

PODREDUMBRE PARDA DE LA RAÍZ DE MANÍ: ACTUALIZACIÓN EN EL ESTUDIO DEL PATÓGENO

Reynoso M.M.¹, Casasnovas F.¹, Fantini E.N.¹, Giaj-Merlera G.¹, Palacios S.A.¹, Oddino C.², Torres A.M.¹

1- Dpto. de Microbiología e Inmunología, FCEFQyN, UNRC 2- FAV, UNRC

atorres@exa.unrc.edu.ar

Introducción

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo económicamente importante para la provincia de Córdoba, donde se lleva a cabo la mayor parte de la producción nacional. Actualmente Argentina se ha convertido en uno de los principales exportadores de maní de calidad a nivel mundial, dedicándole un 90% de la producción total. En la última década se ha observado una marcada disminución en el número de productores dedicados a dicho cultivo debido a causas económicas, agronómicas y tecnológicas, siendo las enfermedades causadas por hongos una de las causas.

La podredumbre parda de la raíz del maní (PPRM) es una enfermedad que se ha citado con características epidémicas en Argentina, pero que también ha sido reportada en diferentes países donde se realiza el cultivo de maní tales como Indonesia, Pakistán, Egipto y Australia. En nuestro país, se observó por primera vez en cultivos del área rural de Carnerillo y Manfredi (provincia de Córdoba) en la campaña agrícola 1992/93. Desde entonces se ha diseminado paulatinamente a la mayor parte de la región productora, presentándose cada año con incidencia variable entre lotes. Se ha reconocido al agente causal de ésta enfermedad, como miembro del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) aunque no ha sido estudiado en profundidad. Actualmente, el FSSC comprende aproximadamente 50 especies filogenéticamente distintas, morfológicamente sus miembros son idénticos o muy similares, y es imposible diferenciar las cepas patógenas de las saprofitas.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el patosistema *Fusarium solani* - maní, para determinar las características genéticas distintivas que permitan la identificación del patógeno y el desarrollo de una metodología para el diagnóstico de su presencia en suelo y plantas. Además se realizaron ensayos a campo para evaluar un formulado a base de *Trichoderma* para controlar la enfermedad.

Materiales y Métodos

Para los ensayos de patogenicidad en invernadero se utilizaron cepas, aisladas previamente en nuestro laboratorio a partir de raíces con síntomas de podredumbre parda de la raíz de maní, las cuales fueron identificadas como pertenecientes al complejo *F. solani* por metodología clásica. Se realizaron análisis filogenéticos usando las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal, y los genes EF-1- α y PBR2 con el fin de confirmar la identificación taxonómica del patógeno. Además se desarrolló una técnica diagnóstica basada en PCR, con el diseño de cebadores específicos que permitieran la detección del patógeno en muestras de suelo y de plantas. Para dicho desarrollo se utilizaron metodologías de biología moleculares tales como AFLP y secuenciamiento de genes.

Resultados y Discusión

En todas las plantas desarrolladas en suelos inoculados con las cepas de *F. solani* PPRM, se observó diferencias de coloración entre las hojas de las plantas tratadas y el control. En general, dichas plantas presentaron marchitamiento de la rama principal, con pérdida de turgencia, opacidad en la coloración (verde seco y claro) y epinastía de hojas, comparado con un verde oscuro de las plantas no inoculadas. Aunque no se observaron plantas de maní muertas en ninguno de los tratamientos ni en el control negativo, se observó una mayor resistencia al estrés hídrico en las plantas desarrolladas en suelos no inoculadas con el patógeno. La recuperación del estado de las plantas tratadas fue igual a la del control cuando se reanudaron los ciclos de riego luego de cada estrés hídrico. Cuando se realizó la observación visual de las raíces para evaluar síntomas de la enfermedad se observó que las plantas tratadas presentaban los síntomas característicos, presencia parcial o total de coloración oscura y podredumbre.

A fin de comprobar los postulados de Koch, se cultivaron 10 muestras de raíces sintomáticas y asintomáticas de cada tratamiento en el medio PCNB. Cada muestra se desinfectó superficialmente a fin de aislar el patógeno desde el tejido interno de la raíz. De todas las plantas se logró el reaislamiento de la misma especie de

Fusarium con idénticas características morfológicas observadas al momento de la inoculación. La recuperación de las cepas de *F. solani* desde las raíces sintomáticas y asintomáticas cumple con los postulados de Koch y confirma que todas las cepas evaluadas son capaces de invadir la raíz del maní y debilitar la planta haciéndola menos resistente al estrés hídrico. El material vegetal enfermo colectado se conservó a -20° C hasta el momento de la extracción de ADN y posterior amplificación mediante PCR usando los cebadores específicos.

