

# SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE PCR EN LA DETECCIÓN DE TELIOSPORAS DE THECAPHORA FREZII EN SEMILLAS DE MANÍ

Cazón, I.<sup>1</sup>; Conforto, C.<sup>1</sup>; Paredes, J. A.<sup>1</sup>; Bisonard, E.M.<sup>2</sup> y Rago, A.<sup>1,3</sup>  
1- IPAVE-CIAP-INTA. 2- CIAP-INTA. 3- Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC  
cazon.ignacio@inta.gob.ar

## Introducción

El carbón del maní es actualmente una de las enfermedades de mayor importancia para el sector manisero argentino. Es causada por el hongo *Thecaphora frezii* que sobrevive en el suelo en forma de teliospora. Ésta germina estimulada por el ginecóforo al momento del clavado, y lo coloniza produciendo de esta manera una infección local que tiene como resultado la formación de frutos total o parcialmente carbonosos. Entre los diferentes medios de dispersión del patógeno, el más eficiente a largas distancias es la semilla. Las teliosporas pueden estar como contaminantes externos al grano o en pequeños soros. La contaminación superficial se produce principalmente en el proceso de descapotado, donde los frutos que se encuentran total o parcialmente carbonosos, liberan teliosporas que se adhieren a la superficie de granos sanos. Para su detección se ajustó un protocolo de diagnóstico utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para lo que se diseñaron primers específicos optimizando las condiciones de reacción. Además de *T. frezii*, existen otros patógenos que pueden ser contaminantes en semillas. Los más importantes son *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Debido a que se desconoce el límite de detección del método de diagnóstico, el objetivo de este trabajo fue determinar la especificidad y sensibilidad de la PCR convencional en la detección de teliosporas de *T. frezii* en semillas de maní.

## Materiales y métodos

Para comprobar la especificidad del sistema de diagnóstico se analizaron cuatro aislamientos de *T. frezii* provenientes de diferentes zonas productoras de maní: dos de General Deheza (Cba-GD1, Cba-GD2) y una de Charras (Cba-CH1), en Córdoba y una de Embarcación (Sa-EM1), Salta. Se realizó la extracción de ADN de los mismos y de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* (Sc-r), *Sclerotinia minor* (Sc-m) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Sc-s) (Tabla 1). Se llevó a cabo una PCR usando los primers específicos diseñados para *T. frezii*, TF-2F (5'ATGTCAAAGAGTGCGAAGAC3') y TF-2R (5'TATCTTGCTGGTAGGCTGTT3') y se analizaron los resultados. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguida de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; con una extensión final a 72 °C por 5 min.

Para la determinación de la sensibilidad del método de PCR en la detección de *T. frezii* se realizaron suspensiones de teliosporas en diferentes concentraciones:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 10, 1 y 0 teliosporas/ml. Las mismas se obtuvieron realizando diluciones sucesivas. Se realizó la extracción de ADN de los pellets resultantes del centrifugado de las suspensiones y se llevó a cabo una PCR bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV.

## Resultados y discusión

En la prueba de especificidad, para todos los aislamientos correspondientes a *T. frezii* (Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1, Sa-EM1) se obtuvieron bandas de 190 pb al usar los primers específicos TF-2F / TF2R en la mezcla de reacción. Para los aislamientos Sc-m (*S. minor*), Sc-s (*S. sclerotiorum*) y Sc-r (*S. rolfsii*) se observaron resultados negativos bajo las mismas condiciones de PCR (Figura 1). En las pruebas de sensibilidad, se obtuvieron productos de amplificación en las suspensiones con  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  y 10 teliosporas/ml, siendo esta última cantidad, la mínima detectable usando la técnica de PCR. Los resultados fueron negativos en la suspensión con 1 teliospora/ml y el control sin teliosporas (Figura 2). Los resultados negativos obtenidos con otros patógenos que pueden ser transportados con la semilla evidencian la elevada especificidad del método de detección, que combinado con la sensibilidad del mismo, le otorgan confiabilidad a los resultados. Estas características confirman la importancia de las herramientas moleculares en los estudios epidemiológicos del carbón del maní.

