



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*

---



DETECCIÓN MOLECULAR DE *Thecaphora frezii*  
Carranza & Lindquist EN SEMILLAS DE MANÍ  
(*Arachis hypogaea* L.)

Luis Ignacio Cazón

Tesis  
Para optar al Grado Académico de  
Magister en Ciencias Agropecuarias con  
Mención en Tecnología de Semillas

*Córdoba, 2015*

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Thecaphora frezii*  
Carranza & Lindquist EN SEMILLAS DE MANÍ (*Arachis  
hypogaea* L.)

Luis Ignacio Cazón

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Ing. Agr. (M.Sc.) Alejandro Rago

**Co-Directora:** Biol. (M.Sc.) Laura Torres

**Asesora:** Ing. Agr. (Dra.) Evangelina B. Argüello Caro

**Tribunal Examinador de Tesis**

Ing. Agr. (Dra.) Evangelina B. Argüello Caro .....

Ing. Agr. (Dra.) María Alejandra Pérez .....

Microbióloga (Dra.) Marina Bressano .....

**Presentación formal académica**

24 de noviembre de 2015

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de Tesis fue posible gracias a la colaboración desinteresada de las siguientes personas: Alejandro Rago, Cinthia Conforto, Franco Fernández, Matías Bisonard, Juan Andrés Paredes, Evangelina Argüello Caro, Laura Torres, Autoridades y personal del CIAP-INTA. Mamá, papá, tía, Laura, hermanos y todas aquellas personas que de alguna manera formaron parte de esta historia.

*A Laura y Olivia*

*A Lucho, Miriam y Gloria*

*A Bruno, Andy, Caro, Flavia y Julia*

## RESUMEN

*Thecaphora frezii* es el agente causal del carbón del maní, enfermedad de gran importancia en la zona productora Argentina. La forma más eficiente de dispersión del patógeno es a través de la semilla, contaminándola superficialmente o en pequeñas lesiones que no son detectadas en los controles de calidad. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de detección para *Thecaphora frezii* en semillas de maní mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para esto se amplificó y secuenció la región ITS de cuatro aislamientos de *T. frezii* empleando cebadores universales (ITS1/ITS4). A partir de las secuencias obtenidas, y con el uso del software SeqMan (Lasergene software, DNASTAR ver. 8.0.2, 2008) se obtuvo una secuencia consenso, con la cual se diseñaron los cebadores específicos para *T. frezii*, **TF-2F/TF-2R**. Para esto se utilizó el software Primer3 versión 0.5. Con los cebadores obtenidos se realizaron pruebas de especificidad y sensibilidad. Para la primera se realizó una PCR usando ADN de aislados de *T. frezii* y de otros patógenos transmitidos por la semilla (*Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*). Para los aislados de *T. frezii* se obtuvo una banda de 160 pb, mientras que para los otros patógenos no hubo amplificación. Para la prueba de sensibilidad se inocularon grupos de semillas con suspensiones de teliosporas de diferente concentración:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 10 y 1 teliosporas/ml. Se realizó una extracción de ADN y se corrió una PCR. Se observaron resultados positivos hasta 10 teliosporas /ml, siendo este último el límite de detección de la técnica. Debido a que Argentina es el único país donde se encuentra reportada la enfermedad en lotes comerciales, la disponibilidad de un método preciso y sensible de detección de *Thecaphora frezii*, resulta una herramienta útil para verificar la sanidad de las partidas de exportación, si así lo requiriesen los países compradores. Además, resulta fundamental para estudios epidemiológicos de la enfermedad.

