

TEST DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE *SEPTORIA TRITICI* EN SEMILLA DE TRIGO: EFICAZ POR SOBRE OTRAS TÉCNICAS DE RUTINA I

Consolo, Verónica Fabiana¹, Albani, Clara¹; Berón, Corina¹;
Salerno, Graciela¹ y Cordo Cristina A².

¹Centro de Investigaciones Biológicas(FIBA),²CIDEFI-Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata faconsolo@fiba.org.ar

Plabras clave: *Mycosphaerella graminicola*, detección, PCR, trigo, mancha de la hoja, *Septoria tritici*

Resumen

El hongo *Septoria tritici* Rob. ex Desm. [teleomorfo *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter] es un importante patógeno del cultivo de trigo que causa la "septoriosis" o mancha de la hoja. A nivel mundial el patógeno produce severas pérdidas en su rendimiento. (entre el 31 y el 54 %). Con la adopción generalizada de la SD y el uso de fertilizantes, el rendimiento productivo es sostenido, aunque en ocasiones se ve fuertemente disminuido por el aumento de la septoriosis. La semilla producida en SD se caracteriza por una mayor incidencia de microorganismos patógenos (Carmona et al. 1990, Krupinsky, 1999) resultando sumamente importante contar con test de rápida implementación que garantice la presencia de semillas libre o con bajo nivel de infección por septoriosis.

Las plántulas pueden ser infectadas luego de la emergencia y bajo condiciones favorables de temperatura y humedad (Lovell et al. 1997, Hunter et al. 1997). Se ha demostrado que las ascosporas y picnidiosporas, dispersadas por el viento y la lluvia son las fuentes primarias de inóculo de la enfermedad Cordo et al. 2005. Este se transfiere verticalmente a las partes superiores de la planta Lovell et al. 1997. Por otra parte, se ha postulado que los rastrojos de trigo y las semillas podrían ser una importante fuente de transmisión de la enfermedad a través de los continentes (Banke and McDonald, 2005, Cordo et al. 2006). El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método diagnóstico que permita detectar con gran sensibilidad la presencia de ADN del hongo *S. tritici* en semillas de trigo y comprobar su eficacia comparando este test con otras técnicas convencionales para el estudio de la sanidad de la semilla.

Materiales y Métodos

Para el desarrollo experimental se utilizaron semillas de 5 variedades comerciales u tres líneas experimentales que provinieron de plantas infectadas naturalmente en la zona endémica triguera para esta enfermedad

Se desarrolló una estrategia basada en la técnica convencional de PCR para detectar el hongo *S. tritici*, diseñando cebadores especie específicos para amplificar la región ITS del ADNr y una región codificante del gen de la α -tubulina de *S. tritici*. Cuatro oligonucleótidos dentro de la región α -tubulina y dos oligonucleótidos dentro de la región ITS se diseñaron basados en las diferencias en las secuencias entre *S. tritici* y otros hongos y las plantas de trigo, conteniendo un promedio G+C variable entre 45 y 72%.

Para la detección en semilla un mínimo de 100 de estas por cultivar se esterilizaron superficialmente por remojo en bicloruro de mercurio al 0.01% en 1%

etanol durante 2 minutos y dos veces con agua demonizada estéril. Para favorecer la proliferación de micelio dentro de la semilla estas se incubaron en cámara húmeda durante 48h e inmediatamente se congelaron a -20°C , se liofilizaron y se convirtieron en polvo fino por acción en un mortero. Para cada extracción de ADN Total genómico, 0,1g (20 semillas) de semillas liofilizadas se utilizó con el Kit de DNAeasy Plant mminiKit (Qiagen, Hilden Germany). La calidad del ADN y la concentración se determinaron con un espectofotómetro y electroforesis en 1% de agarosa. Las amplificaciones se hicieron usando cada praimer presente en la lista de la Tabla 1 y las condiciones de PCR fueron ajustadas para cada par de primers. Cinco repeticiones fueron realizadas para cada experimento. Los productos de amplificación se secuenciaron y la sensibilidad y especificidad de los primers se probó preparando en buffer Tris-EDTA diluciones seriadas de ADN de *S.tritici* con concentraciones que variaron desde 5ng/ μl a 1fg/ μl . Para establecer el límite de detección del ensayo de PCR se utilizaron semillas cosechadas desde plantas con diferentes niveles de severidad en hoja bandera (altamente infectadas con más del 50% de cobertura picnidial en hoja; medianamente infectadas con 40 a 50 %, baja infección con menos del 40% y sin infección con 0%.