Los resultados obtenidos del análisis filogenético usando las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal, y los genes EF-1 α y PBR2, realizado a un total de 17 cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de la enfermedad, confirmaron que el agente etiológico pertenece a dos especies filogenéticas del FSSC, llamadas FSSC 5 y FSSC 3+4 ubicadas dentro del Clade 3 del complejo.

Los cebadores específicos diseñados a partir de marcadores moleculares (AFLPs), FS1 y FS2, permitieron la detección de las dos especies filogenéticas, FSSC 5 y FSSC 3+4 (*F. falciforme*) causantes de la podredumbre de la raíz de maní en muestras de suelo artificial y naturalmente contaminado, como así también en raíces enfermas (Figura 1). La especificidad y el alto grado de sensibilidad de los ensayos de PCR llevados a cabo para *F. solani* causante de podredumbre parda de la raíz de maní, proporcionan una buena herramienta para la detección temprana de dicho patógeno en muestras de suelo que serán destinadas al cultivo de esta oleaginosa, permitiendo de esta manera diseñar estrategias para prevenir la enfermedad y asegurar un apropiado manejo de la misma, además de ser de gran utilidad para la investigación básica en epidemiología y genética de poblaciones de hongos.

Los ensayos a campo donde se inocularon semillas de maní con la cepa de *Trichoderma harzianum*, en campos natural y artificialmente infestados con el patógeno mostraron una reducción en el índice de severidad de la enfermedad, un mayor número de plantas sanas y aumento de rendimiento del cultivo. Los resultados obtenidos sugieren que el bioformulado a base de *T. harzianum* representa una estrategia no contaminante de uso potencial como biofertilizante y/o biopesticida. Estudios actuales están dirigidos a evaluar su impacto sobre la microbiota nativa, como así también su posible eficacia para el control de otros fitopatógenos de maní de importancia regional y nacional.

Se continúa trabajando en la combinación de agentes microbianos con la combinación de bacterias y hongos para su uso no solo como biocontroladores sino también como promotores de crecimiento de la planta.

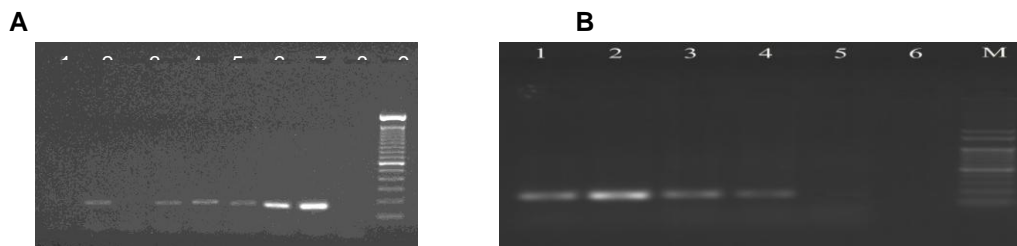


Figura 1.A) Productos de amplificación por PCR utilizando ADN total extraído a partir de muestras de suelo naturalmente contaminados de la zona de General Cabrera. Línea 1: suelo infectario (SI) (sin diluir). Línea 2: suelo Criadero del Carmen (SCC) (sin diluir). Línea 3: suelo SI dilución 1:2. Línea 4: suelo SSC dilución 1:2. Línea 5 – 6: controles positivos (suelo artificialmente contaminado). Línea 7 – 8: controles positivos (cepas MR386 y J). Línea 9: control negativo de reactivos (son ADN templado). M: Marcador de 100pb. **B)** Reacción de PCR usando como templado ADN de raíces de maní infectado por *F. solani* causante de la PPRM. Línea 1: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR386 dilución 1:50. Línea 2: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR319 dilución 1:32. Línea 3: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR338 dilución 1:50. Línea 4: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR436 dilución 1:50. Línea 5: muestra de raíz de maní sin síntomas. Línea 6: control negativo con agua destilada. M: Marcador de 100 pb.