo de gran utilidad en casos en los cuales los caracteres

morfológicos no son suficientes para la solución de problemas evolutivos y taxonómicos (Baldwin *et al.*, 1995).

Actualmente se cuenta con gran cantidad de secuencias de ADN ribosomal (rDNA) que han sido alineadas y comparadas en numerosos organismos, lo que ha permitido recolectar información acerca de sus relaciones filogenéticas. En especial los Espaciadores de Transcripción Interna (ITS) han sido ampliamente utilizados en el estudio de la relación filogenética entre taxones muy cercanos y en la identificación específica de organismos, especialmente patógenos.

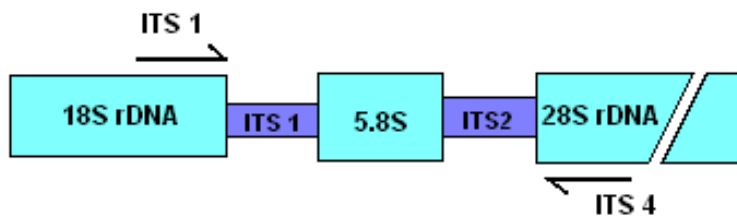


Figura 1. Diagrama de ubicación de las regiones ITS. Fuente (Ariza, 2003)

### **RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)**

Es un método simple para detectar la variabilidad en las secuencias de ADN dentro de los genomas de una población de individuos, usando mutaciones en los sitios de acción de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son endonucleasas aisladas de microorganismos que las producen como protección contra ADN foráneo, las cuales cortan el ADN en secuencias específicas de 4 a 8 (generalmente 6) nucleótidos (Passarge, 2001), produciendo fragmentos de restricción cuyo tamaño medido refleja la frecuencia con la que la secuencia de restricción específica es encontrada a lo largo del ADN. Las mutaciones de punto podrían causar que sitios de restricción desaparezcan, llevando a que el fragmento de restricción afectado aumente de tamaño por la adición del fragmento adyacente, o podrían causar que nuevos sitios de restricción aparezcan, partiendo un fragmento de restricción en dos fragmentos más pequeños (Creighton, 1999).

Los marcadores RFLP se comportan como marcadores codominantes, en tanto que los marcadores morfológicos y los marcadores basados en PCR, poseen alelos que interactúan de manera dominante/recesiva. Además, el nivel de variación alélica de los

marcadores RFLP en poblaciones naturales de plantas es mayor que con los marcadores morfológicos (Azofeifa, 2006 citado de Helentjaris *et al.* 1985).

### RAMS (Amplificación Aleatoria de Microsatélites)

Los amplificados aleatorios de microsatélites (Random Amplified Microsatellite-RAMS) son una técnica descrita inicialmente por Zietkiewicz *et al.* (1994) para plantas y animales, luego fue aplicada para estudios en hongos por Hantula *et al.* (1996) quien le asigna el nombre. Esta técnica combina muchos beneficios de los análisis microsatélites con la universalidad de los RAPD, la cual es muy usada para estudios en variación genética. Los fragmentos de ADN amplificados en la reacción están compuestos de dos microsatélites suficientemente cercanos para amplificar por PCR el área entre ellos (Zietkiewicz *et al.*, 1994). La Figura 2 ilustra la amplificación con un iniciador RAM.

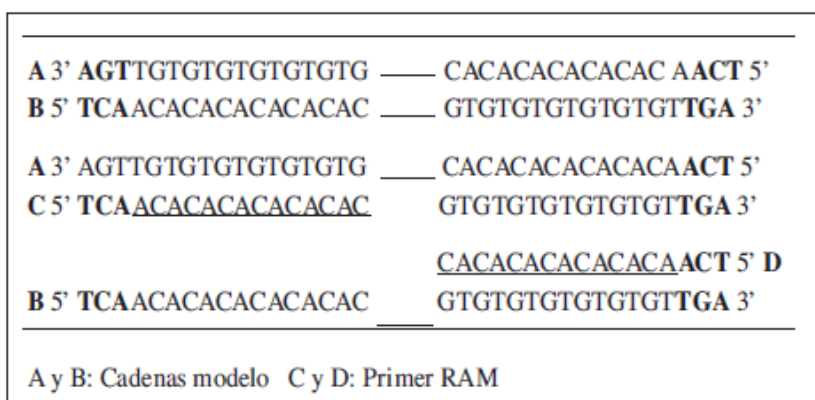


Figura 2. Esquema de la técnica RAMS. Fuente (Muñoz *et al.*, 2008).

Hantula *et al.* (1996) describe que hay tres posibilidades de la variabilidad de los fragmentos obtenidos por los RAMS:

- Las mutaciones en el sitio de unión podrían evitar la amplificación de un fragmento como en los marcadores RAPD. Esto es posible pero puede ser menos probable con los microsatélites porque la variabilidad en estos elementos resulta principalmente de diferencias en el número de repeticiones.
- El resultado de una inserción o supresión entre al fragmento amplificado podría originar amplio polimorfismo o ausencia de productos, dependiendo de la habilidad de amplificación.

- La variabilidad en el número de repeticiones del microsatélite, podría determinar el tamaño del polimorfismo.

Entre los marcadores moleculares conocidos los RAMs (Random Amplified Microsatellite o Microsatélites Amplificados al Azar) son muy útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no lo hace (Muñoz *et al.*, 2008).

- *Reproducibilidad de los RAMS*

Pérez *et al.* (1998), define la autosimilaridad como la similaridad de un individuo con el mismo en dos replicas, y está determinada con la fórmula,

$$S_{xx'} = 2n_{xx'} / (n_x + n_{x'})$$

donde  $n_{xx'}$  es el número de bandas comunes en las réplicas del individuo, dividido por la sumatoria de las bandas obtenidas para cada replica. También define la repetibilidad de la banda con la siguiente fórmula,

$$R_b = 2b_{12} / (b_1 + b_2)$$

donde  $b_{12}$  es el número de individuos que poseen la banda, divididos por la sumatoria de  $b_1$  y  $b_2$ , que son el número de individuos que poseen esa banda en las replicas uno y dos. Adicionalmente, se calcula la frecuencia media observada de cada banda con la fórmula,

$$f_b = (b_1 + b_2) / 2N$$

donde N es el número de individuos analizados.

### ***Marcadores moleculares en el estudio del complejo *Rhizoctonia*.***

Los marcadores moleculares revelan sitios de variación de la secuencia de ADN. A diferencia de los caracteres morfológicos, los cambios no se muestran por sí mismos en el fenotipo, porque pueden ser solo en un nucleótido del gen o en una secuencia repetitiva del ADN. Los marcadores moleculares son más numerosos que los morfológicos, por lo que su polimorfismo sobrepasa varias veces el de otras variantes

---

genéticas, que incluyen las isoenzimas. Determinados hongos filamentosos, como los pertenecientes al grupo *Rhizoctonia*, tienen pocos caracteres fenotípicos que pueden usarse para diferenciar entre individuos de una población, lo cual limita el estudio sobre la biología de las poblaciones en estos organismos. Los marcadores fenotípicos han sido útiles para diferenciar entre especies, pero no tienen suficiente resolución para distinguir entre individuos de una misma especie. La posibilidad de conocer la secuencia del ADN ha hecho práctico llevar a cabo estudios básicos de población y biología evolutiva en hongos (Rosewich y McDonald, 1994). La profundización en el conocimiento de la biología de este complejo fúngico requiere cada vez más de la aplicación de marcadores moleculares para caracterizar genotípicamente la estructura de las poblaciones. Estas herramientas se han aplicado al estudio de diferentes especies de *Rhizoctonia* y están enfocados a la búsqueda de diferencias genotípicas entre AG, subgrupos e incluso dentro de un mismo AG (Ogoshi, 1987; Vilgalys y Cubeta, 1994). Entre las técnicas moleculares utilizadas para estos fines se incluyen los análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Jajabi- Hare *et al.*, 1990; Cubeta *et al.*, 1996), hibridación de ADN (Matthew *et al.*, 1995; Balali *et al.*, 1996) y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Duncan *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995). La secuenciación directa de los fragmentos de la región diana es uno de los métodos más fiables y sensibles para detectar y comprender la diversidad genética. De esta forma las secuencias obtenidas se pueden comparar con las de otros taxones (Boysen *et al.*, 1996; Hsiang y Dean, 2001; González *et al.*, 2002; Fenilli *et al.*, 2003). Un criterio que se ha de considerar para la elección de un marcador molecular es que pueda discriminar el genotipo de cada individuo en una población en estudio. Para el complejo *Rhizoctonia* se recomienda el uso de marcadores conservados desde el punto de vista evolutivo, debido a que se ha demostrado un bajo nivel de complementariedad de secuencias entre grupos intraespecíficos (Vilgalys, 1988]. Para este propósito los genes que codifican para el ARN ribosomal son adecuados como marcadores moleculares, ya que estos evolucionan más lentamente que otras partes del genoma y abre posibilidades de comparaciones evolutivas a diferentes niveles taxonómicos (Appels y Dvorak, 1982; Hillis y Davis, 1986). Debido a que cada método tiene sus ventajas y limitaciones se aconseja la combinación de varios de ellos de acuerdo con los aspectos metodológicos y logísticos, como por ejemplo preparación de la muestra, nivel de reproducibilidad, costo y seguridad, así como consideraciones analíticas.

**Genes que codifican el ARN ribosomal.** Las secuencias que codifican el ARN ribosomal (ADNr) se han utilizado para el estudio de las relaciones filogenéticas y taxonómicas en hongos (Bruns *et al.*, 1991). Los genes ribosomales están localizados en las mitocondrias y en el núcleo, y contienen numerosas regiones con secuencias altamente conservadas y otras con gran variabilidad (White *et al.*, 1990). El ADNr nuclear usualmente existe en los hongos como elementos en bloques repetidos. Cada unidad está formada por un sistema complejo de secuencias que incluye los genes 18S, 28S y 5.8S, que codifican para las proteínas que forman las subunidades ribosomales, y se encuentran separados por dos espaciadores internos que se transcriben, llamados ITS1 e ITS2, de una longitud entre 200 y 400 pares de bases (pb). Hay además un espaciador interno que no se transcribe, llamado IGS. Los módulos repetidos del ADNr nuclear pueden encontrarse en uno o varios cromosomas, y el número varía de acuerdo con el genoma. Pueden encontrarse desde 60 copias en el género *Coprinus* hasta 200 en *Neurospora* (Iturralde *et al.*, 2002). En *T. praticola* Kotila & Flentje, especie propuesta como teleomorfo del AG-4 de *R. solani*, se detectaron aproximadamente 59 copias (Vilgalys y González, 1990a). En algunos casos existe la subunidad 5S que puede estar localizada dentro de la unidad ribosomal o en otra región del genoma (Iturralde *et al.*, 2002). Las secuencias 28S, 18S y 5.8S están altamente conservadas y evolucionan lentamente, por lo que se utilizan para obtener información sobre las relaciones filogenéticas. Las zonas no codificantes (ITS1, ITS2 e IGS) son más variables porque acumulan mayor número de mutaciones y tienen gran interés en la identificación y tipificación de especies fúngicas. White *et al.* (1990) diseñaron y describieron cebadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nuclear de hongos, lo que abrió la posibilidad de realizar estudios filogenéticos con el uso de estos genes. La diversidad intraespecífica en el ADNr nuclear es común en hongos. En estudios de polimorfismo en esta región para varias especies fúngicas han mostrado que el ADNr nuclear es adecuado para el análisis de la relación genética a nivel de género y especie (Kistler *et al.*, 1987; Klassen *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1992).

Los estudios para el complejo *Rhizoctonia* se han dirigido fundamentalmente a la caracterización de los diferentes AG, principalmente en anamorfos pertenecientes a *Ceratobasidium* y cepas de *R. solani* (Ceresini *et al.*, 2002a, 2002b; Perdomo *et al.*, 2007; Carling *et al.*, 2002a, 2002b; Lubeck y Poulsen, 2001; Priyatmojo *et al.*, 2001). La determinación del contenido de guanina-citosina se llevó a cabo por Kuninaga y

---

Yokosawa (1980) para *R. solani*, y se comprobó que era similar en cepas pertenecientes al mismo AG. Estudios de hibridización ADN-ADN demostraron que el agrupamiento por complementariedad de secuencias se correspondía con el propuesto según la anastomosis hifal (Kuninaga y Yokosawa 1984; 1985; Vilgalys, 1988; Carling y Kuninaga, 1990). Se diferenciaron subgrupos dentro de los AG-2 y AG-8 de *R. solani* (Duncan *et al.* 1993). Se encontró además alto nivel de correspondencia entre los patrones de restricción generados por RFLP y los grupos de anastomosis (Vilgalys y González 1990b). Con respecto a los taxones binucleados, Cubeta *et al.* (1991) caracterizaron 13 de los 21 grupos descritos con el empleo de análisis de restricción en parte de la subunidad ribosomal 28S. También se ha podido separar en subgrupos dentro del AG-D mediante RAPD y RFLP (Toda *et al.*, 1999). Diferentes investigadores utilizan la secuenciación directa del ADNr nuclear para dilucidar las relaciones filogenéticas entre diversos organismos del complejo *Rhizoctonia* (Boysen *et al.*, 1996; Kuninaga *et al.*, 1997; Roberts, 1999; Salazar *et al.*, 1999; 2000; González *et al.*, 2001; 2002; 2006b; Carling *et al.*, 2002a). Con el desarrollo alcanzado en las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la automatización del proceso de secuenciación es posible y sencillo amplificar y estudiar la variación en la secuencia del ADNr en el nivel taxonómico deseado. La secuencia del ADNr puede brindar información y alto nivel de resolución de las diferencias genéticas entre especies de *Rhizoctonia*.



# 1. Capítulo 1

## TÍTULO:

**“Implementación de una metodología para la detección molecular e identificación de *Rhizoctonia solani* GA-3”**

## RESUMEN

El hongo *Rhizoctonia solani*, tiene pocos caracteres fenotípicos que pueden usarse para diferenciar entre individuos de una población o grupo de anastomosis, esto dificulta su detección en distintos tipos de muestras, fundamentalmente en tubérculos destinados a semilla y suelos que serán cultivados. El objetivo del presente trabajo fue detectar mediante prueba molecular la presencia de *R. solani* en tubérculo de papa y suelo. Los aislamientos fueron identificados mediante; compatibilidad de anastomosis, iniciadores específicos y secuenciación de la región ITS-2, para tal fin se implementó una prueba de PCR convencional y PCR en Tiempo Real Taq Man. La PCR-ITS 2 es una técnica que permite la identificación preliminar y presuntiva del grupo AG3 de *R. solani* mediante el alineamiento múltiple de secuencias con otras secuencias de referencia. Se obtuvo un producto de amplificación de 500 pb. para la amplificación específica por PCR convencional de *R. solani* GA-3 a partir de material vegetal. Los aislamientos 030, 056 e ICA004 (GA2-1), no se visualizó amplificación, confirmando con esto su grupo de anastomosis. La detección a partir de suelos incubados a 7 días y suelos incubados a 15 días, se observó la banda del tamaño esperado (500pb) mediante PCR convencional. La Cuantificación de *R. solani* AG3 mediante PCR en Tiempo Real Taq-Man a partir de muestras de suelos inoculados en el laboratorio, logró detectar un rango que osciló entre 0,0058 a 61,5 ng/μL, Detectándose la presencia del patógeno en muestras de suelo. Los resultados mostraron que se dispone de una técnica sensible para la detección de *R. solani* GA-3 que puede ser implementada como un método de control del hongo en programas de producción de semilla y certificación de áreas libres del patógeno.

**Palabras Claves:** PCR, PCR Real time, Grupo de anastomosis, Detección molecular, *R. solani* AG-3

## **"Implementation of a methodology for molecular detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3"**

### **ABSTRACT**

The fungus *Rhizoctonia solani* has few phenotype characters that may be used to differentiate one from another in a population or a group of anastomosis, which makes the detection process more difficult in different samples, especially in tubers used for seeds and grounds used to grow potatoes. The objective of this work is to detect using a molecular method the presence of *R. Solani* in potatoes and ground. The isolates were identified by, anastomosis compatibility, specific primers and sequencing of the ITS-2 region was implemented for this purpose a conventional PCR and Real-Time PCR Taq Man. . PCR-ITS 2 is a technique that allows preliminary identification of group AG3 of *R. Solani* using multiple alignments of sequences with other reference sequences. The result was an amplification of 500 Pb. For specific amplification by conventional PCR of *R. Solani* AG-3 based on vegetable material. Isolates 030, 056 and ICA004 (AG2-1), there was no amplification, confirming that this group of anastomosis. The detection based on ground samples incubated 7 days and others 15 days, let see a band of the size that was being expected (500pb) using conventional PCR. The Quantification of *R. solani* AG3 Real-Time by using PCR Taq- Man from inoculated soil samples in the laboratory was able to detect a range that varied from 0.0058 ng/uL to 61.5 ng/μL, detects the presence of the pathogen in soil. The results that were shown let us conclude that there is a technique sensible enough for *R. Solani* AG-3 to be detected and that can be implemented as a control method of the fungus in production of seeds and area certification.

**Keywords:** Anastomosis groups, Molecular detection, rDNA, *R. solani*.

## INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades más recurrentes en tubérculos de papa es la rhizoctoniasis causada por el hongo *R. solani*, este hongo ataca a más de 250 especies de plantas. La enfermedad también reduce en forma importante el rendimiento comercial debido a que las plantas infectadas tienden a producir una gran cantidad de tubérculos deformes, con protuberancias y partiduras; además se forman esclerocios (“costra negra”) en la superficie de los tubérculos lo cual afecta su apariencia y calidad. El hongo sobrevive en el suelo como micelio en tejido en descomposición y como esclerocios en la superficie de tubérculos o en el suelo. Las zonas no codificantes (ITS1, ITS2 e IGS) son más variables porque acumulan mayor número de mutaciones y tienen gran interés en la identificación y tipificación de especies fúngicas. White *et al.* (1990) diseñaron y describieron cebadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADN mitocondrial y nuclear de hongos, lo que abrió la posibilidad de realizar estudios filogenéticos con el uso de estos genes. La diversidad intraespecífica en el ADN nuclear es común en hongos; en estudios de polimorfismo en esta región para varias especies fúngicas han mostrado que el ADN nuclear es adecuado para el análisis de la relación genética a nivel de género y especie (Kistler *et al.*, 1987; Klassen *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1992).

Varios métodos de identificación de *R. solani* AG-3 se han desarrollado algunos basados en pruebas inmunoenzimáticas (ELISA), (Thornton *et al.*, 1999) y otros exploran los adelantos de la biología molecular (Lees *et al.*, 2002 Budge *et al.*, 2009), últimamente se ha implementado el uso de marcadores moleculares para la diferenciación entre grupos de anastomosis presentes en *R. solani* los cuales son de interés práctico para el diagnóstico específico del hongo en programas de sanidad vegetal. La disponibilidad de pruebas diagnósticas simples y específicas es importante para las investigaciones de la ecología y epidemiología de los patógenos de plantas. La capacidad de detectar la presencia de un patógeno en particular en el cultivo o el suelo, para determinar los niveles de umbral de inóculo y para investigar la importancia relativa de las semillas y el inóculo transmitidas por el suelo, proporcionan información valiosa sobre las decisiones de manejo de las enfermedades. El objetivo de este trabajo fue implementar una prueba específica de detección molecular para *R. solani* AG-3 que permita la tipificación inequívoca de aislamientos AG-3, de esta manera poder utilizar el análisis como una herramienta cuantitativa para la detección del patógeno en el tejido de la planta y en el

suelo. Con el fin de desarrollar investigaciones en epidemiología del grupo AG-3 y poder hacer predicciones de incidencia de la enfermedad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Biológico**

Los aislamientos de *R. solani* utilizadas en este estudio fueron recolectados a partir del cultivo de papa en tres diferentes regiones de Colombia, los cuales fueron caracterizados por pruebas de compatibilidad vegetativa en trabajos anteriores (datos no mostrados) (Tabla 1).

