

# CUANTIFICACIÓN DE TELIOSPORAS DE *Thecaphora frezii* EN MUESTRAS DE SUELO POR LA TÉCNICA DE qPCR

Bernardi Lima N.<sup>1,2,3</sup>, Alcalá R.<sup>1</sup>, Brandimarte S.<sup>1</sup>, Monetti M.<sup>4</sup>, Toledo M.<sup>5</sup>, Canale A.<sup>5</sup>, Paredes J.A.<sup>1,2</sup>, Pérez I.A.<sup>1</sup>, Morichetti S.<sup>6</sup> Rago A.M.<sup>7,8</sup>, Margonari V.<sup>9</sup>, Conforto C.<sup>1,2</sup>

1- IPAVE-CIAP-INTA 2-UFYMA-CONICET 3-FCA-UNCA 4-INTA AER General Cabrera-INTA 5-INTA AER Río Cuarto 6-AGD 7-Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC 8- CIAP-INTA 9-INTA AER Jesús María  
conforto.cinthia@inta.gob.ar

## Introducción

En el marco de un Proyecto Local de INTA y un Convenio de Asistencia Técnica con la Fundación Maní Argentino, se busca generar información útil para una economía regional clave para la provincia de Córdoba, como es la del maní, articulando la extensión y la investigación, con el objetivo de mitigar el impacto del carbón, enfermedad causada por *Thecaphora frezii*.

*T. frezii* es un hongo que permanece en el suelo mediante sus estructuras de resistencia, las teliosporas (Marinelli et al. 2008). El patógeno infecta las vainas, transformándolas en una masa carbonosa de teliosporas, que son dispersadas por la maquinaria, la semilla y el viento (Rago et al. 2017). La cantidad de teliosporas presentes en el suelo puede variar entre lotes, lo que puede reflejarse a través de la incidencia de la enfermedad. El carbón es una enfermedad monocíclica y uno de los parámetros que mejor explica la epidemia es el inóculo inicial presente en el suelo, al momento de la siembra (Oddino et al. 2010). Es así, que al momento de la implantación del cultivo la elección de lotes con baja densidad de inóculo es una estrategia fundamental y preventiva de gran impacto en el manejo integrado de la enfermedad. Los registros y el mapeo del patógeno con precisión permitirán conocer el estado de avance y determinar zonificaciones de la enfermedad en función de la densidad de inóculo presente en los lotes, disminuyendo pérdidas de producción y el incremento de la enfermedad.

Es por esto, que, en busca de una metodología específica, sensible y rápida para cuantificar inóculo, planteamos la puesta a punto de la técnica de qPCR, que presenta como ventaja principal la detección y cuantificación directa de inóculo en muestras de suelo, aún a bajas cantidades.

## Materiales y Métodos

Para validar la metodología de qPCR propuesta, nos basamos en la cámara de Neubauer, realizando un total de 6 repeticiones por cada muestra de suelo, inoculada artificialmente con concentraciones de teliosporas conocidas ( $2 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $2 \times 10^{-1}$  gramos de teliosporas por gramo de suelo). Estos valores se utilizaron para elaborar una curva de referencia de la cantidad de inóculo por gramo de suelo.

Para la técnica de qPCR se elaboró una curva patrón con las mismas muestras analizadas en la cámara de Neubauer. La curva patrón permitió referenciar las muestras de suelo tomadas a campo. La concentración de inóculo de cada muestra de suelo de campo se calculó a partir de la curva patrón del qPCR y la curva obtenida por la cámara de Neubauer.

Muestreo de suelo: en unidades productivas no mayores a 150 ha se tomaron un total de 6 muestras de suelo siguiendo una diagonal. Cada muestra a su vez se compone de 15 submuestras, tomadas con barreno, cada 5 metros, a una profundidad de 5 cm. Cada muestra fue georeferenciada. El período de tomas de muestras fue previo a la cosecha, de enero a mayo de 2021. El mapa con la localización de los lotes muestreados fue elaborado utilizando el software DivaGIS 7.5.0.

Procesamiento de muestras de suelo: una vez en el laboratorio cada muestra fue secada, tamizada y cuarteada hasta obtener un peso aproximado de 2 g. Las muestras se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