Para demostrar la eficacia de este test se aplicaron otras técnicas para evaluar la sanidad de la semilla.

Para comprobar la presencia del patógeno adherido al pericarpio de la semilla: se realizó el lavado de la misma en agua destilada estéril y tween 80 durante 40 minutos en agitador magnético a 150rpm. Se sembró el agua de lavado en medio agar malta con cloranfenicol (500mg/1000mL) y sin antibiótico. Las siembras se realizan en diluciones 1/10 seleccionando 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ; En total se evaluaron 200 cajas de Petri que correspondieron a proporciones iguales de medio con y sin antibiótico. La observación fue después de los 4 y 10 días de incubación.

Para comprobar la presencia del patógeno en las capas internas al pericarpio y /o endosperma: las mismas semillas lavadas se desinfectaron con alcohol 70% 1 min., hipoclorito de sodio comercial (1:1, V:V. de hipoclorito de sodio 20g/L: agua destilada estéril) 5 min. Se enjuagó en agua destilada estéril, se secó entre papel de filtro y se incubó durante 24h; se cortaron por la mitad y se sembraron las mitades desinfectadas sobre medio agar malta con y sin antibiótico (cloranfenicol 500mg/L). Una variedad, dos líneas derivadas de un cruzamiento susceptibles y una variedad de menor susceptibilidad al patógeno, se ensayaron con esta técnica. Los resultados se registraron a los 5 y 10 días de incubación.

Para comprobar la presencia del micelio del hongo, en los primeros estadios de la germinación del grano de trigo, se realizaron cortes histológicos, con coloración y posterior observación microscópica desde las estructuras vegetativas y desde el cariopse del cultivar susceptible Pro INTA Gaucho de plantas naturalmente infectadas. Del grano se observó la zona del escudete, del coleoptile, hojas seminales, raíz primaria rudimentaria y coleorriza; de las estructuras vegetativas se observó los estadios de tallos con crecimiento primario, es decir, GS11 (Zadoks et al. 1974) (primera hoja abierta) es el momento en que se forma el primer nudo visible; este se encuentra en el tallo envuelto por el primordio de hoja aproximadamente a 4 cm desde la base adherida al grano, es el estadio en el que se identifica el primordio de la espiga formado unilateralmente y GS 30, (segundo nudos visible o pseudotallo

alargándose), donde la espiga está diferenciada bilateralmente, y a 2,5cm del primer nudo. Se procesaron por la técnica de deshidratación en alcoholes, inclusión en parafina, coloración con safranina y verde rápido (Johansen, 1940) y montaje en portaobjetos para su observación microscópica.

Resultados y Discusión

Se obtuvieron fragmentos de ADN únicos, del tamaño esperado a partir de ADN de *S. tritici* con todos los pares de cebadores diseñados, los cuales amplificaron fragmentos detectables a partir de tan sólo 0.5 pg de ADN de *S. tritici*. La incubación en cámara húmeda o en un medio líquido nutritivo, durante 24-28 h previo a la liofilización de los granos resultó apropiada, por cuanto se aseguró el aumento de biomasa fúngica en la semilla garantizando la amplificación del material fúngico.

Fue posible detectar DNA de *S. tritici* en granos que provenían de plantas con una severidad del 35% o menos de porcentaje de cobertura picnidial.