### **Extracción de ADN**

*R. solani* se sembró en papa dextrosa agar acidificado con ácido tánico (PDA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 25°C durante 72 a 96 horas. La extracción de ADN a partir del micelio del hongo, se realizó con el protocolo propuesto por Goodwin y Lee, (1993) [11].

### **Análisis PCR-ITS 2 y secuenciamiento**

Los iniciadores universales ITS2 e ITS4 [25] fueron utilizados para la amplificación de la Secuencia Interna Transcrita (ITS B), la PCR fue realizada en mezclas de 25µl que contenían 160 µM de dNTPs, 5µl de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 300 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de BSA, 0.24 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) y 2µl de templado (50-100 ng/µl). Los ciclos de la PCR fueron realizados en un termociclador automatizado (PTC-200, MJ Research, INC., USA) bajo las condiciones: denaturalización inicial a 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min, y finalmente 72°C por 10 min. Después de la amplificación 5 µl de muestra fueron sujetos a electroforesis en gel de agarosa al 1,3% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) y corridos en buffer TAE 1X. El tamaño de los fragmentos amplificados fue determinado por un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt™, Invitrogen). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados por medio de luz ultravioleta. Posteriormente los productos de amplificación fueron secuenciados en un analizador de genes de Applied Biosystem®.

**Tabla 1.** Relación de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* estudiados.

N°	Código aislamiento	Procedencia	N°	Código aislamiento	Procedencia
1	001	Boyacá	26	070	Antioquia
2	002	Boyacá	27	073	Antioquia
3	003	Boyacá	28	074	Antioquia
4	004	Boyacá	29	075	Antioquia
5	012	Boyacá	30	078	Antioquia
6	014	Boyacá	31	080	Antioquia
7	019	Boyacá	32	084	Antioquia
8	021	Boyacá	33	100	Antioquia
9	023	Boyacá	34	ICA 002	Antioquia
10	024	Boyacá	35	105	Cundinamarca
11	026	Boyacá	36	114	Cundinamarca
12	028	Boyacá	37	115	Cundinamarca
13	030	Boyacá	38	116	Cundinamarca
14	031	Boyacá	39	121	Cundinamarca
15	034	Boyacá	40	125	Cundinamarca
16	036	Boyacá	41	126	Cundinamarca
17	037	Boyacá	42	129	Cundinamarca
18	038	Boyacá	43	144	Cundinamarca
19	051	Antioquia	44	176	Cundinamarca
20	053	Antioquia	45	181	Cundinamarca
21	054	Antioquia	46	190	Cundinamarca
22	055	Antioquia	47	198	Cundinamarca
23	056	Antioquia	48	199	Cundinamarca
24	062	Antioquia	49	ICA 003	Cundinamarca
25	069	Antioquia	50	ICA 004	Cundinamarca

### Utilización de iniciadores específicos para la detección de *R. solani* GA-3

Para la detección de este patógeno por PCR convencional fueron utilizados los iniciadores forward Rs1F2 5'-TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3' y reverse Rs2R1 5'-TATCACGCTGAGTGGAACCA-3' (Lees *et al.*, 2002). La PCR fue realizada utilizando Kit Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), bajo las siguientes condiciones; la PCR fue realizada en mezclas de 25µl que contenían 200 µM de dNTPs, 5µl de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 300 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de BSA, 0.24 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) y 2µl de templado (50-100 ng/µl). Los ciclos de la PCR fueron realizados en un termociclador automatizado (PTC-200, MJ Research, INC., USA) bajo las condiciones: denaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 45 min, 65°C por 1 min, 72°C por 1:30 min, y finalmente 72°C por 7 min.

### Detección de *R. solani* GA-3 a partir de muestras de suelo

Para la detección en suelo, se evaluó la habilidad de amplificar diversas concentraciones del patógeno, por lo cual fue utilizado el método de inoculación artificial de suelo. Se realizaron inoculaciones con discos de agar PDA de 1 cm de diámetro que contenían

micelio de *R. solani* GA-3 (aislamiento 062) en 30g de suelo estéril (autoclavado por 40 min) y llevados a incubadora por 7 y 15 días para permitir la diseminación del hongo en el suelo (Santos, 2009). Posteriormente se extrajo ADN con el kit Ultraclean™ Soil DNA de MoBio. El ADN fue amplificado mediante PCR convencional con los iniciadores Rs1F2/Rs2R1 Lees *et al.*, 2002), como se describió anteriormente. Se desarrolló una prueba de PCR en tiempo real utilizando iniciadores y sondas GA-3 específicos, siguiendo las siguientes condiciones de amplificación; la PCR fue realizada en mezclas de 25µl que contenían Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (INVITROGEN®), 10 µM de cada iniciador; forward Rs1F2 5'-TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3' y reverse RsTqR1 5'-AATTCCCCAACTGTCTCACAAGTT-3', 10 µM de la sonda Taq-Man™ fluorescente RQP1 (5'-TTTAGGCATGTGCACACCTCCCTCTTTC-3', etiquetada con el reportero FAM (6-carboxi-fluoresceína), el extremo 3' de la sonda fue modificado con un quencher TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina), (IDT®). Adicionar 2µl de templado de ADN (50-100 ng/µl). Los ciclos de la PCR fueron realizados en un termociclador automatizado (IQ5 BIORAD), siguiendo las siguientes condiciones: denaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 sec y 65°C por 45 sec.

### **Alineamiento de secuencias**

Para el análisis de máxima identidad se utilizó el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997), disponible en internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). El alineamiento de las secuencias se realizó con el software CLUSTAL X y BIO-EDIT. *Rhizoctonia oryzae* se incluyó como control externo en el presente estudio. (Fenille *et al.*, 2003).

## **RESULTADOS**

### **Amplificación y Secuenciación PCR-ITS 2**

Con la amplificación de la región ITS 2 se obtuvo un producto de 400 Pb. Este producto de amplificación fue secuenciado y utilizado para la identificación molecular de *R. solani*, para la verificación de su grupo de anastomosis correspondiente. El análisis preliminar de 50 secuencias, arrojó un valor promedio de máxima similitud con *Thanatephorus cucumeris* de 97% forma sexual para *Rhizoctonia solani*, comprobando por metodología molecular que los aislamientos correspondieron al hongo *R. solani*. Con estos hallazgos se procedió alinear secuencias para corroborar el grupo de anastomosis (Tabla 2).

Alineamiento de secuencias y determinación de Grupos de Anastomosis. Se logró determinar el posible GA a que pertenecían los 50 aislamientos, usando como parámetro la secuencia AF354107 (AG-3), disponible en el GENBANK, teniendo como referencia el porcentaje de máxima similitud que tenía cada aislamiento con dicha secuencia, y así determinar el GA correspondiente para cada aislamiento de *R solani*. De las 50 secuencias, 47 correspondieron al grupo GA-3 y tres restantes al grupo GA2-1 (Tabla 2).

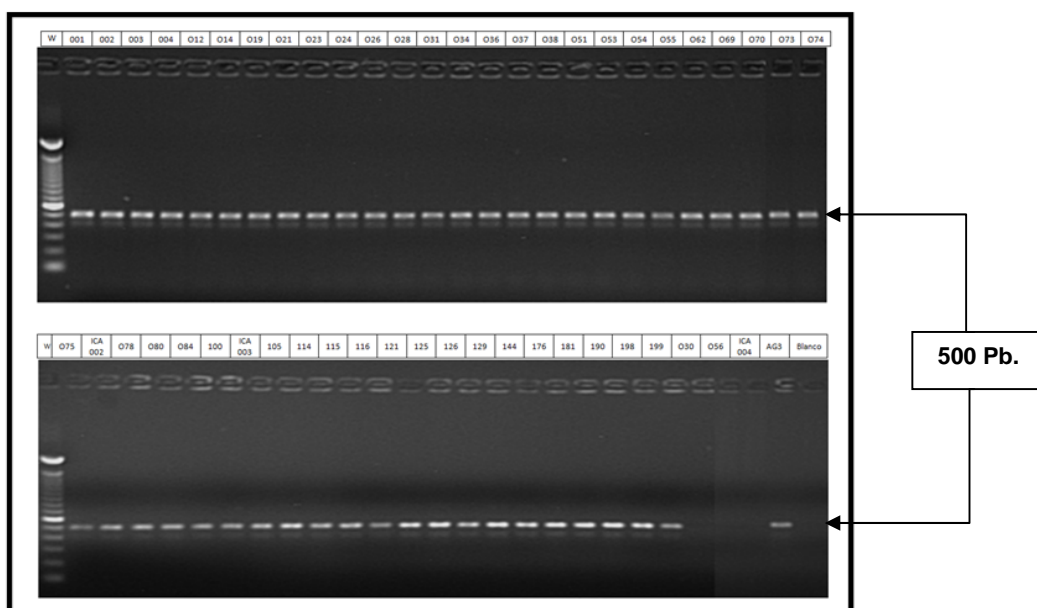
El aislamiento suministrado por la Universidad Nacional de Colombia-Facultad de agronomía fue codificado como Control GA-3 UNAL y presentó una máxima identidad del 99% y 98% con las accesiones AY387547 y AF354107, respectivamente. Estas accesiones corresponden al grupo GA-3 grupo que infecta papa, la accesión AY387547 tiene como origen geográfico a España y la AF354107 a México. El 86% (47 aislamientos) pertenecen al grupo AG-3, 9% (3 aislamientos) correspondieron al grupo AG2-1.

Tabla 2. Aislamientos pertenecientes a AG-3 positivos/negativos según el análisis de secuencias ITS-2 y porcentaje de máxima similitud comparados con el aislamiento AF354107 (AG-3) y DQ355130 (AG2-1).

N°	Código aislado	Máxima identidad	Procedencia	Grupo de Anastomosis	N°	Código aislado	Máxima identidad	Procedencia	Grupo de Anastomosis
1	001	97%	Boyacá	3	26	070	98%	Antioquia	3
2	002	98%	Boyacá	3	27	073	98%	Antioquia	3
3	003	96%	Boyacá	3	28	074	97%	Antioquia	3
4	004	97%	Boyacá	3	29	075	97%	Antioquia	3
5	012	98%	Boyacá	3	30	078	96%	Antioquia	3
6	014	97%	Boyacá	3	31	080	97%	Antioquia	3
7	019	97%	Boyacá	3	32	084	95%	Antioquia	3
8	021	96%	Boyacá	3	33	100	94%	Antioquia	3
9	023	95%	Boyacá	3	34	ICA 002	95%	Antioquia	3
10	024	96%	Boyacá	3	35	105	96%	Cundinamarca	3
11	026	98%	Boyacá	3	36	114	96%	Cundinamarca	3
12	028	96%	Boyacá	3	37	115	98%	Cundinamarca	3
13	030	96%	Boyacá	2-1	38	116	98%	Cundinamarca	3
14	031	97%	Boyacá	3	39	121	97%	Cundinamarca	3
15	034	98%	Boyacá	3	40	125	96%	Cundinamarca	3
16	036	96%	Boyacá	3	41	126	97%	Cundinamarca	3
17	037	95%	Boyacá	3	42	129	98%	Cundinamarca	3
18	038	96%	Boyacá	3	43	144	98%	Cundinamarca	3
19	051	98%	Antioquia	3	44	176	95%	Cundinamarca	3
20	053	97%	Antioquia	3	45	181	96%	Cundinamarca	3
21	054	98%	Antioquia	3	46	190	98%	Cundinamarca	3
22	055	97%	Antioquia	3	47	198	97%	Cundinamarca	3
23	056	96%	Antioquia	2-1	48	199	97%	Cundinamarca	3
24	062	97%	Antioquia	3	49	ICA 003	98%	Cundinamarca	3
25	069	98%	Antioquia	3	50	ICA 004	96%	Cundinamarca	2-1

### Detección de *R. solani* GA-3 por PCR convencional

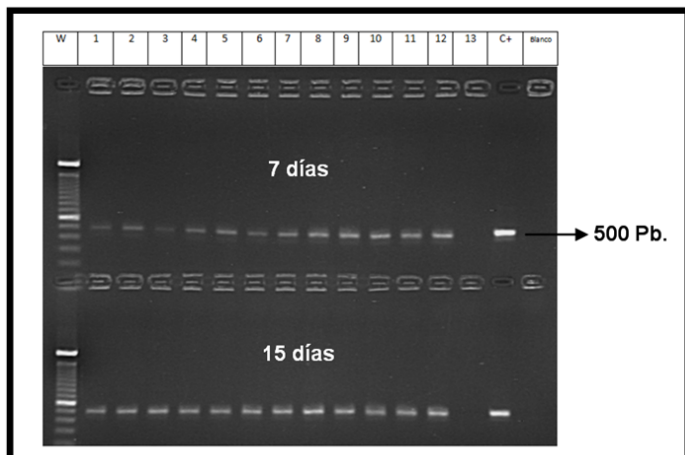
Para la detección del hongo, se obtuvo un producto de amplificación de 500 pb aproximadamente. Los aislados 030, 056 y ICA004 (Figura 1), caracterizados por secuenciación como *R. solani* AG2-1 (Chavarro *et al.*, 2007) no arrojan amplificación, confirmando con esto su grupo de anastomosis.



**Figura 1.** Amplificación por PCR con iniciadores específicos para la detección *R. solani* AG-3. Carriles 1-50; Aislamientos de *R. solani*. Carriles 51 y 52; control positivo y control blanco de la reacción respectiva.

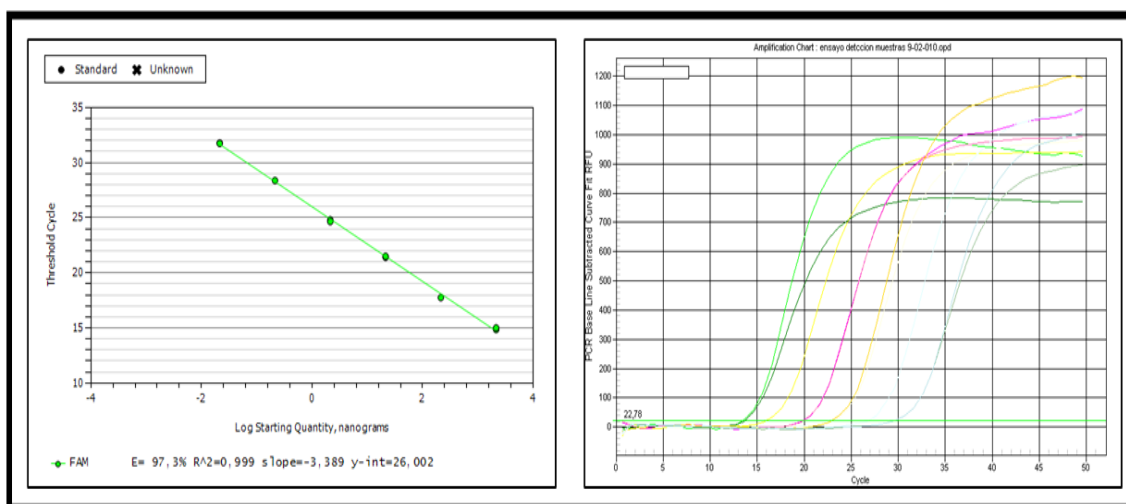
### Detección de *R. solani* GA-3 a partir de muestras de suelo

En la metodología de inoculación con discos tomada de Santos (2009) (Tabla 3), se observó la banda del tamaño esperado (500pb) (Figura 2), demostrando con esto la reproducibilidad de la técnica para detectar la presencia del patógeno en muestras de suelo. En la Figura 2, el primer peine corresponde a los suelos incubados a 7 días y el segundo peine a los suelos incubados a 15 días.



**Figura 2.** Amplificación PCR con iniciadores específicos para la detección *R. solani* AG3 a partir de muestras de suelos inoculados en el laboratorio.

La elaboración de los estándares para la curva de referencia en Tiempo Real se realizó a partir de un ADN diluido extraído de *R. solani* AG-3. La curva estandarizada tuvo un coeficiente de correlación de 0,999 y una eficiencia de 97%. Se observó que los estándares amplificaron entre los ciclos 15 y 30, a partir de esta curva se procedió a cuantificar los suelos inoculados artificialmente en el laboratorio (figura 3).



**Figura 3.** Curva estándar ng/ $\mu$ l de ADN obtenida por PCR en tiempo real para la cuantificación de *R. solani* AG3 a partir de muestras de suelo inoculados en el laboratorio.

Con el ensayo de PCR en tiempo real se confirmó los resultados obtenidos en PCR convencional. Las muestras amplificaron entre los ciclos 15 y 25, estando entre los rangos de la curva estándar, parámetro mediante el cual se puede cuantificar una determinada muestra, de esta manera, se logró detectar y cuantificar la presencia de *R. solani* a partir de muestras de suelo.

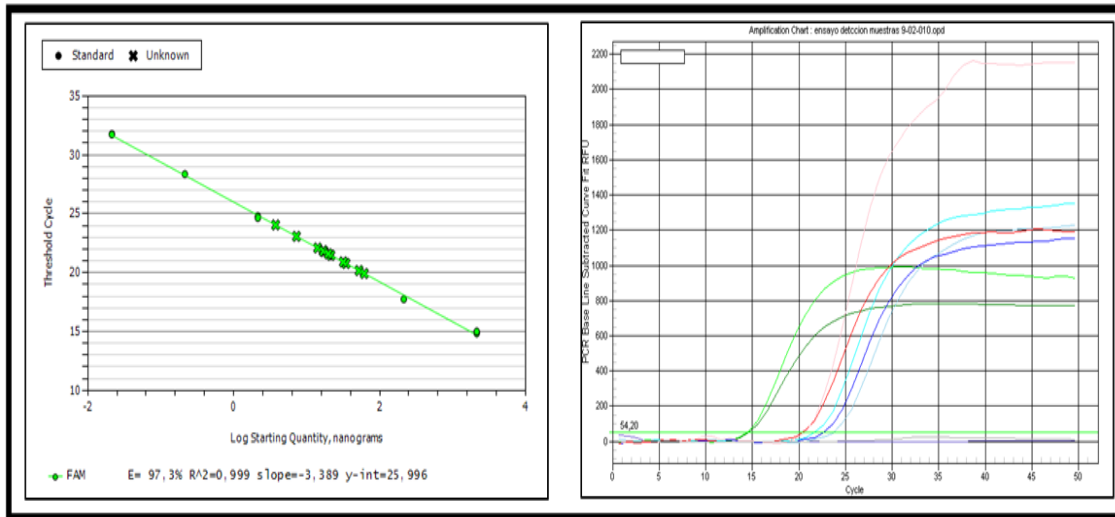


Figura 4. Cuantificación de *R. solani* AG3 a partir de muestras de suelos inoculados en el laboratorio mediante PCR en tiempo real.

La Cuantificación de *R. solani* AG3 mediante PCR en Tiempo Real Taq-Man a partir de muestras de suelos inoculados en el laboratorio, logró detectar un rango que osciló entre 0,0058 a 61,5 ng/ $\mu$ l de ADN del patógeno *R. solani* AG-3 (tabla 3). Cuando se emplean técnicas de baja sensibilidad como ELISA o PCR convencional para la detección de fitopatógenos en suelo; es necesaria la implementación de metodologías que permiten aumentar a niveles detectables los propágulos de los microorganismos presentes en el suelo. La PCR en tiempo real es una técnica altamente sensible, que combinada con un procedimiento de extracción de ADN que facilite la obtención de ácidos nucleicos de muy buena calidad y pureza, puede ser empleada de manera rutinaria para la detección de patógenos en suelo como *Rhizoctonia solani*, ya que permite detectar niveles de  $10^{-4}$  (Lees et al., 2002) y  $10^{-7}$  (Budge et al., 2009) g esclerocio/g suelo.