Tabla 1. Resultados de pruebas de especificidad por PCR con primers específicos para la detección de *T. frezii*

<u>Especies fúngicas</u>	<u>Aislamiento</u>	<u>Reacción con TF-2F / TF-2R</u>
<i>T. frezii</i>	Cba-GD1	+
<i>T. frezii</i>	Cba-GD2	+
<i>T. frezii</i>	Cba-CH1	+
<i>T. frezii</i>	Sa-EM1	+
<i>Sclerotinia minor</i>	Sc-m	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sc-s	-
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Sc-r	-

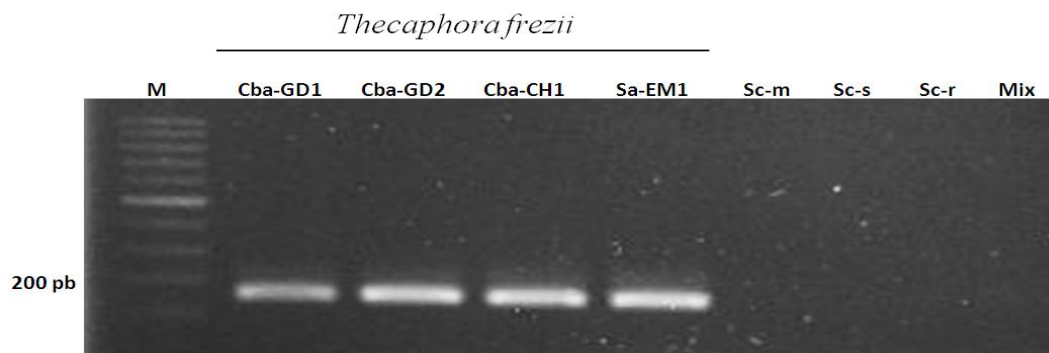


Figura 1. Gel de agarosa con los productos de reacción de PCR usando los primers específicos diseñados para *T. frezii*. **M**: Marcador molecular (100 pb). **Cba-GD1**, **Cba-GD2**, **Cba-CH1**, **Sa-EM1**: Aislamientos de *T. frezii*. **Sc-m**: *Sclerotinia minor*. **Sc-s**: *Sclerotinia sclerotiorum*. **Sc-r**: *Sclerotium rolfsii*. **Mix**: Mezcla de reacción.

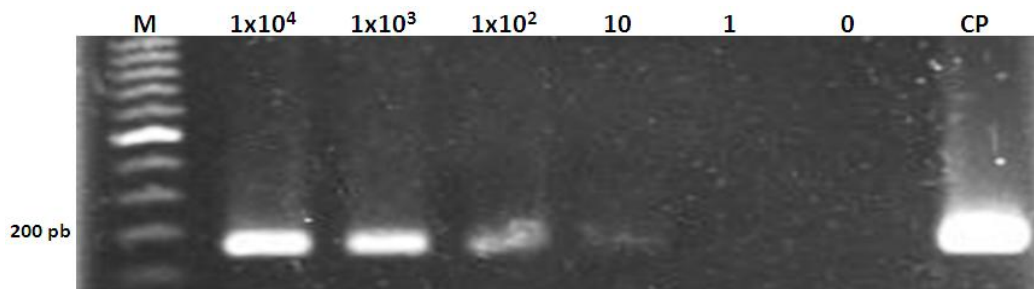


Figura 2. Gel de agarosa con los productos de reacción de PCR usando ADN extraído de las suspensiones de *T. frezii* con diferentes concentraciones de teliosporas. **M**: Marcador molecular (100 pb). **De 1x10<sup>4</sup> a 1**: ADN extraído de suspensiones de teliosporas de *T. frezii* en diferentes concentraciones. **0**: Control negativo. **CP**: Control positivo

Financiamiento: Programa Nacional de Cultivos Industriales - INTA.