Tal como lo recomendara la Guía de enfermedades en plántula para los cereales 2007 (Government of Saskatchewan), se estableció para la Septoriosis en trigo y cebada, que no se practican test de rutina en los laboratorios para esta enfermedad; no obstante se recomienda no usar semillas con un alto nivel de infección, especialmente si el nivel de germinación es bajo. Además agrega que los tratamientos con fungicida no proveen protección contra la mancha de la hoja y las glumas cuando la infección se ha desarrollado tardíamente en la estación vegetativa del cultivo.

No se logró demostrar la presencia de *S. tritici* **en la superficie del grano**, con la técnica de lavado de la semilla e incubación en medios nutritivos. Por la observación de 200 cajas de Petri con el cultivo del agua de lavado se describió la típica micoflora saprofitica del pericarpio del grano, de rápido desarrollo que impidió el crecimiento de *Septoria tritici*. Para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se identificaron: dos especies de *Alternaria*, *Epicoccum* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., dos especies de *Trichoderma*. y como patógeno, *Drechslera tritici-repentis*. Con las diluciones menores no fue posible esta identificación.

No se logró demostrar la ubicación del patógeno **en las diferentes capas de la cubierta de la semilla ni de la capa de aleurona, ni aún entre el embrión y el endosperma**. Con la observación de 250 cajas de Petri con el cultivo de las mitades de granos desinfectados y posterior incubación en medio agar malta con y sin antibiótico se cuantificó la presencia de *Trichoderma* sp. como la especie más abundante (45% de las muestras); también se identificaron *Torula* sp., *Rodotorula* sp., *Aspergillus* sp. y partículas de almidón.

A partir de la observación de los cortes histológicos teñidos diferencialmente, en los cortes longitudinales del primer nudo visible, como también en corte longitudinal del coleoptile y hojas seminales se detectaron estructuras compatibles con hifas de hongos, resultando imposible asociarla al patógeno en cuestión.

Con las técnicas rutinarias de incubación en medios de cultivo, no se han obtenido los resultados esperados dado que *S. tritici* crece con un ritmo menor que los saprófitos de la cobertura seminal; por tanto el patógeno se ve enmascarado por las otras especies. Para el caso de la emergencia del micelio desde las capas internas y aún del endosperma, tampoco se evidenciaron colonias típicas del crecimiento de este patógeno. Cabe probar si la presencia del embrión vivo del

grano de trigo, en el momento de activarse produjo enzimas que inhibieron al patógeno tal como lo puntualizara Elekes (1983) para algunas especies de *Fusarium*, *Bipolaris* y *Alternaria*. Por último si bien con la técnica de cortes histológicos fue posible identificar células fúngicas, al asociar el color de las estructuras con la composición celulósica de las paredes hifales, no fue posible asegurar que esas células fúngicas pertenecieran a *S. tritici* a pesar de haberlas encontrado en el primer nudo visible y en el grano mismo, entre las capas de aleurona. Todas estas evidencias conducen a aceptar y recomendar a la técnica de PCR como la más indicada para detectar tempranamente la infección no visible, haciendo un diagnóstico rápido y sensible.

Resultó ser más rápida, específica, y segura en la obtención de resultados, al compararla con otras técnicas convencionales de observación de patógenos en semilla. Es recomendado para implementar en Semilleros oficiales, privados, criadores de semilla original, y organismos encargados de la fiscalización de la calidad de la semilla libre de este patógeno.

Los resultados obtenidos con la metodología de PCR aplicada a la semilla aseguran su implementación para el diagnóstico presintomático de la enfermedad y por lo tanto, para su uso como método preventivo.

Conclusiones

Dado que las técnicas convencionales para estudiar la sanidad de la semilla no aseguran resultados confiables, es que se recomienda la técnica de PCR, por ser específica, rápida, y por detectar fracciones inferiores a picogramos de DNA de células fúngicas.