**Tabla 3.** Detección de *R. solani* GA-3 en suelos inoculados artificialmente y mantenidos en condiciones de laboratorio

Suelos Inoculados	Número de Discos	Ct	Concentración DNA (ng/ $\mu$ L)
1	1	36.94	$5.89 \times 10^{-2}$ ←
2	2	35.94	$1.60 \times 10^{-1}$
3	3	34.94	$2.74 \times 10^{-1}$
4	4	24.5	3.75
5	5	23.08	7.247
6	6	22.10	$1.41 \times 10^1$
7	8	21.84	$1.68 \times 10^1$
8	10	21.61	$1.97 \times 10^1$
9	12	21.48	$2.15 \times 10^1$
10	14	20.91	$3.17 \times 10^1$
11	18	20.18	$5.215 \times 10^1$
12	22	19.93	$6.15 \times 10^1$ ←
13	0	N/A	N/A

## DISCUSION

Thornton *et al.* (1999) desarrolla un método para detectar a *R. solani* en suelo utilizando un anticuerpo monoclonal doble ELISA, esta técnica detecta solamente el patógeno vivo en suelo, además no es específica para grupos de anastomosis. Adicionalmente, Bounou *et al.* (1999) desarrolló un método para la detección específica de *R. solani* AG3 diferenciando grupos de anastomosis por perfiles RAPD en conjunto con un método de mapeo de restricción basado en PCR, este método requiere para la diferenciación del grupo de anastomosis 3, la utilización de una enzima de restricción después de la amplificación con los iniciadores, igualmente no analizan la sensibilidad de la técnica de detección aplicada a muestras de suelo.

Aunque han sido desarrolladas otras técnicas para la detección del patógeno, la metodología aquí aplicada permite detectar de manera simple y específica por medio de PCR convencional a *Rhizoctonia solani* AG3 dentro de 14 grupos de anastomosis

(Carling *et al.*, 2002), lo cual es importante para la detección temprana del patógeno, producción de semillas limpias y estudios de dispersión geográfica del hongo.

Recientemente se han desarrollado otras técnicas más sensibles para la detección del patógeno. Lees *et al.* (2002) obtiene una sonda Taqman<sup>TM</sup> para la detección de *R. solani* AG3 en suelo por PCR en Tiempo Real detectando hasta  $5 \times 10^{-4}$  g esclerocio/g suelo; aunque el protocolo utilizado para la extracción de ADN de suelo trabaja con 10 g de la muestra, puede que la calidad del ADN extraído sea baja y contenga sustancias inhibitoras de la PCR como ácidos húmicos o partículas de arcilla; por lo cual recomiendan la utilización de kits comerciales para la extracción de ADN a partir de muestras de suelo. La PCR en tiempo real es una técnica sensible capaz de detectar niveles de inóculo muy bajos a partir de muestras naturales principalmente suelo, esto hace muy importante para el establecimiento de programas de manejo y control de enfermedades. Con el desarrollo de técnicas específicas y sensibles, como son los ensayos de PCR-específica y PCR en tiempo real para la detección de *R. solani* AG-3, ahora puede llevarse a cabo estudios de la epidemiología de la enfermedad de esta manera poder responder a las siguientes preguntas: (1) la distribución del hongo en el suelo; (2) las estrategias de muestreo adecuado para pruebas de diagnóstico, y (3) la importancia relativa de las semillas y la presencia de inóculo en el suelo, causantes de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anderson NA, 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology* 65, 994–8.
2. Anguiz R, Martin C, 1989. Anastomosis groups, pathogenicity and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potato in Peru. *Plant Disease* 73, 199–201.
3. Balali GR, Neate SM, Scott ES, Whisson DL, Wicks TJ, 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in south Australia. *Plant Pathology* 44, 1050–7.
4. Balali GR, Whisson DL, Scott ES, Neate SM, 1996. DNA fingerprinting probe specific to isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Mycological Research* 100, 467–70.

- 
5. Banville GJ, 1989. Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *American Potato Journal* 66, 821–34.
  6. Bell KS, Claxton JR, Roberts J, Cullen DW, Williams NA, Harrison JG, Toth IK, Cooke DEL, Duncan JD, 1999. Detection and quantification of *Spongospora subterranean* f. sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. *European Journal of Plant Pathology* 105, 905–15.
  7. Bounou S, Jabaji-Hare SH, Hogue R, Charest PM, 1999. Polymerase chain reaction based assay for specific detection of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates. *Mycological Research* 103, 1–8.
  8. Budge, G. E. *et al.*, 2009. Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathology* 58, 1071–1080.
  9. Carling DE, Rothrock CS, MacNish GC, Sweetingham MW, Brainard KA, Winters SW, 1994. Characterisation of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 84, 1387–93.
  10. Carling, D. E. *et al.*, 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *The American Phytopathological Society* Vol. 92, No. 8.
  11. Chand T, Logan C, 1983. Cultural and pathogenic variation in potato isolates of *Rhizoctonia solani* in Northern Ireland. *Transactions of the British Mycological Society* 81, 585–9.
  12. Cullen DW, Hirsch PR, 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 983–93.
  13. Cullen DW, Lees AK, Toth IK, Bell KS, Duncan JM, 2000. Detection and quantification of fungal and bacterial potato pathogens in plants and soil. *EPPO Bulletin* 30, 485–8.
  14. Cullen DW, Lees AK, Toth IK, Duncan JM, 2001. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology* 107, 387–98.

15. Cullen DW, Lees AK, Toth IK, Duncan JM, 2002. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional PCR and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* 51, 281–92.
16. Duncan S, Barton JE, O'Brien PA, 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycological Research* 97, 1075–82.
17. Fenille, Roseli, et al., 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* Associated with Soybean in Brazil by rDNA-ITS Sequences. *Fitopatologia Brasileira* 28:413-419.
18. Hide GA, Horrocks JK, 1994. Influence of stem canker (*Rhizoctonia solani* Kuhn) on tuber yield, tuber size, reducing sugars and crisp colour in cv. Record. *Potato Research* 37, 43–9.
19. Hide GA, Welham SJ, Read PJ, Ainsley AE, 1996. The yield of potato plants as affected by stem canker (*Rhizoctonia solani*), blackleg (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) and by neighbouring plants. *Journal of Agricultural Science* 126, 429–40.
20. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R, 1992. ClustalV-improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences* 8, 189–91.
21. Jabaji-Hare SH, Meller Y, Gill S, Charest PM, 1990. Investigations of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12, 393–404.
22. Kistler, h. C.; p. W. Bosland; u. Benny; s. Leong; p. H. Williams. 1987. Relatedness of Strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers Measured by Examination of Mitochondrial and Ribosomal DNA. *Phytopathology* 77:1289-1293.
23. Klassen, g. R.; s. A. McNabb; m. W. Dick. 1987. Comparison of Physical Maps of Ribosomal DNA Repeating Units in *Pythium*, *Phytophthora* and *Apodachya*. *J. Gen. Microbiol.* 133:2953-2959.
24. Lees, A. K. et al., 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*. 51, 293–302

- 
25. Liu, z. L.; sinclair, j. B. Y chen, w. 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* 82: 778-787.
  26. Mazzola M, Wong OT, Cook RJ, 1996. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *Rhizoctonia solani* AG-8 on wheat and detection of *Rhizoctonia oryzae* in plant tissue by PCR. *Phytopathology* 86, 354–60.
  27. Neate SM, Cruickshank RH, Rovira AD, 1988. Pectic enzyme patterns of *Rhizoctonia solani* isolates from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 90, 37–42.
  28. Neate SM, Warcup JH, 1985. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in
  29. South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 85, 615–20.
  30. Parmeter JR, Sherwood RT, Platt WD, 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59, 1270–8.
  31. Reynolds M, Weinhold AR, Morris TJ, 1983. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Phytopathology* 73, 903–6.
  32. Sweetingham MW, Cruickshank RH, Wong DH, 1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathology of the Ceratobasidiaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 86, 305–11.
  33. Thornton CR, O'Neill TM, Hilton G, Gilligan CA, 1999. Detection and recovery of *Rhizoctonia solani* in naturally infested glasshouse soils using a combined baiting, double monoclonal antibody ELISA. *Plant Pathology* 48, 627–34.
  34. Vilgalys R, Gonzalez D, 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 80, 151–8.
  35. White, t. J.; t. Bruns; s. Lee; j. W. Taylor. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego. Academic Press, pp. 315-322.

## 2. Capítulo 2

### TÍTULO:

**“Análisis de una secuencia parcial ITS-2 de *Rhizoctonia solani* GA-3 en regiones de Colombia productoras de papa”**

### RESUMEN

Actualmente el complejo *Rhizoctonia solani* se divide en 14 grupos de anastomosis (AG1 al AG13 y AG-BI) (Carling et al. 2002). El GA-3 es el agente causal de la rhizoctoniasis siendo el grupo de anastomosis más recurrente en tubérculos de papa. El análisis de una secuencia parcial de ADN para la región del Espaciador Transcrito Interno 2 (ITS-2) se utilizó para estudiar la variabilidad genética de 121 secuencias de *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani*). Basado en el análisis comparativo de secuencias, se demostró que gran parte de los aislamientos pertenecían al grupo de anastomosis tres subgrupo tipo papa (AG-3 PT), y algunos fueron AG2-1. Se observó baja variabilidad en la región del ITS-2, pero permite de forma rápida y confiable poder detectar el grupo de anastomosis que se pretende identificar. Las secuencias de ITS no dieron resolución en ramas basales del cladaograma, Sin embargo, hay clados internos de gran robustez como el de AG-3 TB y el de AG-3 PT con valores de 100 y 95. *R. solani* no constituye un grupo monofilético. Se propone realizar análisis filogenéticos con las secuencias de la región ITS y parte del 28S del ADN ribosomal, y para apoyar cualquier decisión taxonómica que se haga en la clasificación de *R. solani*, actualmente se está adicionando caracteres del gen beta-tubulina a la matriz de secuencias del ADN ribosomal, con el objetivo de definir especies distintas (Gonzalez, 2002).

**Palabras claves:** Secuencia ITS-2, AG-3 (PT), reconstrucciones filogenéticas.

---

**"Analysis of a partial sequence ITS-2 of *Rhizoctonia solani* AG-3 in regions of Colombia producing potatoes"**

**ABSTRACT**

At present, the complex of *Rhizoctonia solani* is divided in 14 groups of anastomosis (AG1 al AG13 y AG-BI) (Carling et al. 2002). The GA-3 is the agent the causes rhizoctoniasis being this most frequent group of anastomosis in potatoes. The analysis of a partial sequence of DNA for the Internal transcribed spacer 2 region (ITS-2) was used to study the genetic variability of 121 sequences of *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani*). Based on the comparative analysis of sequences, it was demonstrated that a great part of the isolates belonged to the anastomosis 3 subgroup Potato Type (AG-3 PT), while some others were AG2-1. Low variability was seen in the region of ITS-2. But this is enough and quickly allows to detect the anastomosis group that is supposed to be found and identified. The ITS sequences did not provide resolution in the basal branches of the cladogram, however, there were robust internal clades as the AG-3 TB and the AG-3 PT with values of 100 and 95. *R. solani* was not a monophyletic group. Instead it was proposed to realize a phylogenetic analysis with the ITS region sequences and with a part of 28S Ribosomal DNA. To support any taxonomic decision taken during the classification of *R. solani*, at present some special characteristics of the gene beta-tubulin is being added to the matrix of DNA ribosomal sequences, to define different species (Gonzalez, 2002).

**Keywords:** Anastomosis groups, Molecular detection, rDNA, ITS-2.

## INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades más recurrentes en tubérculos de papa es la rhizoctoniasis causada por el hongo *R. solani*, este hongo ataca a más de 250 especies de plantas y está presente en muchas áreas productoras de papa afectando el desarrollo del cultivo ya que bajo condiciones ambientales frías y húmedas, después de la siembra la rhizoctoniasis puede afectar el desarrollo de la planta. Diferentes investigadores utilizan la secuenciación directa del ADNr nuclear para dilucidar las relaciones filogenéticas entre diversos organismos del complejo *Rhizoctonia* (Boysen *et al.*, 1996; Kuninaga *et al.*, 1997; Roberts, 1999; Salazar *et al.*, 1999; 2000; González *et al.*, 2001; 2002; 2006b; Carling *et al.*, 2002a). Con el desarrollo alcanzado en las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la automatización del proceso de secuenciación es posible y sencillo amplificar y estudiar la variación en la secuencia del ADNr en el nivel taxonómico deseado. La secuencia del ADNr puede brindar información y alto nivel de resolución de las diferencias genéticas entre especies de *Rhizoctonia*. Las regiones ITS son secuencias de ADN altamente específicas, que se encuentran entre los genes que codifican para el RNA ribosomal. Estas regiones son utilizadas en el estudio de poblaciones puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener una buena información filogenética y taxonómica de los individuos (Liu *et al.*, 1992).

En este estudio se compararon secuencias parciales ITS-2 de *R. solani* AG-3 obtenidas en tres regiones de Colombia productoras de papa, mediante una búsqueda en el banco de genes del NCBI, se logró comparar estas secuencias Colombianas con secuencias de *R. solani* de diferentes zonas geográficas del mundo. Realizando reconstrucciones hipotéticas de su filogenia, encontrando poca variabilidad en esta secuencia pero de gran interés práctico para la clasificación de grupos de anastomosis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Los aislamientos de *R. solani* utilizados en este estudio fueron recolectados a partir del cultivo de papa en tres diferentes regiones de Colombia, los cuales fueron caracterizados por pruebas de compatibilidad vegetativa e identificación molecular en trabajos anteriores (datos no mostrados), se obtuvo un total de 121 secuencias; 96 secuencias pertenecientes a regiones Colombianas y 26 secuencias restantes de distintas regiones

del mundo disponibles en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information-NCBI (Tabla 1).

### Extracción de ADN

*R. solani* se sembró en papa dextrosa agar acidificado con ácido tánico (PDA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 25°C durante 72 a 96 horas. La extracción de ADN a partir del micelio del hongo, se realizó con el protocolo propuesto por Goodwin y Lee, (1993) [11].

### Análisis PCR-ITS 2

Los iniciadores universales ITS3 e ITS4 [25] fueron utilizados para la amplificación de la Secuencia Interna Transcrita (ITS B), la PCR fue realizada en mezclas de 25µl que contenían 160 µM de dNTPs, 5µl de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 300 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de BSA, 0.24 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) y 2µl de templado (50-100 ng/µl). Los ciclos de la PCR fueron realizados en un termociclador automatizado (PTC-200, MJ Research, INC., USA) bajo las condiciones: denaturalización inicial a 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min, y finalmente 72°C por 10 min. Después de la amplificación 5 µl de muestra fueron sujetos a electroforesis en gel de agarosa al 1,3% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) y corridos en buffer TAE 1X. El tamaño de los fragmentos amplificados fue determinado por un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt™, Invitrogen). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados por medio de luz ultravioleta.

**Tabla 1.** Relación de los aislamientos Colombianos de *Rhizoctonia solani* estudiados.

N°	Código aislamiento	Procedencia	N°	Código aislamiento	Procedencia	N°	Código aislamiento	Procedencia
1	001	Boyacá	42	051	Antioquia	83	125	Cundinamarca
2	002	Boyacá	43	052	Antioquia	84	126	Cundinamarca
3	003	Boyacá	44	053	Antioquia	85	129	Cundinamarca
4	004	Boyacá	45	054	Antioquia	86	176	Cundinamarca
5	006	Boyacá	46	055	Antioquia	87	181	Cundinamarca
6	007	Boyacá	47	056	Antioquia	88	190	Cundinamarca
7	008	Boyacá	48	057	Antioquia	89	191	Cundinamarca
8	009	Boyacá	49	058	Antioquia	90	192	Cundinamarca
9	010	Boyacá	50	060	Antioquia	91	193	Cundinamarca

10	011	Boyacá	51	069	Antioquia	92	194	Cundinamarca
11	012	Boyacá	52	070	Antioquia	93	195	Cundinamarca
12	015	Boyacá	53	074	Antioquia	94	198	Cundinamarca
13	016	Boyacá	54	075	Antioquia	95	199	Cundinamarca
14	017	Boyacá	55	076	Antioquia	96	200	Cundinamarca
15	018	Boyacá	56	077	Antioquia	97	AF354107	México
16	019	Boyacá	57	078	Antioquia	98	DQ913031	Finlandia
17	020	Boyacá	58	083	Antioquia	99	AY387572	Holanda
18	021	Boyacá	59	084	Antioquia	100	AB019020	Japón
19	024	Boyacá	60	085	Antioquia	101	AB019012	Estados Unidos
20	026	Boyacá	61	086	Antioquia	102	AB019017	Estados Unidos
21	027	Boyacá	62	087	Antioquia	103	AF153771	Estados Unidos
22	028	Boyacá	63	088	Antioquia	104	AB000005 (AG-3 TB)	Estados Unidos
23	029	Boyacá	64	089	Antioquia	105	AB000002 (AG-3 TB)	Estados Unidos
24	030	Boyacá	65	090	Antioquia	106	AF153774 (AG-3 TB)	Estados Unidos
25	031	Boyacá	66	092	Antioquia	107	AY154319 (AG-3 TB)	Brasil
26	032	Boyacá	67	093	Antioquia	108	AB000004 (AG-3 TB)	Japón
27	034	Boyacá	68	095	Antioquia	109	AF153772	Rusia
28	035	Boyacá	69	096	Antioquia	110	AB019014	Sur África
29	036	Boyacá	70	097	Antioquia	111	AY387525	Marruecos
30	037	Boyacá	71	098	Antioquia	112	AB019023	Australia
31	039	Boyacá	72	099	Antioquia	113	AY387568	España
32	040	Boyacá	73	100	Antioquia	114	AY387547	España
33	041	Boyacá	74	101	Cundinamarca	115	AY387539	España
34	042	Boyacá	75	105	Cundinamarca	116	AY387548	España
35	043	Boyacá	76	111	Cundinamarca	117	AB000029 (AG1-1C)	Japón
36	044	Boyacá	77	113	Cundinamarca	118	AB000016 (AG1-1A)	Japón
37	045	Boyacá	78	114	Cundinamarca	119	AF153806 (AG-12)	Australia
38	046	Boyacá	79	116	Cundinamarca	120	DQ355130 (AG-2)	Reino Unido
39	048	Boyacá	80	118	Cundinamarca	121	Control AG3-UNAL	UNAL
40	049	Boyacá	81	121	Cundinamarca			
41	050	Boyacá	82	122	Cundinamarca			

### Análisis de los datos

El alineamiento de las secuencias se realizó con los programas MEGA 4 Versión 4.0, utilizando la subrutina CLUSTAL W, y el programa Sequencher, Versión 5.0. Para los análisis de distancias genéticas y reconstrucciones filogenéticas por Máxima Parsimonia-MP Se utilizó el MEGA 4 Versión 4.0 y el PAUP (Swofford, 2002). Versión 4.0. (Fenille

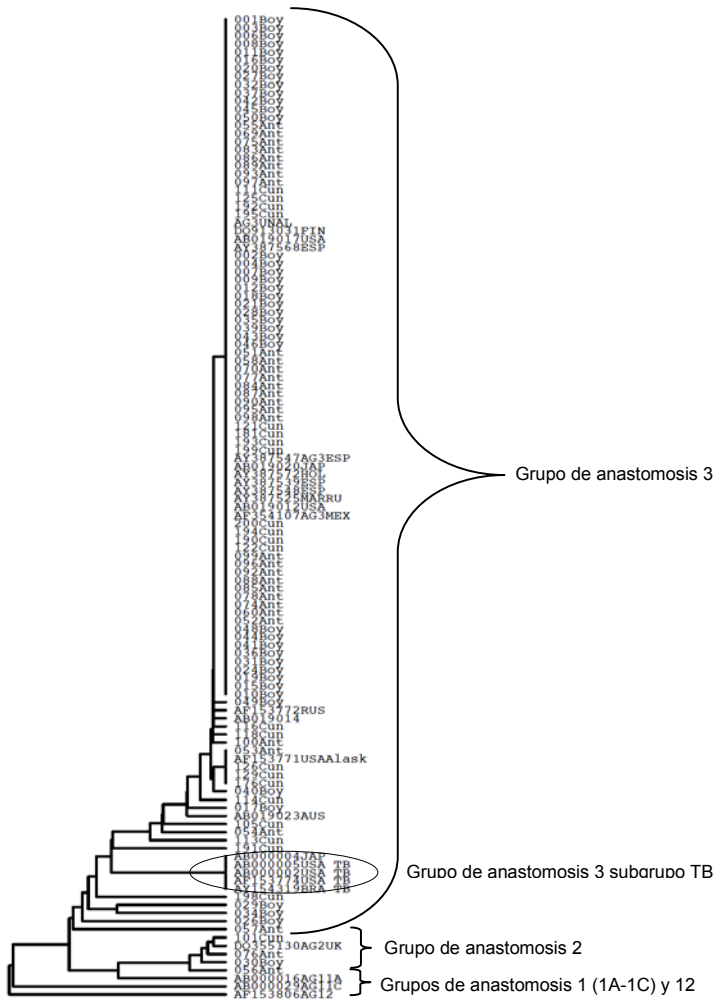
et al., 2003). Un dendrograma de similaridad fue construido mediante el algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) con un bootstrap de 10000 replicas, con el programa PAUP (Swofford, 2002). Versión 4.0. Otro análisis de distancias se realizó con el Método neighbor-joining con un bootstrap de 1225 replicas, las distancias genéticas se calcularon utilizando el parámetro de Kimura 2 mediante el programa MEGA 4 Versión 4.0, estos métodos de agrupamiento se generan a partir de una matriz de distancia, por lo que revela un árbol fenético o dendrograma de similaridad. Las hipótesis filogenéticas se realizaron con los mismos programas y los siguientes parámetros; A) Método Close-Neighbor-Interchange algorithm con un bootstrap de 1225 replicas, mediante el programa MEGA 4 Versión 4.0. y B) Análisis de Máxima Parsimonia, mediante el software PAUP (Swofford, 2002). Versión 4.0.