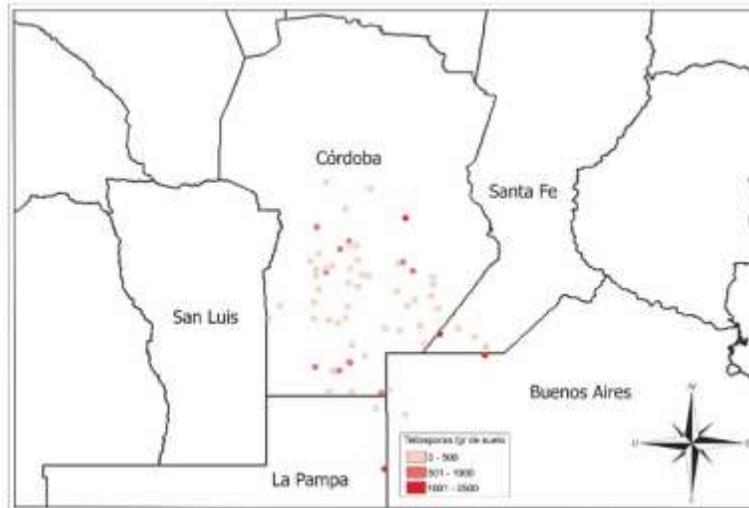
Análisis de las muestras de suelo por qPCR: partiendo de 0,5 gramos de suelo, cada muestra se analizó por triplicado, previa extracción de DNA, utilizando un kit para garantizar la cantidad y calidad del material extraído. En la reacción se emplearon los primers específicos TF-2F (5'ATGTCAAAGAGTGCGAAGAC3') y TF-2R (5'TATCTTGCTGGTAGGCTGTT3') y las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min; seguida de 35 ciclos de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min y  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min; con una extensión final a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min (Cazón et al. 2016)

## Resultados

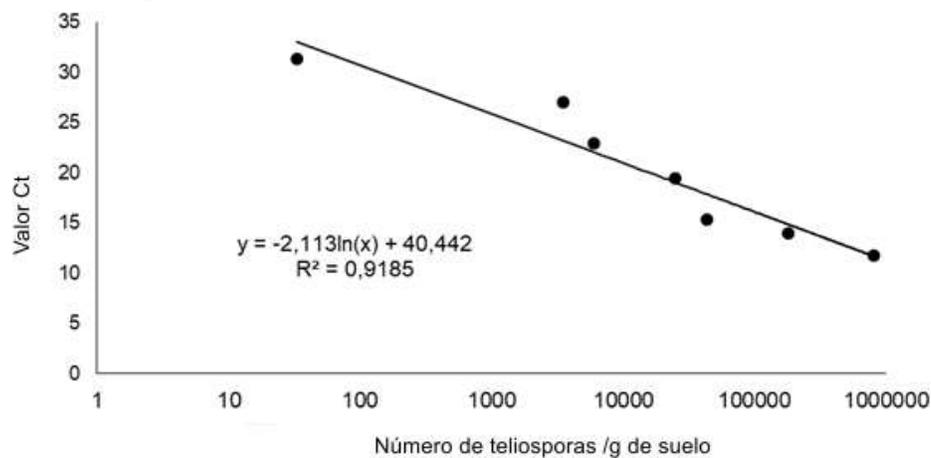
Se obtuvieron y analizaron un total de 432 muestras de suelo de 72 lotes, correspondientes a las provincias de Córdoba, La Pampa, Santa Fe y Buenos Aires (Fig 1).

En todas las concentraciones utilizadas para elaborar la curva patrón por qPCR fue posible detectar teliosporas, obteniendo valores de CT que variaron de entre 31,76 y 11,53. La correlación entre el CT y el log de las concentraciones fue lineal y significativa con un valor de  $R^2$  de 0,98. La eficiencia de los primers fue del 100%.

A partir de la curva patrón del qPCR y la curva obtenida por la cámara de Neubauer se generó una curva logarítmica, con un coeficiente de determinación de  $R^2= 0,9185$  (Fig 2). La concentración de inóculo en muestras de campo varió de 30 a 1172 teliosporas/g de suelo para la provincia de Córdoba, entre 254 a 2138 teliosporas/g de suelo para la provincia de Santa Fe, 383 a 1784 teliosporas/g de suelo para la provincia de la Pampa y 84 a 2319 teliosporas/g de suelo para la provincia de Buenos Aires (Fig 1).



**Figura 1.** Localización de lotes muestreados y concentración de inoculo de *T. frezii*.



**Figura 2.** Relación entre el Valor Ct obtenido por la técnica de qPCR y el número de teliosporas resultante del conteo en cámara de Neubauer.

### Conclusión

La cuantificación de inóculo en muestras de suelo por qPCR, nos permite contar con una metodología sensible y eficiente para conocer el grado de infestación de los suelos del área manisera y el grado de avance de la enfermedad, siendo estos resultados esenciales para establecer estrategias preventivas de manejo de la enfermedad.

### Bibliografía

Cazón et al. 2016. XXXI Jornada Nacional de Maní. Marinelli et al. 2008. Agriscientia Vol. XXV (1), 1-5. Oddino et al. 2010. XXV Jornada Nacional del Maní. Rago et al. 2017. Plant Disease, 101(3), 400-408.

Financiamiento: INTA y Fundación Maní Argentino.