Referencias

- Banke, S.; McDonald, B.A. 2005 Migration patterns among populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molec. Ecol.* 14:1881-1896.
- Carmona, M., Reis, E.M., Cortese, P. 1990. Manchas foliares del trigo (mancha amarilla y septoriosis de la hoja) diagnóstico, epidemiología y nuevos criterios para el manejo. *Basf Argentina S.A. Ediciones.* 32pp.
- Cordo, C.A., Simón M.R., Perelló, A.E., Bayo, D., Kripelz N., Larran S. 2005. Environmental factors affecting the release, and dispersal of pycnidiospores and ascospores of *Mycosphaerella graminicola*. 7th International Wheat -- Conference:131. Mar del Plata.
- Cordo C.A., Linde, C., Zhan J., McDonald B. 2006. Genotypic Diversity of the wheat leaf pathogen (*Septoria tritici*) in Buenos Aires Province. *Bol.Soc.Argent.Bot.* 41 (3-4): 293-305.
- Elekes, P. 1983. Methods for detecting hyphal and living fungal infection in wheat seed samples. *Seed Sci. and Technology*, 11:421-433.
- Guidelines for Seed-Borne Diseases of Cereals Crops-2007 Agricultural Government of Saskatchewan. 7pp. On-line version.
- Johansen, A.D. 1940. *Plant microtechnique*. 1Ed. McGraw Hill, New York. 503p.
- Krupinsky, J.M. 1999. Influence of cultural practices on *Septoria/Stagonospora* diseases. In *Septoria and Stagonospora Diseases of cereals A compilation of global Research*. Mvan Ginkel, McNab A., Krupinsky J. Editors. 105-110p. *Cimmyt. Mexico*.

- Hunter, T.; Coker, R.R. and Royle, D.J. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of *Septoria tritici* blotch on winter wheat in the UK. 1999. Plant Pathology 48: 51-57.

. 1999.

-Lovelley, D.J., Parker, T., Hunter, D.J., Royle D.J., Coker R.R. 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. Plant Pathology 46:126-138.

-Zadocks, J.C.T., Chang, T., Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Res. 14:415-421.

Tabla 1- Cebadores específicos diseñados y tamaño esperado de los productos de amplificación del gen α -tubulina y de la región ITS a partir de ADN de *S. tritici*

Par de Cebadores	Posición (pb)	Tamaño del fragmento esperado (pb)
A/B	95 444	349
C/D	134 1341	1207
C/E	869 1341	469
C/F	866 1341	473

Fig.1 Amplificación de fragmentos de ADN de *S. tritici* por PCR- **A** par de cebadores C/F la banda en 1 corresponde a ADN de *S. tritici*.; 12,13,14,15,16,17, amplificación del ADN del hongo presente en cruza y variedades de trigo; 18 control negativo con agua. Otros números con ausencia de bandas corresponden al ADN de otros patógenos foliares. Marcador de peso molecular ADN del fago lambda digerido con enzima Pst1

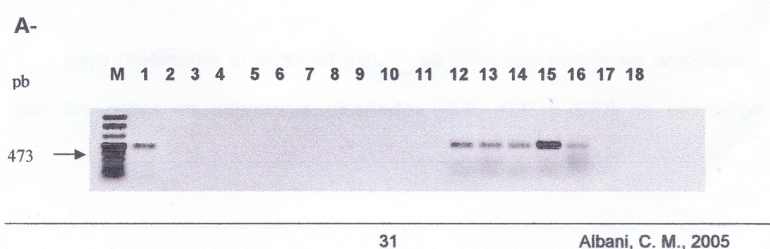


Fig. 2- Amplificación de fragmentos de ADN de *S. tritici* por PCR- **B** par de cebadores A/B, la banda en 1 corresponde a ADN de *S. tritici*; 12,13,14,15,16,17, amplificación del ADN del hongo presente en cruza y variedades de trigo; 19 control negativo con agua. Otros números con ausencia de bandas corresponden al ADN de otros patógenos foliares. Marcador de peso molecular ADN del fago lambda digerido con enzima Pst1.