## RESULTADOS

### **El análisis de la secuencia parcial ITS-2 demostró una alta homología para los aislamientos pertenecientes al grupo de anastomosis 3 subgrupo PT**

La región ITS-2 varió desde un 99,7 hasta 100%, esto la convierte en una región poco variable y con pocos cambios en posiciones de nucleótidos. Los alineamientos muestran alta homología de secuencia, poco atractiva para los análisis de reconstrucciones filogenéticas pero de gran utilidad para la identificación molecular de grupos de anastomosis al interior del complejo *R solani*. El alineamiento múltiple, permite inferir inicialmente, que estos aislamientos presentan gran variabilidad intraespecífica a nivel de grupo de anastomosis AG-3, los aislamientos 030Boy, 056Ant, 076Ant y 101Cun, corresponden al grupo AG2-1 evidencian también gran diversidad en su secuencia. Finalmente el alineamiento permitió visualizar poca variabilidad al interior de la secuencia de los aislamientos AG-3 pertenecientes a Colombia de igual manera que los aislamientos correspondientes a otras regiones geográficas distribuidas alrededor del mundo. Es importante resaltar que los aislamientos AG-3 (TB) se encuentran afectando tabaco naturalmente, pero filogenéticamente presentan variaciones moleculares que los ubica en clados distintos en comparación de su grupo hermano AG-3 PT cuyo hospedero natural es la papa. El árbol dendrograma deja ver claramente la formación de dos clados, donde se agrupan las secuencias de AG-3 PT (papa) y las secuencias de AG-3 TB (tabaco) con un índice de soporte de 95 y 99 para cada agrupamiento. Un tercer clado que contiene las tres secuencias de AG2-1 y el control (DQ355130AG2-UK) soportado

por un índice de soporte de 91, finalmente el cuarto clado el cual agrupó las secuencias que se utilizaron como controles externos en el presente estudio, estas secuencias corresponden a *R. solani* AG-1 (1A-1C) y AG12 (Figura 1). Estos resultados preliminares muestran poca variabilidad intraespecífica al interior del grupo de anastomosis AG-3 o politomías sin resolver hacia las ramas terminales del árbol, pero puntos variables en comparación con los grupos de anastomosis AG-2, AG-1 y AG-12, de tal manera, que los aislamientos no se diferencian o agrupan según la población geográfica de origen, si no que presentan características genéticas únicas para cada individuo, pero a su vez se agrupan por diferenciación de grupo de anastomosis. De manera preliminar estos hallazgos permiten dilucidar la variabilidad genética de la región ITS-2 en nuestras poblaciones colombianas del hongo.



**Figura 1.** Árbol fenético de distancias genéticas para las 121 secuencias. Método UGPMa con un bootstrap de 1225 replicas, mediante el Programa PAUP (Swofford, 2002). Version 4.0.

**Se seleccionaron las secuencias de los aislamientos pertenecientes al grupo AG3-PT que presentaron cambios en sus nucleótidos, comparandolas con otras secuencias de referencia**

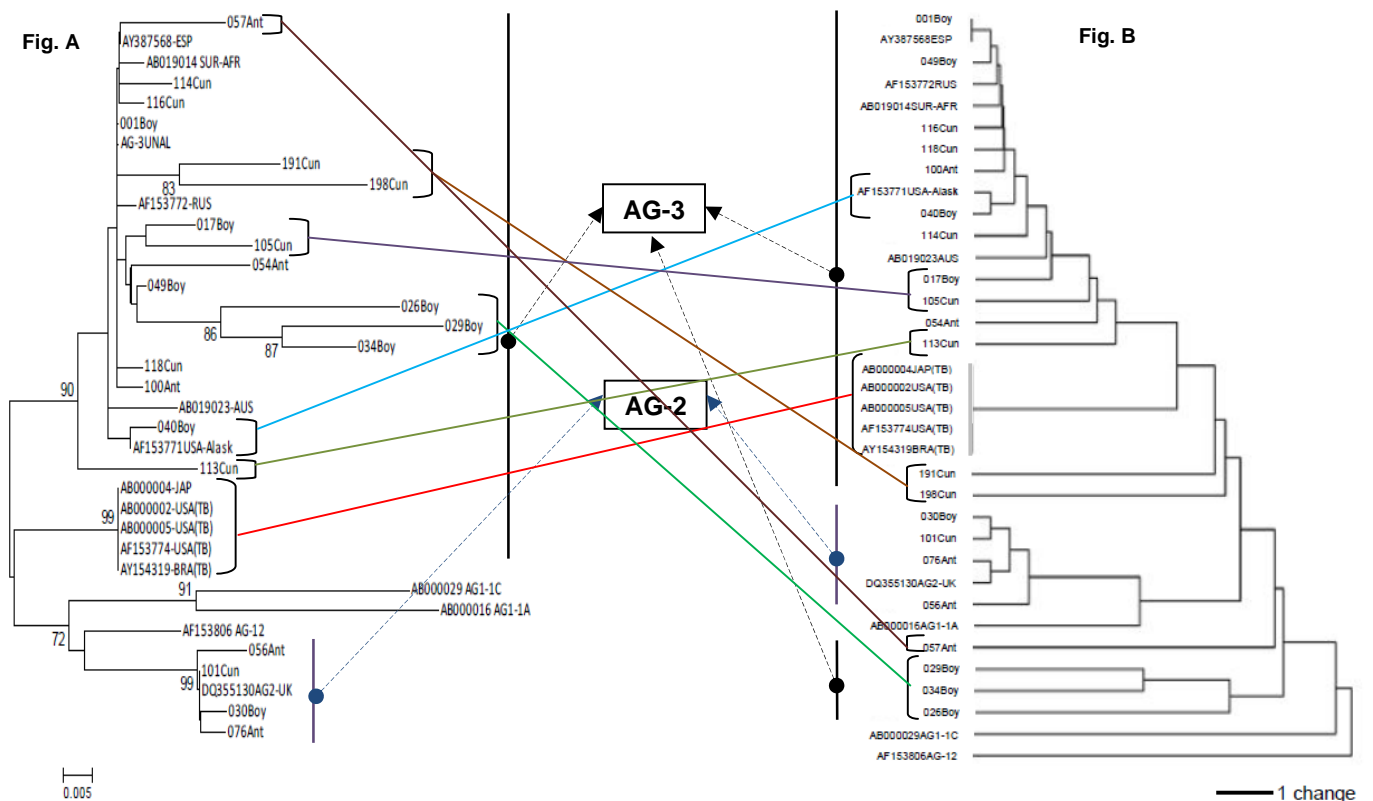
El análisis de distancias y su correspondiente dendrograma muestra que hay 36 secuencias diferentes (haplotipos) entre las 121 secuencias en total. Dicho árbol se muestra en la figura 1. Puesto que muchas secuencias son idénticas, se decidió en aquellos casos escoger una secuencia que representara ese haplotipo en particular, minimizando el análisis a solamente las secuencias variables, en la tabla 2 se ilustra las secuencias escogidas.

**Tabla 2.** Secuencias variables escogidas para los análisis de distancias genéticas y máxima parsimonia.

N°	Código aislamiento	Procedencia	N°	Código aislamiento	Procedencia
1	1	Boyacá	19	118	Cundinamarca
2	17	Boyacá	20	191	Cundinamarca
3	26	Boyacá	21	198	Cundinamarca
4	29	Boyacá	22	AY387568	España
5	30	Boyacá	23	AF153772	Rusia
6	34	Boyacá	24	AB019014	Sur África
7	40	Boyacá	25	AF153771	Estados Unidos
8	49	Boyacá	26	AB019023	Australia
9	54	Antioquia	27	AB00004	Japón
10	56	Antioquia	28	AB00005	Estados Unidos
11	57	Antioquia	29	AB00002	Estados Unidos
12	76	Antioquia	30	AF153774	Estados Unidos
13	100	Antioquia	31	AY154319	Brasil
14	101	Cundinamarca	32	DQ355130	Reino Unido
15	105	Cundinamarca	33	AB000016	Japón
16	113	Cundinamarca	34	AB000029	Japón
17	114	Cundinamarca	35	AB153806	Australia
18	116	Cundinamarca	36	Control AG3-UNAL	UNAL

El primer análisis evalúa las distancias genéticas entre aislamientos. En este caso se utilizó la diferencia entre pares de secuencias usando la distancia absoluta entre accesiones para las 36 secuencias distintas (figura 2). La matriz de distancia muestra dos aspectos, el primero sugiere distancias entre 1 y 12% para comparaciones dentro de Colombia o muestras colombianas y del resto del mundo. En este caso no hay una

tendencia alguna en cuanto a la magnitud de la variación, por ejemplo entre muestras de Colombia (Ant056 y la de Reino Unido) hay sólo 1% de diferencia, mientras que entre 0,17Boy y 0,30Boy hay un 7% de diferenciación. Con la comparación de los dendrogramas de similitud mediante los métodos de agrupamiento de neighbor-joining y UGPM (figura 2 A y B), con dos programas distintos para los análisis, se logró en su mayoría recuperar los clados presentes en ambos arboles lo cual confirma la consistencia de los datos y la relación genética intraespecífica entre los aislamientos estudiados. Observándose 3 grandes agrupamientos; el primer grupo contenía todas las secuencias pertenecientes al grupo de anastomosis 3, un segundo grupo conformado por el grupo de anastomosis 2, y el último o tercero donde se agrupan los grupos de anastomosis 1 (1A-1C) y 12, de la misma manera como se observó en el primer análisis de distancias para el total de las secuencias, ver la figura 1. Un total de 7 subclados fueron recobrados (figura 2 A y B), los cuales contenían los aislamientos más diversos genéticamente



**Figura 2.** Árbol fenético de distancias genéticas para los 36 secuencias variables (ITS-2). **A)** Método neighbor-joining-Kimura 2 con un bootstrap de 1225 replicas, mediante el software MEGA 4 Versión 4.0. **B)** Método UGPM con un bootstrap de 1225 replicas, mediante el software PAUP (Swofford, 2002). Versión 4.0.

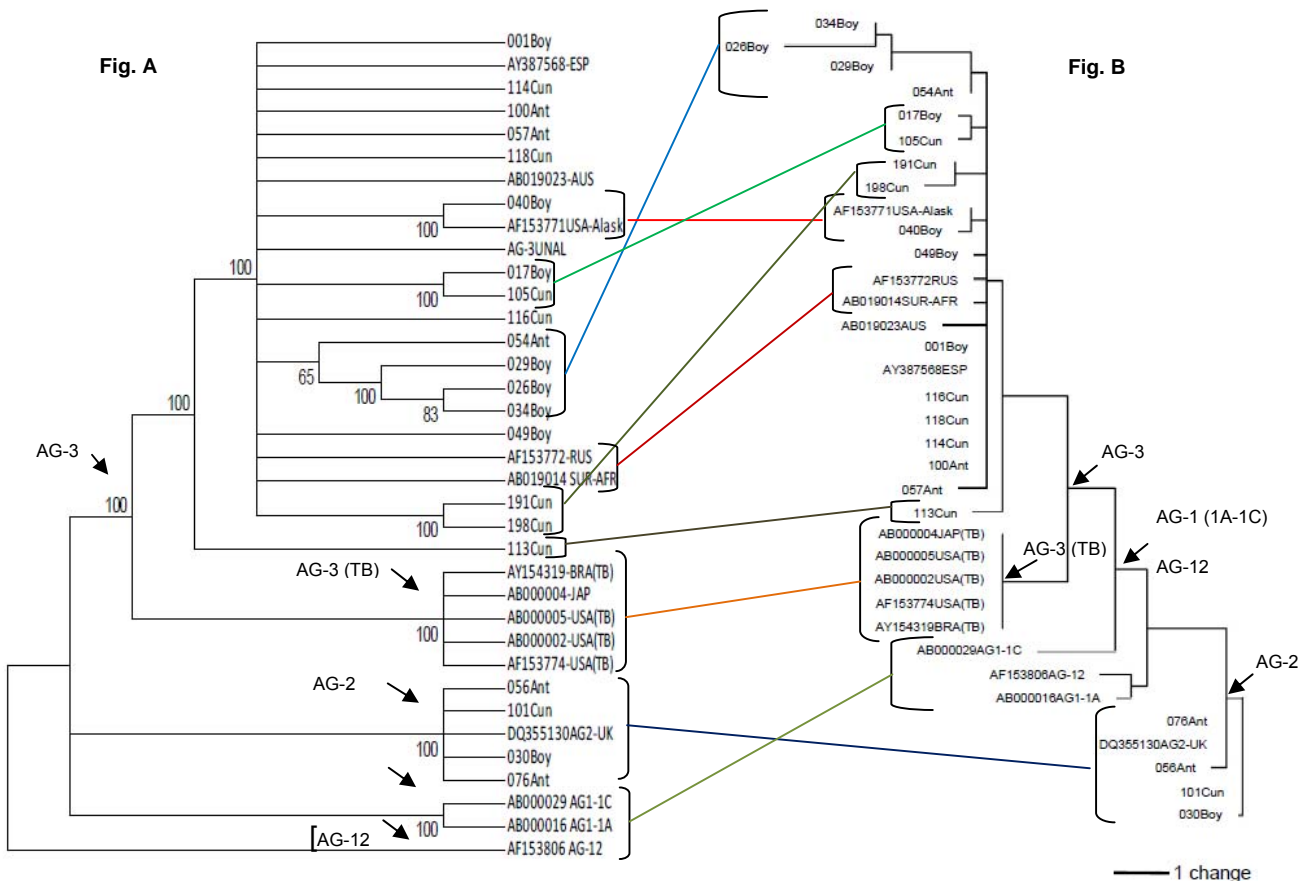
El método de distancia construye un árbol basado en una simple magnitud numérica y no tiene como tal un método de reconstrucción filogenética, se utilizó el método de Máxima Parsimonia para construir un árbol filogenético. El método de MP construye el árbol basado en caracteres (en este caso AGCT) que sean compartidos por varios miembros del grupo de estudio, construyendo diferentes agrupaciones que difieren en el número de caracteres compartidos. Es posible que haya más de un árbol igualmente parsimonioso bajo este criterio, lo que indica que biológicamente es posible tener las distintas alternativas de árboles. El análisis construyó 480 árboles igualmente parsimoniosos, cuyo consenso del 50% fue construido y se muestra en la Figura 3 A y B. Existe agrupaciones con buenos soportes lo cual confirma la estabilidad de los árboles filogenéticos obtenidos (Figura 3 A y B). Se mapearon los caracteres (nucleótidos) variables en la filogenia resultante y determinar la naturaleza de esos cambios. Un total de 56 posiciones fueron variables, de las cuales 27 fueron transiciones y 29 fueron transversiones (Tabla 3). La frecuencia de transiciones es similar para los dos tipos ( $A \leftrightarrow G$ , y  $C \leftrightarrow T$ ), sin embargo la transversión  $T \leftrightarrow A$  fue más frecuente relativo a las demás.

**Tabla 3.** Nucleótidos variables en la filogenia resultante con MP en accesiones de *R solani*.

Substitución	Tipo	Número	Total	Posiciones en ITS
Transiciones	$A \leftrightarrow G$	13	27	3,45,115,133,165,166,171,176,180, 194,240,252,258
	$C \leftrightarrow T$	14		37,52,66,76,151,153,167,201,223, 237,238,239,247,257
	$T \leftrightarrow A$	14		1,2,22,67,69,70,134,146,158,178, 183,186,196,211
Trasversiones	$A \leftrightarrow C$	9	29	50,190,200,224,241,246,250,251,260
	$T \leftrightarrow G$	3		199,256,242
	$C \leftrightarrow G$	3		169,232,236

Se comparó dos topologías para las hipótesis filogenéticas obtenidas con distintos programas computacionales (figura 3 A y B), (ver métodos), el análisis de filogenia MP presentó buenos soportes Bootstrap para 1125 replicas, se observó un ancestro común para el grupo de anastomosis 3 siendo un grupo monofilético soportado por un índice de 100, no obstante el grupo AG3-TB resultó ser parafiletico respecto a su grupo hermano AG3-PT, de igual manera la secuencia 113 de Cundinamarca-Colombia presentó un comportamiento similar aunque pertenece al grupo AG-3. Son consistentes los clados para ambas topologías recuperándose 9 subclados

cuando se compararon los dos análisis (figura 3 A y B) de MP. Evidentemente el complejo de *R. solani* no es un grupo monofilético si no parafilético, como se muestra en los árboles filogenéticos cuando se comparan con distintos grupos de anastomosis pertenecientes a la misma especie, de tal manera que *R. solani* se le considera como un complejo de especies.



**Figura 2.** Hipótesis filogenética Máxima Parsimonia (MP) para los 36 secuencias variables (ITS-2). **A)** Árbol consenso. Método Close-Neighbor-Interchange algorithm con un bootstrap de 1225 replicas. 235 posiciones y 32 puntos parsimoniosos. Índices de consistencia; 0.71 y de retención; 0.87. Programa MEGA 4 Versión 4.0. **B)** Análisis de Máxima Parsimonia, mediante el software PAUP (Swofford, 2002). Versión 4.0. 480 árboles parsimoniosos, consenso del 50%.

## DISCUSION

Entre los genes para estudios taxonómicos destacan los que codifican para el RNA ribosomal. Esto se debe a que un gen contiene regiones con distintas tasas de mutación. Por ejemplo, las regiones que codifican para la subunidad corta 18S y larga 28S del ARN ribosomal son potencialmente informativas en grupos taxonómicos de divergencia

---

antigua. Al mismo tiempo, las regiones no codificadoras de ARN, como el ITS 1 y 2, son útiles a niveles taxonómicos de divergencia reciente (González, 2002). Justensen, 2003 encontró que el ITS1 tiene un índice de similitud que va desde 96,3 hasta 100%, en comparación con el ITS2 que varió desde 99,7 hasta 100%, mientras que la región 5.8S se ha conservado por completo a través de los análisis de secuencias. La variación entre los aislamientos se produjo en 10 posiciones nucleotídicas para la región ITS1 y en tres posiciones para la región ITS2. A causa de la baja variación observada en el ITS2, se decidió realizar los análisis en la región del ITS1 para los aislamientos que ellos estudiaron. Se analizaron 121 aislamientos y se encuentra baja variabilidad en la región del ITS-2 para el grupo AG-3, esto no quiere decir que el marcador tenga desventajas respecto a su uso, sino que es necesario combinarlo simultáneamente con otros marcadores moleculares para obtener mejor resolución en los resultados, además permite de forma rápida y confiable poder detectar el grupo de anastomosis que se pretende identificar.

Resultados de ITS más evidentes que se observaron en los trabajos de Felstein, 1985, Soltis y Soltis, 1996, Gonzalez, 2002, fueron; las secuencias de ITS no dieron resolución en ramas basales del cladograma, *R. solani* no constituye un grupo monofilético, tal como se observa el presente trabajo. La resolución pobre en las ramas basales se debe a la gran cantidad de topologías en competencia. Sin embargo, hay clados internos de gran robustez como el de AG-3 TB y el de AG-3 PT con valores de 100 y 95, tales valores están relacionados estrechamente al grupo de anastomosis al que pertenecen los aislamientos. Recientemente Ahvenniemi, 2009, describe cambios compensatorios en bases para la estructura secundaria del ITS-2 (CBC), estos cambios pueden ser correlacionados con la incompatibilidad genética entre aislamientos de *R. solani* y potencialmente con la compatibilidad entre grupos de anastomosis relacionados. Esto resulta de interés práctico para aquellos grupos de investigación que tienen gran información de secuencias ITS-2 esta nueva aplicación permite inferir relaciones evolutivas basadas en la estructura secundaria del ITS-2. Por otro lado González 2001 y 2002, propone realizar análisis filogenéticos con las secuencias de la región ITS y parte del 28S del ADN ribosomal, y para apoyar cualquier decisión taxonómica que se haga en la clasificación de *R. solani*, actualmente se está adicionando caracteres del gen beta-tubulina a la matriz de secuencias del ADN ribosomal, con el objetivo de definir especies distintas (Gonzalez, 2002).

## BIBLIOGRAFIA:

1. Anguiz R, Martin C. Anastomosis groups, pathogenicity, and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Perú. *Plant Disease* 1989; 73: 199– 201.
2. Ahvenniemi Paavo, Wolf Matthias, Lehtonen Mari J, Wilson Paula, German Kinnari Jari Malgorzata Valkonen P. T. 2009. Evolutionary Diversification Indicated by Compensatory Base Changes in ITS2 Secondary Structures in a Complex Fungal Species, *Rhizoctonia solani*. *J Mol Evol.* 69:150–163.
3. Balali G, Neate S, Scott E, Whisson D, Wicks T. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. *Plant Pathology* 1995; 44: 1050-1057.
4. Bandy BP, Leach SS, Tavantzis SM. Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. *Plant Dis.* 1988; 72: 596-598.
5. Boysen, m.; m. Borja; c. Del moral; o. Salazar; v. Rubio. 1996. Identification at Strain Level of *Rhizoctonia solani* AG-4 Isolates by Direct Sequence of Asymmetric PCR Products of ITS Region, *Curr. Genetics* 29:174- 181.
6. Carling D, Leiner R. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 1986; 76: 725-729.
7. Cedeño L, Carrero C, Quintero K, Araujo Y, Pino H, García R. Identificación y Virulencia de Grupos de Anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn Asociados con Papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* 2001; 26: 7.
8. Ceresini P, Shew H, Vilgalys R, Cubeta M. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia* 2002; 94 (3): 437–449.
9. Ceresini P, Shew H, Vilgalys R, Rosewich U, Cubeta M. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 on potato in eastern North Carolina. *Mycologia* 2002; 94 (3): 450–460.

10. Chavarro E, Sastoque L, Beltran C, Angel J, Cotes A. Detección de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa utilizando secuencias de ADN-ITS en tres regiones de Colombia. 2007; Memorias, XXIII Congreso de la asociación latinoamericana de la papa-ALAP. Mar de la plata-Argentina. ISBN 978-987-544-275-7.
11. Dice L R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 1945; 26: 297 - 302.
12. Elbakali A, Lilja A, Hantula J, Martín M. Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopathol. Mediterr.* 2003; 42: 00–00.
13. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
14. Gene Codes Corp. 1996. Sequencher, version 5.0. Gene Codes, Ann Arbor.
15. González, d.; d. E. Carling; s. Kuninaga; r. Vilgalys; m. Cubeta: 2001. Ribosomal DNA Systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* Anamorphs, *Mycologia* 93 (6):1138-1150.
16. González H. Dolores *et al.*, 2001. Ribosomal DNA Systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia anamorphs*. *Mycologia*. 93(6). 1138-1150
17. González García, Marleny. 2008. Aspectos de sistemática y biología del Complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad*, vol. 12, núm. 3, septiembre, pp. 147-159.
18. González H. Dolores. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* . Kühn. *Revista mejicana de fitopatología*. Vol ,20 No. 2.
19. González, v.; o. Salazar; m. C. Julián; j. Acero; m. A. Portal; r. Muñoz; h. López; e. Gómez, p. López; v. Rubio: 2002. *Ceratobasidium albasitensis*, a New *Rhizoctonia*-Like Fungus Isolated in Spain, *Persoonia* 17:601-614.
20. González, d.; r. Vilgalys; m. Cubeta: 2006a. Phylogenetics Utility of Indels Within Ribosomal DNA and  $\beta$ -Tubulin Sequences from Fungi in the *Rhizoctonia solani* Complex, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:459-470.
21. González, v.; m. A. Portal-onco; v. Rubio-susan: 2006b. Review. Biology and systematics of the form Genus *Rhizoctonia*, *Spanish Journal of Agricultural Research* 4 (1):55-79, España,

22. Goodwin D C, Lee S B. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protist and animals for PCR. *BioTechniques*. 1993; 15: 438-444.
23. Hantula J, Dusabenyagasaniy M, Hamelin R C. Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. For. Path.* 1996; 26: 159-166.
24. Hunter P R. Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28:1903-1905.
25. Hunter P R, Gaston M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26 (No. 11): 2465 -2466.
26. Justesen A, Yohalem D, Bay A, Nicolaisen M. Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. *Mycol. Res.* 2003; 107 (11): 1323–1331.
27. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
28. Kuninaga S, Carling D, Takeuchi T, Yokosawa R. Comparison of rDNA-ITS Sequences between Potato and Tobacco Strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. *J. Gen. Plant Pathol.* 2000; 66: 2-11.
29. Kuninaga, s.; t. Natsuaki; t. Takeuchi; r. Yokosawa: 1997. Sequence Variation of the rDNA its Regions Within and Between Anastomosis Groups in *Rhizoctonia solani*, *Current Genetics* 32:237-243.
30. Laroche J, Jabaji-Hare S, Charest P. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology* 1992; 82: 1387-1393.
31. Lehtonen, M, Ahvenniemi P, Wilson P, German-Kinnari M, Valkonen J, Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology* 2008; 57: 141–151.

- 
32. LIU, Z. L.; SINCLAIR, J. B. y CHEN, W. 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* 82: 778-787.
  33. ROBERTS, P.: 1999. *Rhizoctonia-Forming Fungi: a Taxonomy Guide*, Royal Botanical Gardens, Kew.
  34. Nei Masatoshi. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1973; 70 (No. 12, Part I): 3321-3323.
  35. Otrysko B, Banville G, Asselin A. Anastomosis group identification and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from tuberborne sclerotia. *Phytoprotection* 1985; 66: 17-23.
  36. Pérez T, Albornoz J, Domínguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 1998; 7: 1347-1357.
  37. Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
  38. Salazar, o.; m. C. Julian; m. Hyakumachi; v. Rubio: 2000. «Phylogenetic Grouping of Cultural Types of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 Based on Ribosomal ITS Sequences», *Mycologia* 92:505-509
  39. Sneath P H, Sokal R R. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman. 1973; p. 573.
  40. Swofford L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
  41. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
  42. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
  43. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplifications and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocol. A Guide to Methods and Amplifications* (M.A. Innis, ed.), Academic Press, Inc, San Diego, CA, USA, 1990: 315-322.

44. Woodhall J, Lees A, Edwards S, Jenkinson P. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology* 2007; 56: 286–295.
45. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 1994; 20: 176-183.

## 3. Capítulo 3

### TITULO:

**“Variabilidad genética de *Rhizoctonia solani* GA-3 en regiones de Colombia productoras de papa”**

### RESUMEN

Una de las enfermedades más recurrentes en tubérculos de papa es la rhizoctoniasis causada por el hongo *Rhizoctonia solani*, el cual se encuentra conformado por grupos de anastomosis (AGs) y algunos de estos se dividen en subgrupos. El objetivo del presente estudio fue; analizar la variabilidad genética de *Rhizoctonia solani* AG-3 mediante marcadores moleculares de tipo PCR-RFLP y RAMS (Amplificación Aleatoria de Microsatélites), para tres regiones de Colombia productoras de papa. Se obtuvieron 50 aislamientos a partir de tubérculos de papa, que posteriormente fueron identificados mediante; compatibilidad de anastomosis, iniciadores específicos y secuenciación de la región ITS-B. Se realizó amplificación de marcadores moleculares (PCR-RFLP y RAMS) utilizando prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). El software PAST ver. 1.34. se utilizó para determinar el grado de similitud entre los aislamientos y construir el dendograma y análisis de coordenadas principales (PCA). Adicionalmente se determinó el poder de discriminación y reproducibilidad de la técnica de PCR-RAMS. Con ITS-RFLP se logró diferenciar los dos grupos de anastomosis estudiados (AG-3 y AG-2). Mediante marcadores RAMS se observaron dos agrupamientos dentro de *R. solani* AG-3, el Grupo I comparte un índice de similitud del 82% entre sí, en comparación con el Grupo II que presenta una similitud del 80% entre sus aislamientos. Estos agrupamientos no están relacionados a su procedencia geográfica, pero si al grupo de anastomosis a que pertenecen. Los resultados de este estudio resultan de interés práctico para el desarrollo de perfiles moleculares tipo huella genética, logrando diferenciar el grupo anastomosis 3 separandolo de los demás grupos con la prueba de PCR-RAMS, siendo una técnica altamente reproducible con un alto poder de discriminación dentro de los AGs, lo cual, los convierte en una técnica confiable para el análisis de variabilidad genética dentro de poblaciones y determinación de grupos de anastomosis.

**Palabras clave:** *Rhizoctonia solani*, AG-3, grupos de anastomosis, PCR, RAMS, RFLP.

## "Genetic variability of *Rhizoctonia solani* AG-3 in regions of Colombia producing potatoes"

### ABSTRACT

One of the most common diseases in potatoes is rhizoctoniasis caused by the fungus *Rhizoctonia solani*, which is conformed by groups of anastomosis (Ags) and some of these are divided in sub-groups. The objective of this study is to analyze the genetic variability of *Rhizoctonia solani* AG-3 using molecular markers of type PCR-RFLP y RAMS (Random amplification of microsatellites), for three regions of Colombia where potatoes is produced. 50 isolates were obtained from potatoes tubers, and then identified using anastomosis compatibility, specific initiators and sequencing of ITS-B region. The molecular markers were realized (PCR-RFLP y RAMS) using the PCR method (Polymerase Chain Reaction). The software PAST ver.1.34 was used to determine the degree of similarity between the isolations and the construction of the dendrogram and analysis of the principal coordinates (PCA). Additionally, it was determined the discriminatory power and reproducibility of PCR-RAMS. With ITS-RFLP it was able differentiate between two groups of anastomosis that were studied (AG-3 y AG-2). Using RAMS were observed two grouping in *R. solani* AG-3, the Group 1 shares an 82% of similitude between them selves, compared with group 2 that has an 80% of similitude. These groupings are not related to their geographical origin, but if the anastomosis group they belong to. The results of this study are of practical interest for the development of molecular type DNA fingerprint profiles, making differentiate the group of anastomosis 3 from other groups by separating this using the techniques of RAMS-PCR, being these techniques highly reproducible with a high power of discrimination within of groups AGs, which, makes them a reliable technique for the analysis of genetic variability within populations and determination of anastomosis groups.

**Keywords:** *Rhizoctonia solani* AG-3, anastomosis group, PCR, RAMS, RFLP

## **INTRODUCCIÓN**

Los aislamientos de *Rhizoctonia solani* en papa, generalmente se han identificado como miembros del grupo de anastomosis 3 (AG3) [1, 3, 4, 22]; sin embargo, otros grupos de anastomosis también se han aislado, estos grupos son: AG2-1 [5, 18, 26], AG 4 [1, 2], AG5 [2], AG1 y AG9 [4].

*Rhizoctonia solani* AG3 es un habitante natural del suelo y a su vez el hongo de mayor asociación con papa [1, 3], siendo el agente causal de una enfermedad conocida como “Rhizoctoniasis” o costra negra, provocando también el cáncer de tallo y estolón.

Análisis de variación en las secuencias ribosomales definieron dos grupos filogenéticos dentro del AG3 que corresponden a los asociados a enfermedades en papa (AG3-PT) y tabaco (AG3-TB) [16], definido también por análisis AFLP [6].

El análisis molecular permite conocer a profundidad un microorganismo y la relación con su comportamiento en ecosistemas, por tal motivo y con el fin de obtener mayor información sobre este patógeno en Colombia, se encontró necesario la realización de un análisis de variabilidad genética de *R. solani* AG3 por medio de los marcadores moleculares RAMS e ITS-RFLP, en aislados provenientes de tres regiones Colombianas productoras de papa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Biológico**

Las cepas de *R. solani* utilizadas en este estudio fueron recolectados a partir del cultivo de papa en tres diferentes regiones de Colombia, los cuales fueron caracterizados por pruebas de compatibilidad vegetativa y secuenciación de la región ITS-B en trabajos anteriores [8] (Tabla 1).

### **Extracción de ADN**

*R. solani* se sembró en papa dextrosa agar (PDA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 25°C durante 72 a 96 horas. La extracción de ADN a partir del micelio del hongo, se realizó con el protocolo propuesto por Goodwin y Lee, (1993) [11].

### Análisis PCR-RFLP

Los iniciadores universales ITS1 e ITS4 [25] fueron utilizados para la amplificación completa de la Secuencia Interna Transcrita (ITS) incluyendo la región 5.8S ribosomal del DNA, la PCR fue realizada en mezclas de 25µl que contenían 160 µM de dNTPs, 5µl de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 300 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de BSA, 0.24 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) y 2µl de templado (50-100 ng/µl). Los ciclos de la PCR fueron realizados en un termociclador automatizado (PTC-200, MJ Research, INC., USA) bajo las condiciones: denaturalización inicial a 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min, y finalmente 72°C por 10 min. Después de la amplificación 5 µl de muestra fueron sujetos a electroforesis en gel de agarosa al 1,3% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) y corridos en buffer TAE 1X. El tamaño de los fragmentos amplificados fue determinado por un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt™, Invitrogen). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados por medio de luz ultravioleta.

**Tabla 1.** Aislamientos de *Rhizoctonia solani* estudiados.

N°	Código aislado	Procedencia	Grupo de Anastomosis	N°	Código aislado	Procedencia	Grupo de Anastomosis
1	001	Boyacá	3	26	070	Antioquia	3
2	002	Boyacá	3	27	073	Antioquia	3
3	003	Boyacá	3	28	074	Antioquia	3
4	004	Boyacá	3	29	075	Antioquia	3
5	012	Boyacá	3	30	078	Antioquia	3
6	014	Boyacá	3	31	080	Antioquia	3
7	019	Boyacá	3	32	084	Antioquia	3
8	021	Boyacá	3	33	100	Antioquia	3
9	023	Boyacá	3	34	ICA 002	Antioquia	3
10	024	Boyacá	3	35	105	Cundinamarca	3
11	026	Boyacá	3	36	114	Cundinamarca	3
12	028	Boyacá	3	37	115	Cundinamarca	3
13	030	Boyacá	2-1	38	116	Cundinamarca	3

---

14	031	Boyacá	3	39	121	Cundinamarca	3
15	034	Boyacá	3	40	125	Cundinamarca	3
16	036	Boyacá	3	41	126	Cundinamarca	3
17	037	Boyacá	3	42	129	Cundinamarca	3
18	038	Boyacá	3	43	144	Cundinamarca	3
19	051	Antioquia	3	44	176	Cundinamarca	3
20	053	Antioquia	3	45	181	Cundinamarca	3
21	054	Antioquia	3	46	190	Cundinamarca	3
22	055	Antioquia	3	47	198	Cundinamarca	3
23	056	Antioquia	2-1	48	199	Cundinamarca	3
24	062	Antioquia	3	49	ICA 003	Cundinamarca	3
25	069	Antioquia	3	50	ICA 004	Cundinamarca	2-1

---

La digestión de la región ITS fue realizada con las enzimas de restricción AluI, EcoRI (Fermentas) y TaqI (Promega, USA) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante; estos fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen), teñidos con bromuro de etidio, corridos en buffer TAE 1X y visualizados por medio de luz ultravioleta.

### **RAMS (Amplificación Aleatoria de Microsatélites)**

El ADN extraído de los hongos fue amplificado en mezclas de 25µl que contenían 200 µM de dNTPs, 1X de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 200 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de BSA, 0.52 µM de un iniciador RAMS, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) y 1µl de templado (50-100 ng/µl). Los iniciadores utilizados fueron: TCG [5'DHB(TCG)<sub>5</sub>], GT [5'VHV(GT)<sub>7</sub>G] y AC [5'DHD(AC)<sub>7</sub>A]. Las muestras fueron denaturadas a 95°C por 10 min, 37 (Iniciadores AC-GT) y 35 (Iniciador TCG) ciclos de amplificación (denaturación 95°C por 30 s, la temperatura de anillamiento depende de cada iniciador por 45 s y extensión a 72°C por 2 min), y 72°C por 10 min de extensión final. Las temperaturas de anillamiento utilizadas fueron de 58°C (Iniciador TCG) y 52°C (Iniciadores AC-GT). 5 µl de los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 2%. [10, 12, 27]. Para el análisis de reproducibilidad, fueron amplificados dos aislamientos

AG3 y un aislamiento AG 2-1 en cinco oportunidades diferentes e independientes con las condiciones anteriormente descritas.

### **Análisis de datos**

Fueron analizados los aislamientos AG3 y AG 2-1, con los cuales, se generó una matriz binaria mediante el registro de presencia (1) o ausencia (0) de bandas de ADN de tamaño similar. Se determinó el grado de similitud entre los aislamientos utilizando el coeficiente de similaridad de Dice (1945) [9, 24] y se construyó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA, la diversidad genética fue calculada de acuerdo a Nei (1973) [21] y se calculó el poder de discriminación de la técnica RAMS [13, 14], el cual es definido matemáticamente como la probabilidad de que dos cepas escogidas al azar de una población de cepas no relacionadas sean distinguidas. Se analizó la reproducibilidad de la técnica RAMS según los establecido por Pérez *et al.* (1998) [23] en donde se evaluó la autosimilaridad ( $S_{xx}$ ), repetibilidad de banda ( $R_b$ ) y la frecuencia media observada de cada banda ( $f_b$ ).

## **RESULTADOS**

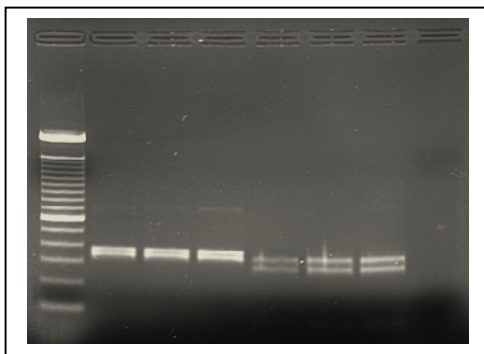
### **PCR-RFLP**

En la amplificación de la región ITS-5.8S se obtuvo un producto de 700 pb aproximadamente. En los aislamientos AG3, la digestión con la enzima Alu I demostró bandas de 420, 200 y 80 pb; la endonucleasa Taq I produjo tres bandas de 350, 290 y 60 pb y la Eco RI realizó un corte generando dos bandas de 360 y 340 pb. Las enzimas Taq I y Alu I demostraron los mismos fragmentos en los aislamientos AG3 y AG 2-1 y únicamente la Eco RI logró diferenciar estos dos grupos generando fragmentos de 340, 290 y 70 pb en los aislamientos AG 2-1 (Figura 1A).

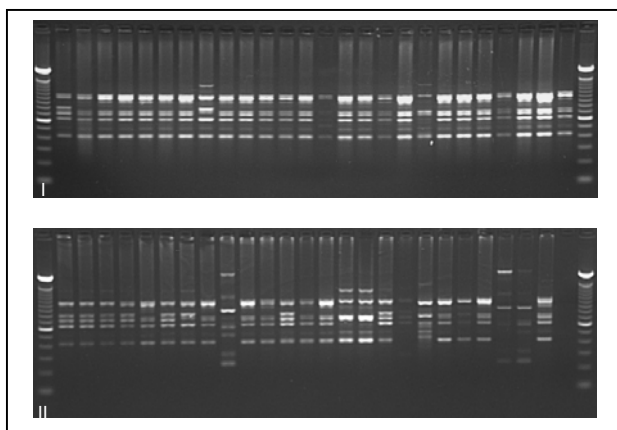
### **Marcadores RAMS**

*Análisis de similaridad.* Los aislamientos de *R. solani* analizados en este estudio revelaron patrones de bandeo diferentes (Figuras 1B y 1C). En el dendograma (Figura 2) se observa que el porcentaje de similaridad en los aislados AG3 se encuentra entre el 72% y el 100% y se identifican claramente la presencia de dos grupos; además, los aislamientos 030B, 056A e ICA 004C pertenecientes al grupo de anastomosis 2-1

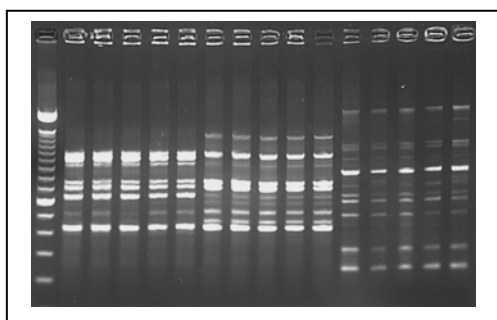
revelaron un porcentaje de similitud del 27% con respecto a toda la población AG3 (ver también el análisis de coordenadas principales, figura 3).



**Figura 1A.** Restricción con la endonucleasa Eco RI a la región ITS-5.8S en aislamientos AG3 y AG 2-1. Línea 1, marcador de peso molecular 100 pb. Líneas 2-4, aislamientos *R. solani* AG3. Líneas 5-7, aislamientos *R. solani* AG 2-1. Línea 8, control negativo de la PCR.

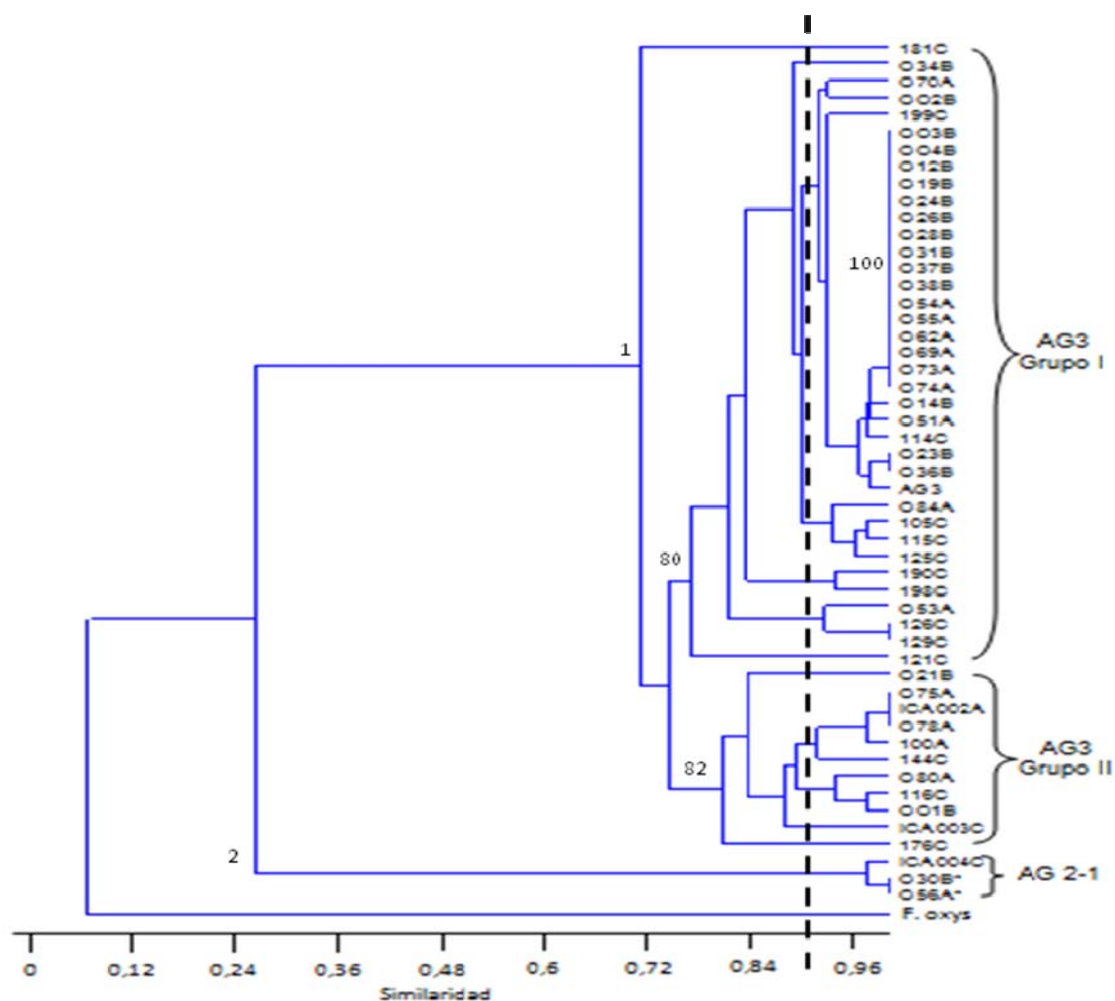


**Figura 1B.** Fragmentos obtenidos el iniciador AC. I) Líneas 1 y 28, marcador de peso molecular 100 pb; líneas 2-27, 001, 002, 003, 004, 012, 014, 019, 021, 023, 024, 026, 028, 031, 034, 036, 037, 038, 051, 053, 054, 055, 062, 069, 070, 073, 074. II) Líneas 1 y 28, marcador de peso molecular 100 pb; líneas 2-27, 075, ICA 002, 078, 080, 084, 100, ICA 003, 105, ICA 004, 114, 115A, 116, 121, 125, 126, 129, 144, 176, 181, 190, 198, 199, 030, 056, AG3 (control positivo) y control negativo de la PCR.



**Figura 1C.** Diferenciación de perfiles AG3 y AG 2-1 con el iniciador AC. Línea 1, marcador de peso molecular 100 pb; líneas 2-6, 5 réplicas de aislamiento AG3 (019); líneas 7-11, 5 réplicas de aislamiento AG3 (126) y líneas 12-16, 5 réplicas de aislamiento AG 2-1 (ICA 004).

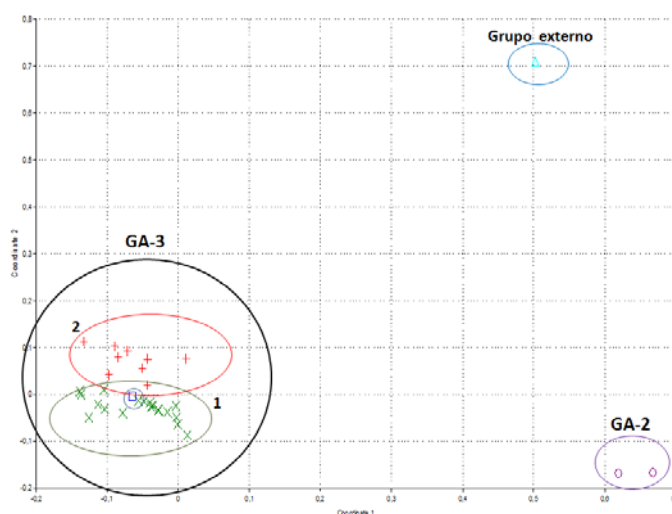
**Figura 1.** Perfiles obtenidos para *R. solani* AG3 y *R. solani* AG 2-1 por PCR-RFLP en la región ITS-5.8S y marcadores RAMS.



**Figura 2.** Dendrograma de *R. solani* con iniciadores RAMS por medio del índice de similitud de Dice (1945).

*Diversidad genética entre aislamientos AG3.* Los iniciadores AC y GT produjeron una sola banda monomórfica en la totalidad de los aislamientos, es por esta razón que presentan porcentajes de loci polimórficos de 92.3% y 91.6% respectivamente, más altos que el iniciador TCG el cual presentó solamente 3 bandas polimórficas correspondiendo al 42,8% de loci polimórficos. La diversidad genética promedio de *R. solani* AG3 demostró valores de 0.15, 0.27 y 0.31 para los iniciadores TCG, AC y GT respectivamente. La diversidad genética (Nei) promedio global ( $H_j$ ), teniendo en cuenta todos los iniciadores fue de 0.25.

*Diversidad genética entre aislamientos AG3 y AG2-1.* Los iniciadores AC y GT no produjeron bandas monomórficas en la totalidad de los aislamientos, es por esta razón que presentan porcentajes de loci polimórficos del 100%. El iniciador TCG arrojó 81.8% de loci polimórficos. La diversidad genética promedio entre los aislamientos AG3 y AG2-1 demostró valores de 0.21, 0.26 y 0.35 para los iniciadores TCG, AC y GT respectivamente. La diversidad genética (Nei) promedio global ( $H_j$ ), teniendo en cuenta todos los iniciadores fue de 0.28.



**Figura 3.** Análisis de Coordenadas Principales, confirma lo visto en el dendrograma.

El poder de discriminación obtenido para técnica RAMS fue del 94%. Los valores de autosimilaridad promedio ( $S_{xx}$ ) y repetibilidad promedio de banda ( $R_b$ ) se encontraron entre 0.96 y 1.00. La frecuencia media de banda observada ( $f_b$ ) arrojó valores entre 0.54 y 0.56, debido a que los aislamientos AG3 y AG 2-1 comparten un bajo número de locis. Los valores de autosimilaridad por muestra se encontraron entre 0.88 y 1.00.

## DISCUSION

Los fragmentos generados después de la restricción con las enzimas Alu I y Eco RI a los dos grupos de anastomosis estudiados, corresponden a lo obtenido por Lubeck y Poulsen (2001) [20]; igualmente, los sitios de restricción encontrados por las endonucleasas Taq I y Eco RI en los aislamientos AG2-1 corresponden a lo obtenido por Liu *et al.* (1992) [19].

Kuninaga *et al.* (2000) [16], sugiere que el análisis de secuencias de la región ITS-5.8S en *Rhizoctonia solani* ofrece información valiosa para la identificación de subgrupos dentro de los AGs de este hongo, evidenciando dos subgrupos en AG3 relacionados con especificidad al hospedero; sin embargo, la técnica PCR-RFLP en la región ITS-5.8S aplicada en este estudio demostró una baja variabilidad evidenciando el mismo perfil de restricción dentro de los aislamientos AG3. Lubeck y Poulsen (2001) [20] encontraron que utilizando la técnica PCR-RFLP en la región ITS-5.8S, *R. solani* demuestra una alta variabilidad entre sus grupos de anastomosis, evidenciando que es una buena metodología para la diferenciación de estos AGs.

Los dos agrupamientos obtenidos en este trabajo dentro de *R. solani* AG3 patógeno de papa, por medio de los marcadores RAMS no presentaron relación geográfica y demostraron la presencia de aislamientos clonales provenientes de diferentes regiones del país. Anteriormente, Ceresini *et al.* (2002) [6] por medio del análisis AFLP encontró evidencia de aislamientos clonales y recombinación en *R. solani* AG3 en el Norte de Carolina; igualmente, Justesen *et al.* (2003) [15] por medio de secuenciación de la región ITS y análisis RAPD, encontró aislamientos clonales en AG3 de cultivos de papa en Dinamarca.

Laroche *et al.* (1992) [17] en su trabajo de diferenciación de grupos de anastomosis por análisis de isoenzimas encuentra la presencia de tres subgrupos dentro de AG3 relacionados con su procedencia geográfica, con una similaridad entre el 78% y 81%; Kuninaga *et al.* (2000) [16] encuentra un rango de similaridad en el análisis de secuencias entre 96 a 100% para AG3-PT. En esta investigación se encontró una similaridad entre el 72% y 100% para aislamientos AG3, la cual, demuestra que los marcadores moleculares RAMS son una herramienta útil para la búsqueda de subgrupos dentro de AGs, así como al análisis de variabilidad genética dentro de poblaciones, debido a que estos marcadores están basados en el polimorfismo de microsatélites y por lo tanto analizan el genoma completo con posibilidades más altas de hallar polimorfismo que otras técnicas.

En esta investigación se encontró que los aislamientos pertenecientes a AG 2-1 revelaron un porcentaje de similaridad del 27% con respecto a toda la población AG3. Esta baja similaridad entre los dos grupos de anastomosis demuestra que los marcadores moleculares RAMS son capaces de detectar una alta disimilitud genética

---

entre grupos de anastomosis comparada con otras técnicas moleculares utilizadas [15, 16, 17].

La diversidad genética (Nei) 0.25 encontrada en este trabajo, demostró una alta variabilidad dentro de AG3 con valores similares a lo encontrado en trabajos anteriores 0.28 a 0.38 [7] y 0.29 [15].

Los altos valores obtenidos para el poder de discriminación y la reproducibilidad de los RAMS, así como el bajo costo de la técnica y la falta de conocimiento previo del genoma a estudiar, demuestran que este marcador es eficaz al momento de diferenciar los grupos de anastomosis dentro de *R. solani* y puede ser utilizada posiblemente para la discriminación o diferenciación genética de aislamientos pertenecientes a una misma especie.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y al Instituto Colombiano Agropecuario por permitir el desarrollo y financiación de este proyecto.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Anguiz R, Martin C. Anastomosis groups, pathogenicity, and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. *Plant Disease* 1989; 73: 199–201.
2. Balali G, Neate S, Scott E, Whisson D, Wicks T. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. *Plant Pathology* 1995; 44: 1050-1057.
3. Bandy BP, Leach SS, Tavantzis SM. Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. *Plant Dis.* 1988; 72: 596-598.
4. Carling D, Leiner R. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 1986; 76: 725-729.
5. Cedeño L, Carrero C, Quintero K, Araujo Y, Pino H, García R. Identificación y Virulencia de Grupos de Anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn Asociados con Papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* 2001; 26: 7.

6. Ceresini P, Shew H, Vilgalys R, Cubeta M. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia* 2002; 94 (3): 437–449.
7. Ceresini P, Shew H, Vilgalys R, Rosewich U, Cubeta M. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 on potato in eastern North Carolina. *Mycologia* 2002; 94 (3): 450–460.
8. Chavarro E, Sastoque L, Beltran C, Angel J, Cotes A. Detección de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa utilizando secuencias de ADNr-ITS en tres regiones de Colombia. 2007; Memorias, XXIII Congreso de la asociación latinoamericana de la papa-ALAP. Mar de la plata-Argentina. ISBN 978-987-544-275-7.
9. Dice L R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 1945; 26: 297 - 302.
10. Elbakali A, Lilja A, Hantula J, Martín M. Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopathol. Mediterr.* 2003; 42: 00–00.
11. Goodwin D C, Lee S B. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protist and animals for PCR. *BioTechniques*. 1993; 15: 438-444.
12. Hantula J, Dusabenyagasaniy M, Hamelin R C. Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. For. Path.* 1996; 26: 159-166.
13. Hunter P R. Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28:1903-1905.
14. Hunter P R, Gaston M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26 (No. 11): 2465 -2466.
15. Justesen A, Yohalem D, Bay A, Nicolaisen M. Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. *Mycol. Res.* 2003; 107 (11): 1323–1331.
16. Kuninaga S, Carling D, Takeuchi T, Yokosawa R. Comparison of rDNA-ITS Sequences between Potato and Tobacco Strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. *J. Gen. Plant Pathol.* 2000; 66: 2-11.
17. Laroche J, Jabaji-Hare S, Charest P. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology* 1992; 82: 1387-1393.

- 
18. Lehtonen, M, Ahvenniemi P, Wilson P, German-Kinnari M, Valkonen J, Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology* 2008; 57: 141–151.
  19. Liu Z, Sinclair J, Chen W. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* 1992; 82: 778-787.
  20. Lubeck M, Poulsen H. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. *FEMS Microbiology Letters* 2001; 201: 83-89.
  21. Nei Masatoshi. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1973; 70 (No. 12, Part I): 3321-3323.
  22. Otrysko B, Banville G, Asselin A. Anastomosis group identification and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from tuberborne sclerotia. *Phytoprotection* 1985; 66: 17-23.
  23. Pérez T, Albornoz J, Domínguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 1998; 7: 1347-1357.
  24. Sneath P H, Sokal R R. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman. 1973; p. 573.
  25. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplifications and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocol. A Guide to Methods and Amplifications* (M.A. Innis, ed.), Academic Press, Inc, San Diego, CA, USA, 1990: 315–322.
  26. Woodhall J, Lees A, Edwards S, Jenkinson P. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology* 2007; 56: 286–295.
  27. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 1994; 20: 176-183.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

- El uso de marcadores ITS-RFLP con la enzima *Eco* RI permitió diferenciar los grupos de anastomosis GA-3 y GA2-1.
- Los marcadores RAMS permitieron distinguir polimorfismo entre aislamientos de un mismo grupo de anastomosis, soportado por un índice de diversidad genética promedio global de ( $H_j$ ) 0.25 (GA-3).
- Se evidencia mediante marcadores RAMS aislamientos clonales procedentes de distintas regiones geográficas (Boyacá y Antioquia).
- Dos métodos basados en PCR fueron estandarizados para la detección y cuantificación del patógeno a partir de muestras vegetales y de suelo, los cuales, pueden ser implementados en programas de certificación de semilla y áreas libres del patógeno.
- Los alineamientos para una secuencia parcial del ITS-2, muestran alta homología de secuencia, poco atractiva para los análisis de reconstrucciones filogenéticas pero de gran utilidad para la identificación molecular de grupos de anastomosis al interior del complejo *R solani*.
- La secuencia del ITS-2 no dio resolución en ramas basales del cladaograma para el grupo de anastomosis 3, además *R. solani* no constituye un grupo monofilético. Sin embargo, hay clados internos de gran robustez como el de AG-3 TB y el de AG-3 PT con valores de 100 y 95.

## 4.2 Recomendaciones

Evaluación de la relación del polimorfismo genético con respecto a su virulencia a su vez el control empleado en campo (potencial evolutivo, McDonal y Celeste Linde. 2002. Annu. Rev. Phytopathol 40: 349-379).

Análisis de la secuencia ITS-2 para Cambios Compensatorios en Bases (CBC), y modelación de la estructura secundaria del ITS-2.

Apoyar cualquier decisión taxonómica que se haga en la clasificación de *R. solani*, actualmente se está adicionando caracteres del gen beta-tubulina a la matriz de secuencias del ADN ribosomal, con el objetivo de definir especies distintas (Gonzalez, 2002).



## **Anexo A: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA EN HONGOS A PARTIR DE MEDIO SOLIDO POR Goodwin & Lee 1993.**

### **1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

- Tubos eppendorf de 2.0 ml
- Tubos eppendorf de 2.0 ml con cartucho de filtrado
- Puntas amarillas y azules
- Micropipetas de 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l
- Buffer de Lisis (50 Mm EDTA, 3% SDS y 1% de Mercaptoetanol)
- Proteinasa K
- Fenol
- Cloroformo alcohol Isoamilico 24:1
- Isopropanol
- Etanol Absoluto y al 70%
- RNAsa a 20 mg/ml
- Buffer TE pH8.01X o agua ultra-pura para resuspender
- Vortex en posición vertical
- Centrifuga refrigerada
- Baño de maría
- Nevera a 4°C
- Nevera a -20°C

### **2. PROCEDIMIENTO**

1. Cortar el micelio del medio solido de 0.3 a 0.5g e introducir en un tubo Eppendorf de 1.5ml
2. Adicionar 200  $\mu$ l de buffer de lisis (50 mM Tris HCl, (ph 7.2), 50 mM EDTA, 3% SDS y 1% de Mercaptoetanol) y mezclar suavemente utilizando un pistilo

- calentar empleando el microondas en máximo nivel durante 10 seg, 10 seg, 10 seg
3. Adicionar 200  $\mu$ l de buffer de lisis, vortex e incubar a 80°C durante 10 minutos
  4. Enfriar a 50 °C y adicionar 12  $\mu$ l de proteinasa K (0.5 mg/ml), incubar durante 30 minutos a 50°C
  5. Adicionar V/V de fenol absoluto, vortex hasta formar una emulsión homogénea, centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos
  6. Transferir la fase superior a un tubo nuevo y adicionar V/V de cloroformo alcohol isoamilico 24:1, vortex hasta formar una emulsión homogénea, centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos
  7. Transferir la fase superior a un tubo nuevo y adicionar 700  $\mu$ l de isopropanol y 70  $\mu$ l de acetato de sodio
  8. Mezclar lentamente y precipitar a -70°C por 1 hora o 20°C toda la noche
  9. Centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos
  10. Adicionar 10  $\mu$ l de RNAsa a 10mg/ml e incubar a 37°C durante 30 minutos
  11. Se descarta el liquido que se encuentra en la parte superior del pellet
  12. Se realizan 2 lavados en etanol al 70% adicionando 700  $\mu$ l
  13. Centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos
  14. Descartar el etanol y secar durante 10 minutos en el Speed Back
  15. Resuspender el DNA en TE o agua ultrapura

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

GOODWIN, D.C., & LEE, S.B. microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protist and animals for PCR. IN: BioFeedback. Vol. 15, 1993.









## Anexo C: MATRIZ BINARIA DE LOS RAMS PARA EL ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD

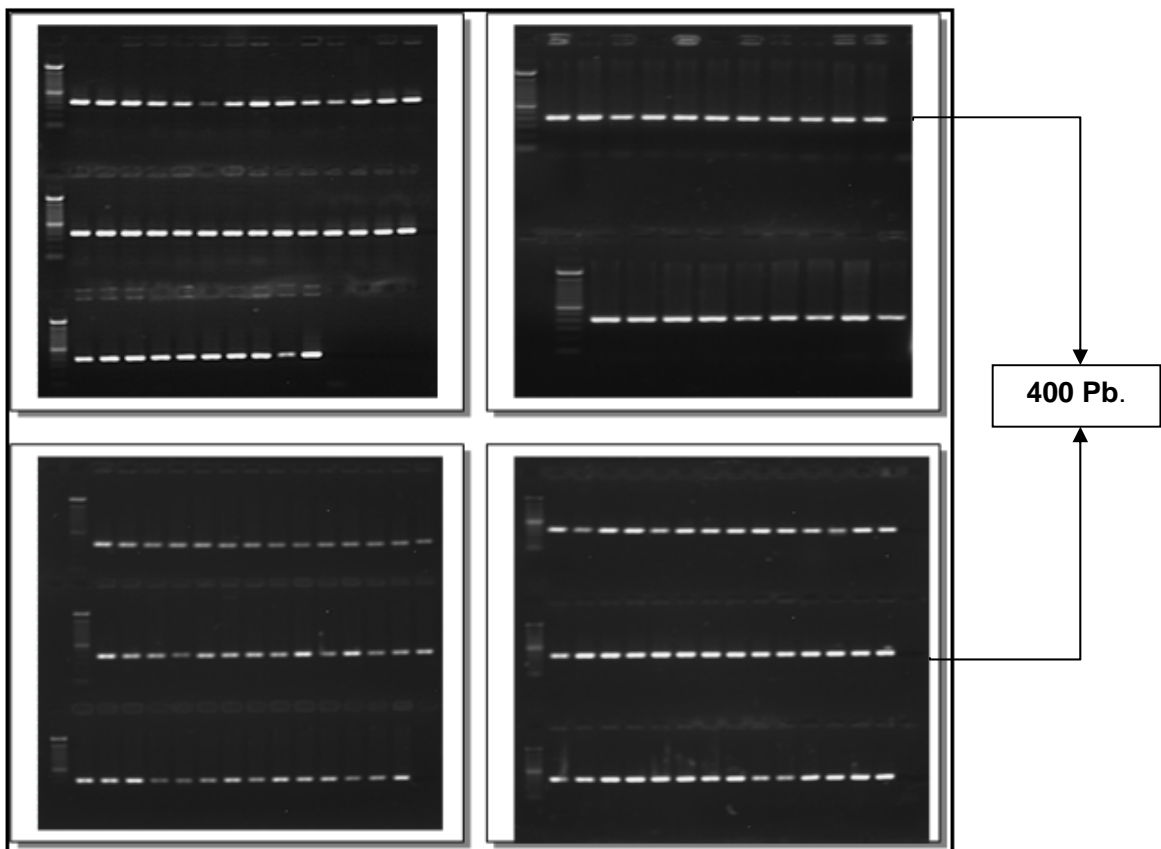
INICIADORES	MUESTRAS														
	O19					126					ICA 004				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	



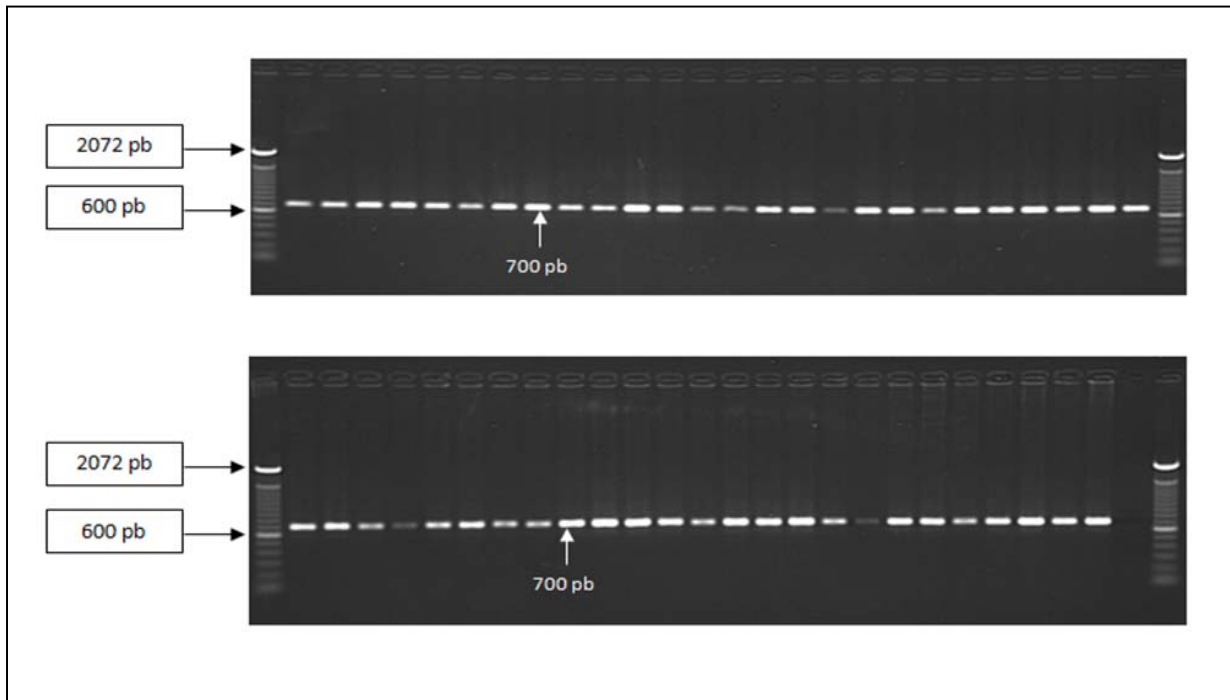




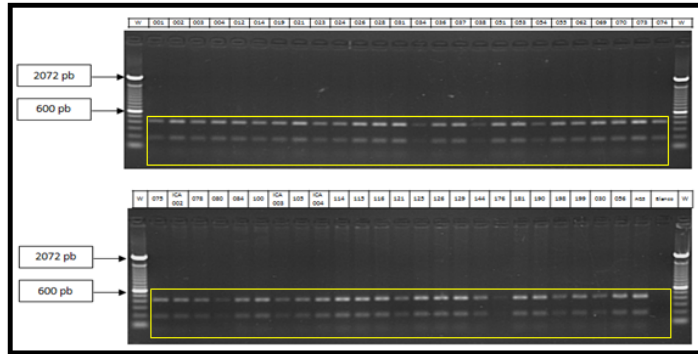
## Anexo E. AMPLIFICACIÓN PCR-ITS 2



## Anexo F. AMPLIFICACIÓN PCR-ITS COMPLETO

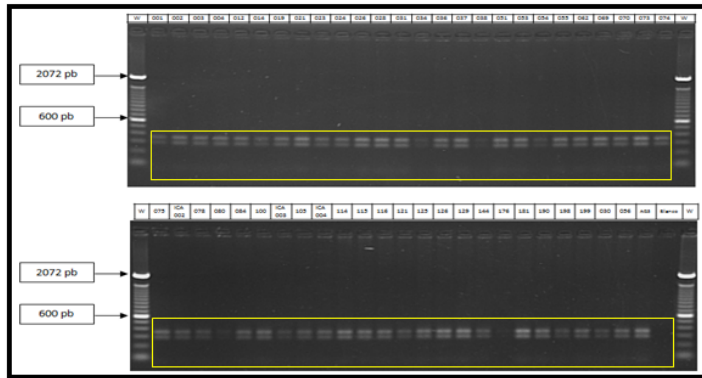


## Anexo G. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA PCR-RFLP



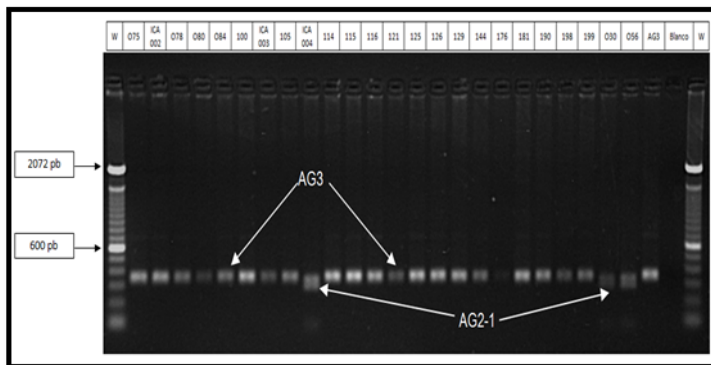
### Alu I

Fragmentos de 420, 200 y 80 pb (Lubeck y Poulsen, 2001)



### Taq I

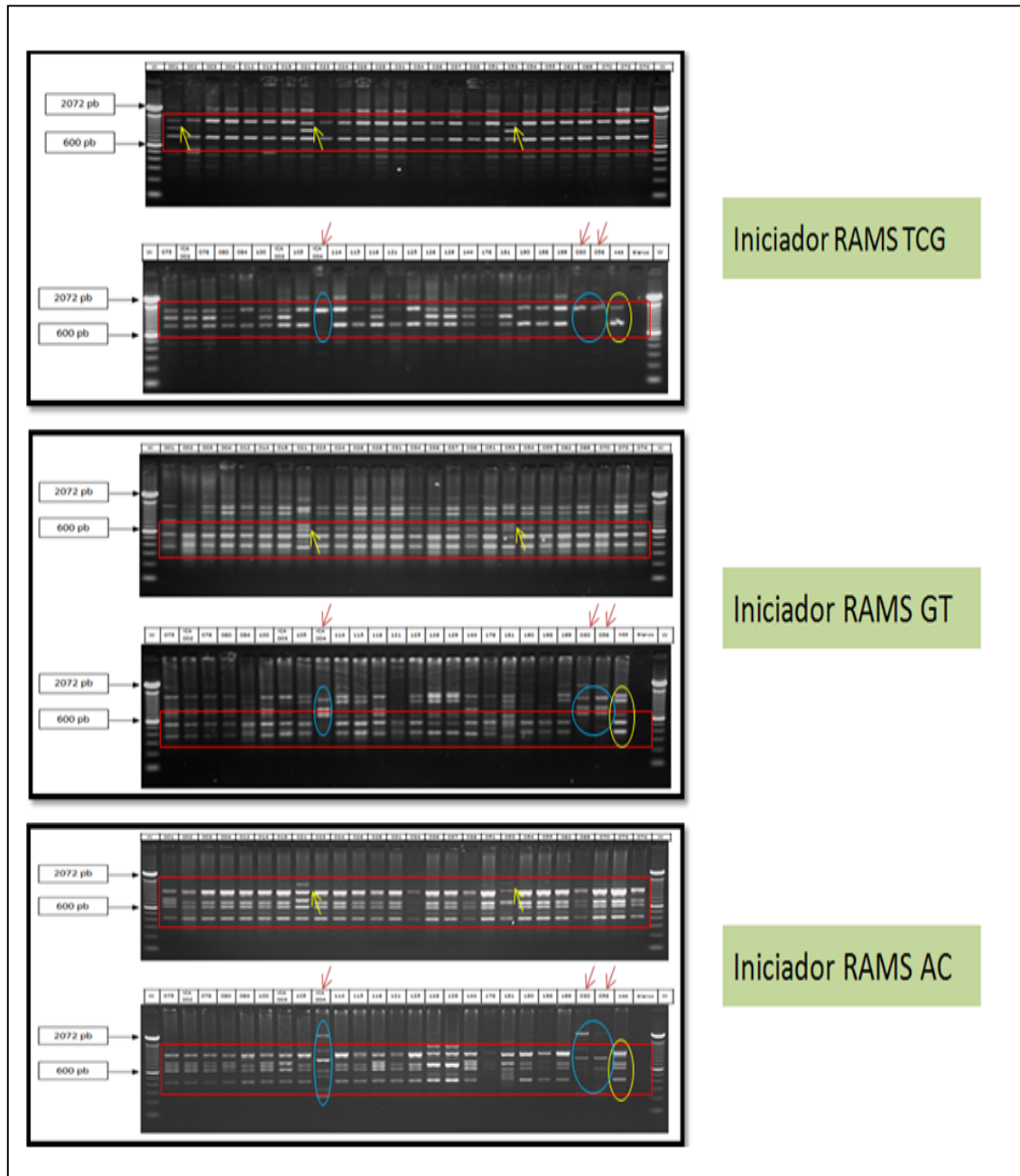
Fragmentos de 350, 290 y 60 pb (Liu *et al.*, 1992)



### Eco RI

GA-3 fragmentos de 360 y 340 pb; GA 2-1 fragmentos de 340, 290 y 70 pb (Liu *et al.*, 1992) (Lubeck y Poulsen, 2001).

## Anexo H. MARCADORES MOLECULARES RAMS



## Bibliografía

1. AGRIOS, George. Fitopatología. 2ª Edición. México: Limusa, 1996, p. 452-458.
2. AGRIOS, G. Plant Pathology. 5ª Edición. New York, Elsevier Academic Press. 2005, p 599.
3. ÁVILA de M, C., SANABRIA, J. y BURITICA, P. 1994. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* en papa. I. Aislamiento y selección de cepas antagonicas en laboratorio e invernadero. Revista ICA, Vol 29, abril-junio. p. 107-113.
4. ÁVILA de M., C. SANABRIA, J. y BURITICA, P. 1994b. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* en papa. II. Aplicaciones en campo. Revista ICA, Vol 29, abril-junio. p115-120.
5. ÁVILA, Y., CARREÑO, A., BLANCO, J. y Cotes, A.M. 2002. Biological control of *Phytophthora cactorum* on apple rotstocks using antagonistic fungi. IOBC WPRS Bulletin Vol. 25 (10) 307-340.
6. ANDERSON, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev Phytopathol. 20: 329-374.
7. APPELS, R.; J. DVORAK: 1982. «Relative Rates of Divergence of Spacer and Gene Sequences Within the rDNA Region of Species in the Triticeae: Implications for the Maintenance of Homogeneity of a Repeated Gene Family», *Theor. Appl. Genet.* 63:361-365.
8. ACUÑA, Ivette. Rhizoctoniasis de la Papa. 2004. Instituto de Investigaciones Agropecuarias- Centro regional de Investigación Remehue. Informativo Remehue N° 46.
9. AKINO,S. y OGOSHI, A. Pathogenicity and host specificity in *Rhizoctonia solani*. In: KOHOMOTO, K; Singh, V. and Singh R. Plant and host specifirty in plant diseases. Vol 2 Eucarides. Elsevier Science U.K. 1995.

10. ANGUIZ, Raul y MARTIN, Carlos. 1989. Anastomosis groups, pathogenicity, and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Perú. *Plant Disease* 73, 199– 201.
11. ARIZA, Nancy; ANGEL, Jorge y GIRALDO, Julio. 2003. Caracterización molecular y análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, en cultivos de papa de Cundinamarca y Nariño. Bogotá.
12. AZOFEIFA, Alvaro., 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17 (2): 221-242.
13. AHVENNIEMI Paavo, WOLF Matthias, LEHTONEN Mari J, WILSON Paula, GERMAN-Kinnari Jari Malgorzata, VALKONEN P. T. 2009. Evolutionary Diversification Indicated by Compensatory Base Changes in ITS2 Secondary Structures in a Complex Fungal Species, *Rhizoctonia solani*. *J Mol Evol.* 69:150–163.
14. BALALI, G. *et al.*, 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. *Plant Pathology* 44, 1050-1057
15. BALDWIN, B. *et al.*, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden.* 82: 247-277.
16. BANDY, B.; LEACH, S. y TAVANTZIS, S. 1988. Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. *Plant Dis.* 72:596-598.
17. BANNIZA, S. *et al.*, 1999. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* in paddy rice fields in Côte d'Ivoire. *Phytopathology* 89:414-420.
18. BELTRÁN, Camilo. PARIS, Alejandro y COTES, Alba. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en papa. Laboratorio de Control Biológico Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB).
19. BLANCARD, Dominique; LOT, Hervé y MAISONNEUVE, Brigitte. Enfermedades de las lechugas. Identificar, conocer, controlar. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 2005. p. 250-253.
20. BOYSEN, M.; M. BORJA; C. del MORAL; O. SALAZAR; V. RUBIO. 1996: «Identification at Strain Level of *Rhizoctonia solani* AG-4 Isolates by Direct Sequence of Asymmetric PCR Products of ITS Region», *Curr. Genetics* 29:174- 181.

21. BRUNS, T. D.; T. J. WHITE; J. W. TAYLOR: 1991.«Fungal Molecular Systematics», *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:525-564.
22. BOUNOU, Salim *et al.*, 1999. Polymerase chain reaction-based assay for specific detection of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates. *Mycol. Res.* 103 (1): 1-8
23. BUDGE, G. E. *et al.*, 2009. Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathology* 58, 1071–1080.
24. CADENAS. Fitopatología General. Universidad Agraria la Molina. Departamento Académico de Entomología y Fitopatología.
25. CARLING, D. E. *et al.*, 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *The American Phytopathological Society* Vol. 92, No. 8.
26. CARLING, D. y LEINER, R. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 76:725-729.
27. CARLING, D. y LEINER, R. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology* 80:930-934.
28. CARLING, D.; LEINER, R. y WESTPHALE, P. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Amer.Potato J.* 66:693-701.
29. CARLING D. E.; S. KUNINAGA: 1990. «DNA Base Sequence Homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn: inter and Intragroup Relatedness of Anastomosis Group-9», *Phytopathology* 80:1362-1364.
30. CARLING, D. E.; S. KUNINAGA; K. A. BRAINARD: 2002a. «Hyphal Anatomosis Reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer Sequences, and Virulence Levels Among Subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-B1», *Phytopathology* 92:43-50, APS Press.
31. CARLING, D. E.; R. E. BAIRD; R. D. GITAITIS; K. A. BRAINARD; S. KUNINAGA: 2002b.«Characterization of AG-13, a Newly Reported Anastomosis Group of *Rhizoctonia solani*», *Phytopathology* 92:893-899, APS Press.

32. CHAVARRO E, SASTOQUE L, BELTRAN C, ANGEL J, COTES A. Detección de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa utilizando secuencias de ADNr-ITS en tres regiones de Colombia. 2007; Memorias, XXIII Congreso de la asociación latinoamericana de la papa-ALAP. Mar de la plata-Argentina. ISBN 978-987-544-275-7.
33. CEDEÑO, Luis, et al., 2001. Identificación y Virulencia de Grupos de Anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn Asociados con Papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* vol. 26 N° 7.
34. CERESINI, Paulo. 1999. *Rhizoctonia solani*. Pathogen profile. <<http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/rhizoctonia>.>
35. CERESINI, Paulo et al., 2002a. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*, 94(3), p. 437–449.
36. CERESINI, P. C.; D. H. SHEW; R. VILGALYS; L. U. ROSEWICH; M. CUBETA: 2002a. «Genetic Structure of Populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 on Potato in Eastern North Carolina», *Mycologia* 94:450-460.
37. CIP. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1996. Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa. Lima, Peru. 111 p.
38. CIP. Centro Internacional de la Papa. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Lima Perú. Pacific Press, S.A. p. 73-75.
39. COTES, Alba Marina. *Biología y Manejo de Rhizoctonia solani*. Laboratorio de Control Biológico Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB).
40. CREIGHTON, Thomas. *Encyclopedia of Molecular Biology*. Londres: John Wiley & Sons, Inc. 1999. p. 1619-1620, 2637-2638, 3738.
41. CROCKER, John y MURRAY, Paul. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. England: John Wiley & Sons, 2003. p. 195,196.
42. CUBETA, M. y VILGALYS, R., 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology* Vol. 87, No. 4: 480-484.
43. CUBETA, M. A.; R. VILGALYS; D. GONZÁLEZ. 1996. «Molecular Analysis of Ribosomal RNA Genes in *Rhizoctonia* Fungi», Sneh, B.; Jajabi-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G.:

- Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Diseases Control*, Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, Holanda, pp. 81-86.
44. CUBETA, M. A.; E. ECHANDO; T. ABERNETHY; R. VILGALYS: 1991.«Characterization of Anastomosis Groups of Binucleate *Rhizoctonia* spp. Using Restriction Analysis of an Amplified Ribosomal RNA Gene», *Phytopathology* 81:1395-1400.
  45. CHUNG, Y., HOITINK, A., DICK, W y HERR, L. 1988. Effects of organic matter decomposition level and cellulose amendment on the inoculum potential of *Rhizoctonia solani* in Harwood bark media. *Phytopathology*. Vol 78 (6):836-841.
  46. DICE, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*. 26:297 - 302.
  47. DICTIONARY OF THE FUNGI, 10th Edition. P M Kirk, CABI, UK, P F Cannon, CABI, UK, D W Minter, CABI, UK, J A Stalpers, CBS, The Netherlands. 2008. p. 784. <http://www.indexfungorum.org/Names/fundic.asp>.
  48. DIJST, G. 1990. Effect of volatile and unstable exudates from underground potato plant parts on sclerotium formation by *Rhizoctonia solani* AG-3 before and after haulm destruction. *Netherland Journal of Plant Pathology*. 96(3):155-170.
  49. DOMSCH, K. H., GAMS, W. y ANDERSON, T-H. 1980. Compendium of soil fungi. Vol 1. Academic Press. New York. p. 795-809.
  50. DUNCAN, S.; J. E. BARTON; P. A. O'Brien: 1993.«Analysis of Variation in Isolates of *Rhizoctonia solani* by Random Amplified Polymorphic DNA Assay», *Mycol. Res.* 97:1075-1082.
  51. ELBAKALI, Abdessamad, et al., 2003. Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopathologia Mediterranea* Vol. 42, No. 2.
  52. ESPINAL, Carlos et al., 2006. La Cadena de la Papa en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-Observatorio Agrocadenas Colombia.
  53. FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

54. FENILLE, Roseli, et al., 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* Associated with Soybean in Brazil by rDNA-ITS Sequences. *Fitopatologia Brasileira* 28:413-419.
55. GARCÍA, Rosaima. GARCÍA, Alba y GARNICA, Camilo., 2002. Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa* 13:24-40.
56. GARCÍA, C., RIVERO, R. y TORRES, E. 2000. Programa de investigación en patología de papa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional. En: *Papas Colombianas*. *Revista Papa*. Vol 3. N°1. p. 112-114.
57. GENE CODES CORP. 1996. Sequencher, version 5.0. Gene Codes, Ann Arbor.
58. GONZÁLEZ García, Marleny. 2008. Aspectos de sistemática y biología del Complejo rhizoctonia. *Fitosanidad*, vol. 12, núm. 3, septiembre, pp. 147-159.
59. GONZÁLEZ, V.; O. SALAZAR; M. C. JULIÁN; J. ACERO; M. A. PORTAL; R. MUÑOZ; H. LÓPEZ; E. GÓMEZ, P. LÓPEZ; V. RUBIO: 2002. «*Ceratobasidium albasitensis*, a New *Rhizoctonia*-Like Fungus Isolated in Spain», *Persoonia* 17:601-614.
60. GONZÁLEZ, D.; D. E. CARLING; S. KUNINAGA; R. VILGALYS; M. CUBETA: 2001. «Ribosomal DNA Systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* Anamorphs», *Mycologia* 93 (6):1138-1150.
61. GONZÁLEZ, V.; O. SALAZAR; M. C. JULIÁN; J. ACERO; M. A. PORTAL; R. MUÑOZ; H. LÓPEZ; E. GÓMEZ, P. LÓPEZ; V. RUBIO: 2002. «*Ceratobasidium albasitensis*, a New *Rhizoctonia*-Like Fungus Isolated in Spain», *Persoonia* 17:601-614.
62. GONZÁLEZ, D.; R. VILGALYS; M. CUBETA: 2006a. «Phylogenetics Utility of Indels Within Ribosomal DNA and  $\beta$ -Tubulin Sequences from Fungi in the *Rhizoctonia solani* Complex», *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:459-470.
63. GONZÁLEZ, V.; M. A. PORTAL-Onco; V. RUBIO-Susan: 2006b. «Review. Biology and systematics of the form Genus *Rhizoctonia*», *Spanish Journal of Agricultural Research* 4 (1):55-79, España,
64. GOODWIN, D.C., y LEE, S.B. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protist and animals for PCR. IN: *BioFeedback*. Vol. 15.
65. HAMMER O., PAST -Palaeontological Statistics, ver. 1.34. D.A.T. Harper and P.D.

66. RYAN. [http://folk.uio. no/ohammer/past](http://folk.uio.no/ohammer/past) KREBS, C. J. 1989. Ecological Methodology. Harper & Row, New York, 2005
67. HANTULA, J.; DUSABENYAGASANIY, M.; HAMELIN, R. C., 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur. J. For. Path. 26, 159-166
68. HARTL, D.L. y JONES, E.W. Genetics: Analysis of Genes and Genomes. Jones and Bartlett, 2001. p. 66-68.
69. HENSON, Joan y FRENCH, Roy. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 81-109.
70. HOOKER, WJ. 1986. Compendium of potato diseases. APS. 125 p
71. HUNTER, P. R. 1990. Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. Journal of Clinical Microbiology, 28:1903-1905.
72. HUNTER, P. R. y GASTON, M. A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 26, No. 11, p. 2465 -2466.
73. HERRERA, F., GÓMEZ, L. E., CORZO, P. y CERÓN, M. 2001. Producción y almacenamiento artesanal de semilla de papa. Corpoica Regional Uno. Boyacá-Cundinamarca. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. p. 1-10.
74. HOOKER, W. J. 1981. Compendium of potato diseases. The Amercian Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.
75. HILLIS, D. M.; S. K. DAVIS: 1986. «Evolution of Ribosomal DNA: Fifty Million Years of Recorded History in the Frog Genus *Rana*», *Evolution* 40:1275-1288.
76. HSIANG, T.; J. D. DEAN: 2001.«DNA Sequencing for Anastomosis Grouping of *Rhizoctonia solani* Isolates from *Poa annua*», *International Turfgrass Society Research Journal* 9:674-678.
77. ICHIELEVICH-Auster, M., SNEH, B., KOLTIN, Y. y BARASH, I. 1985. Pathogenicity, host specificity and anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. Isolated from soils in Israel. *Phytoparasitica* 13: 103-112.

78. ITURRALDE, M. J.; S. BALLESTERO; F. RAMÓN: 2002 «Retos en el diagnóstico de las intoxicaciones por setas», Simposio de Toxicología en homenaje a Manuel Repetto, Sesión IV, *Rev. Toxicol.* 19:97-144.
79. JUSTESEN, Annemarie Fejer, YOHALEM David, BAY Anne and NICOLAISEN Mogens. 2003. Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. *Mycol. Res.* 107 (11): 1323–133.
80. JAJABI-Hare, S. H.; Y. MELLER; S. GILL; P. M. CHAREST. 1990.: «Investigation of Genetics Relatedness Among Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* Using Cloned DNA Probes», *Can. J. Plant Pathol.* 12:393-404.
81. JOHNS, Stevens *et al.*, 1993. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG3 from potato and tobacco. *Phytopathology* 83: 854-858.
82. JUSTESEN, Annemarie; YOHALEM, David; BAY Anne y NICOLAISEN, Mogens. 2003. Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. *Mycol. Res.* 107 (11): 1323–1331.
83. KIMURA M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
84. KUNINAGA, S.; R. YOKOSAWA: 1980. «A comparison of DNA Base Composition Among Anastomosis Groups in *Rhizoctonia solani*», *Annu. Phytopathol. Soc. Japón* 46:150-158,
85. KUNINAGA, S.; 1984. «DNA Base Sequence Homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn V. Genetics Relatedness with AG-6», *Annu. Phytopathol. Soc.* 50:346- 352.
86. KUNINAGA, S.; T. NATSUAKI; T. TAKEUCHI; R. YOKOSAWA: 1997. «Sequence Variation of the rDNA ITS Regions Within and Between Anastomosis Groups in *Rhizoctonia solani*», *Current Genetics* 32:237-243.
87. KUNINAGA, Shiro *et al.*, 2000. Comparison of rDNA-ITS Sequences between Potato and Tobacco Strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 2-11.
88. KISTLER, H. C.; P. W. BOSLAND; U. BENNY; S. LEONG; P. H. WILLIAMS: 1987. «Relatedness of Strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers Measured by Examination of Mitochondrial and Ribosomal DNA», *Phytopathology* 77:1289-1293.

89. KLASSEN, G. R.; S. A. MCNABB; M. W. DICK: 1987. «Comparison of Physical Maps of Ribosomal DNA Repeating Units in *Pythium*, *Phytophthora* and *Apodachya*», *J. Gen. Microbiol.* 133:2953-2959.
90. LAROCHE, J. P.; JABAJI-HARE, S. H. y CHAREST P. M. 1992. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology* 82: 1387-1393.
91. LEHTONEN M. J., AHVENNIEMI P, WILSON P. S., M. GERMAN-Kinnari and J. VALKONEN P. T. 2007. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology*.
92. LEES, A. K. *et al.*, 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*. 51, 293–302
93. LEHTONEN, M. J. *et al.*, 2008. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology* 57, 141–151.
94. LIU, Z. L.; SINCLAIR, J. B. y CHEN, W. 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* 82: 778-787.
95. LUBECK, Mette y POULSEN, Hanne 2001. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. *FEMS Microbiology Letters* 201 83-89.
96. MACNISH, G.; CARLING D. y BRAINARD K. 1997. Relationship of microscopic and macroscopic vegetative reactions in *Rhizoctonia solani* and the occurrence of vegetatively compatible populations (VCPs) in AG8. *Mycological Research* 101, 61–8.
97. MATTHEW, J.; M. HERDINA; D. WHISSON: 1995. «DNA Probe Specific to *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 8», *Mycol. Res.* 99:745-750.
98. MAHMOUD, Y., GAAFAR, R. y MUBARAK H., 2006. Genetic Diversity among Nile Delta Isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn Based on Pathogenicity, Compatibility, Isozyme Analysis and Total Protein Pattern. *Turk J Bot.* p. 19-29.
99. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2004. Acuerdo de Competitividad de la Cadena Agroalimentaria de la Papa, para el Departamento de Boyacá.

100. MUÑOZ, C. *et al.* 2001. Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 59 p. 10-14.
101. MUÑOZ, J; MORILLO, A. y MORILLO, Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. Acta Agron (Palmira) 57 (4) p. 219-226.
102. MORALES, C., GARCÍA, H. y RODRÍGUEZ, G. 2000. Análisis de las pérdidas de papa durante la cosecha. En: Manejo Integrado del Cultivo de la Papa. Manual Técnico. CORPOICA – Regional Uno. Tibaitatá. p. 160-169.
103. NIETO, L.E. 1988. Enfermedades de la papa causadas por los hongos *Verticillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Puccinia*. En: Quinto curso de actualización de conocimientos en el cultivo de la papa. Fedepapa. p. 89-98.
104. NEI, Masatoshi 1973. - Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA: 3321-3323.
105. OICATA, L, M. 2001. Evaluación *in vitro* de la acción de *Rhizoctonia solani* Kühn., sobre la especie *Solanum tuberosum* L. Trabajo de Grado de Magíster Scientiae, área fitoprotección integrada. Facultad de Agronomía-Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.
106. OGOSHI, Akira. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 125-143.
107. OTRYSKO, B.; BANVILLE, G. y ASSELIN, A. 1985. Anastomosis group identification and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from tuberborne sclerotia. Phytoprotection 66:17-23.
108. PASCUAL, C., *et al.*, 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. Plant Pathology 49, 108–118.
109. PASSARGE, Eberhard. Color Atlas of Genetics. 2ª Edición. New York: Thieme Stuttgart, 2001. p. 62-64.
110. PEREZ, T., ALBORNOZ J. y DOMÍNGUEZ, A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. Molecular Ecology 7, 1347-1357

111. POWELSON, M.; JOHNSON, K. y ROWE, R. 1993. Management of diseases caused by soilborne plant pathogens. *In* Rowe, RC. Ed. Potato health management. APS. p. 149-158.
112. PRIYATMOJO, Achmadi. 1999. Mechanism of hyphal anastomosis in *Rhizoctonia solani* KUHN (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (FRANK.) Donk). Proceedings of the 8th Scientific Meeting (TI-VIII), pp. 257-260.
113. PRADO, G., CORREA, F., ARICAPA, M. y Escobar, F. 2001. Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn). Foro Arroceros Latinoamericano. 7(1):8-11.
114. PERDOMO, R.; A. HERNÁNDEZ; A. GONZÁLEZ; J. PINEDA; J. ALEZONES: 2007. «Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solana* Kuhn, causante de la mancha bandeada en maíz», *Interciencia* 32:48-55.
115. PRIYATMOJO, A.; V. E. ESCOPALAO; N. G. TANGONAN; C. B. PASCUAL; H. SUGA; K. KAGEYAMA; M. HYAKUMACHI: 2001. «Characterization of a New Subgroup of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 1 (AG-1-ID), Causal Agent of a Necrotic Leaf Spot on Coffee», *Phytopathology* 91:1054-1061, APS Press.
116. RODRÍGUEZ, Iram. y BARRERA, Hugo., 2004. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos Décadas de su Invención. *Ciencia UANL* Vol. 7, No. 3.
117. ROSEWICH, U.; B. A. McDonald: 1994. «DNA Fingerprinting in Fungi», *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5:41-48.
118. RODRÍGUEZ, K., RIVERO, R. y GARCÍA, C. 2000. Estudio de la incidencia de los principales patógenos en semilla de papa (*Rhizoctonia*, *Rosellinia*, *Spongospora*, *Erwinia*, *Streptomyces* y *Verticillium*). <<http://www.redepapa.org/infogeneralred/html>>
119. ROBERTS, P.: 1999. *Rhizoctonia-Forming Fungi: a Taxonomy Guide*, Royal Botanical Gardens, Kew.
120. SAITOU N & NEI M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
121. SWOFFORD D., L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

122. SANTOS, A. 2009. Caracterización de un prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella* para la protección de semilla de papa en almacenamiento. Tesis pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. D.C.
123. SHARON Michal, KUNINAGA Shiro, HYAKUMACHI Mitsuro, NAITO Shigeo, SNEH Baruch. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49:93–114.
124. SHARMA, M., GUPTA, S. y SHARMA T., 2005. Characterization of Variability in *Rhizoctonia solani* by Using Morphological and Molecular Markers. *J. Phytopathology* 153, 449–456.
125. SNEATH, P. H. y SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W. H. Freeman. p. 573.
126. SALAZAR, O.; J. H. SCHNEIDER; M. C. JULIAN; J. KEIJER; V. RUBIO: «Phylogenetic Subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG 2 Isolates Based on Ribosomal ITS Sequences», *Mycologia* 91:459-467, EE.UU., 1999.
127. SALAZAR, O.; M. C. JULIAN; M. HYAKUMACHI; V. RUBIO: 2000. «Phylogenetic Grouping of Cultural Types of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 Based on Ribosomal ITS Sequences», *Mycologia* 92:505-509.
128. SNEH, B., BURPEE, L. y OGOSHI, A. 1998. Identification of *Rhizoctonia* Species. St. Paul, Minnesota, USA. APS Press. pp. 135.
129. TAMURA K, Dudley J, NEI M & KUMAR S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
130. TORRES, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. CIP. p. 19-22. <<http://www.cipotato.org/training/materials/Htorres>>
131. TODA, T.; M. HYAKUMACHI; H. SUGA; K. KAGEYAMA; A. TANAKA; T. TANI: 1999. «Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolates from Turfgrass Into Subgroups I and II Based on rDNA and RAPD Analysis», *Eur J. Plant. Pathol.* 105:835-846.

132. THORNTON, C. R. *et al.*, 1999. Detection and recovery of *Rhizoctonia solani* in naturally infested glasshouse soils using a combined baiting, double monoclonal antibody ELISA. *Plant Pathology* 48, 627–634.
133. THWAITES, R., MANSFIELD J., GREEN-EDEN, S. AND SEAL, S., 1999. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa spp.* *Plant Pathology*. 48:121-128.
134. TORO, Henry. 1998. Principales Enfermedades de la Papa Criolla (*Solanum phureja* JUZ et BUCK) en Colombia. Manizales, Universidad de Caldas. Fitopatología: 021.
135. THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., 1994. CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
136. VILGALYS, R.; M. CUBETA: 1994. «Molecular Systematics and Population Biology of *Rhizoctonia*», *Annual Review of Phytopathology* 32:135-155.
137. VILGALYS, R.: 1988. «Genetics Relatedness Among Anastomosis Groups in *Rhizoctonia solani* as Measured by DNA/DNA Hybridization», *Phytopathology* 78:698-702.
138. VILGALYS, R.; D. GONZÁLEZ: 1990a. «Organization of Ribosomal DNA in the Basidiomycete *Thanatephorus praticola*», *Curr. Genet.* 18:277-280.
139. VARGAS, Elsa y CASTRO, Reinaldo. La Costra Negra de la Papa. Plagas y Enfermedades de la Papa. Bogotá, ALARCON, John y GALINDO, José, 2001. p 35-38.
140. YILDIZ, A. y TIMUR, M. 2002. Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kühn (Teleomorf: *Thanatephorus cucumeris*) isolates from tomatoes grown in Aydin, Turkey and their disease reaction on various tomato cultivars. *J. Phytopathology* 150:526-528.
141. YANG, H. A.; K. SIVASITHAMPARAM; J. E. BARTON; P. A. O'BRIEN: 1995. «Characterization of Cereal Bare Match Isolates of *Rhizoctonia solani* by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis», *Plant Pathol.* 44:811-818.
142. WHITE, T. J.; T. BRUNS; S. LEE; J. W. TAYLOR: 1990. «Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics», *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego. Academic Press, pp. 315-322.

143. WOODHALL, J. *et al.*, 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology* 56, 286–295
144. ZAPATA, J. L. 2000. Manejo integrado de las enfermedades de la papa. En: Manejo Integrado del Cultivo de la Papa. Manual Técnico. CORPOICA- Regional Uno. Tibaitatá. p. 130-141.
145. ZIETKIEWIGZ, E.; RAFALSKI, A. y LABUDA, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-1