**Palabras claves:** carbón, ITS, PCR, teliospora

## ABSTRACT

*Thecaphora frezii* is the causal agent of peanut smut, a very important disease in the Argentine production area. The pathogen can be dispersed by seeds, through surface contamination or small lesions that are not detected in controls. The aim of this work was development a method to detect *Thecaphora frezii* in peanut seeds using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The Internal Transcribed Spacer (ITS) region of four *T. frezii* isolates was amplified and sequenced using universal primers (ITS1/ITS4). From these sequences, and using software SeqMan (Lasergene software, DNASTAR ver. 8.0.2, 2008) a consensus sequence was obtained. Using the software Primer3 versión 0.5 (Koressaar y Remm, 2007) a pair of primers specific for the pathogen, named TF-2F and TF-2R, was synthesized. The primers were analyzed for specificity and sensitivity tests. The first test involved a PCR using DNA from *T. frezii* and other seed-transmitted pathogens (*Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*). A 160-pb fragment was obtained for the *T. frezii* isolates, whereas no amplification was observed for the remaining pathogens. For the sensitivity test, groups of seeds were inoculated whit teliospore suspensions at different concentrations:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 10 and 1 teliospores/ml. A DNA extraction was performed a PCR was run. Positive results were observed at concentrations up to 10 teliospores /ml, the latter being the PCR detection limit. Because Argentina is the only country where the disease is reported, the availability of the detection method of *Thecaphora frezii* by PCR technique is usefu to check the health of peanut exportation. The specificity of this method, along with its sensitivity, makes it an important tool for epidemiological studies of peanut smut.

**Key words:** smut, ITS, PCR, teliospora

## TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
CAPÍTULO 2.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
1- Diseño de cebadores específicos para <i>Thecaphora frezii</i> .....	19
1.1.- Extracción de ADN de teliosporas de <i>T. frezii</i> .....	19
1.2.- Amplificación de la región ITS .....	20
1.3.- Secuenciación del amplificado de la región ITS y diseño de cebadores específicos para <i>Thecaphora frezii</i> . .....	20
2- Estandarización del método de detección de teliosporas de <i>Thecaphora frezii</i> en semillas de maní.....	21
2.1.- Recuperación de teliosporas en semillas de maní y extracción de ADN. ....	21
2.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en la detección de <i>Thecaphora frezii</i> . .....	21
CAPÍTULO 3.....	23
RESULTADOS .....	23
1- Diseño de cebadores específicos para <i>Thecaphora frezii</i> .....	23
1.1.- Extracción de ADN de teliosporas de <i>T. frezii</i> .....	23
1.2.- Amplificación de la región ITS .....	24
1.3.- Secuenciación del amplificado de la región ITS y diseño de cebadores específicos <i>Thecaphora frezii</i> . .....	24
2- Estandarización del método de detección de teliosporas de <i>Thecaphora frezii</i> en semillas de maní.....	32
2.1.- Recuperación de teliosporas en semillas de maní y extracción de ADN. ....	32
2.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en la detección de <i>Thecaphora frezii</i> . .....	34
CAPÍTULO 4.....	37
DISCUSIÓN .....	37
CAPÍTULO 5.....	41
CONCLUSIONES .....	41
CAPÍTULO 6.....	43
BIBLIOGRAFÍA CITADA .....	43

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b>	Distribución del área sembrada con maní en la campaña 2013/14.	3
<b>Tabla 3.1.</b>	Características de los cebadores específicos para la detección de <i>T. frezii</i> .	29
<b>Tabla 3.2.</b>	Resultados de las pruebas de especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR en la detección de teliosporas de <i>Thecaphora frezii</i> .	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.1.</b>	Área de siembra y rendimientos de maní en caja (qq/ha) en la campaña 2013/2014 en las provincias de Córdoba, La Pampa y San Luis. Fuente: Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de Córdoba. 2014. Informe especial n° 69, Campaña 2013/14: Producción final de maní.	4
<b>Fig. 1.2.</b>	Vaina de maní silvestre afectadas por carbón.	6
<b>Fig. 1.3.</b>	Vainas afectadas por carbón del maní. <b>A:</b> Planta de maní con vainas hipertrofiadas por carbón. <b>B:</b> Comparación entre vainas sanas (derecha) y vainas afectadas (izquierda).	6
<b>Fig. 1.4.</b>	Vainas afectadas por carbón del maní. <b>A:</b> Planta de maní con vainas hipertrofiadas por carbón. <b>B:</b> Comparación entre vainas sanas (derecha) y vainas afectadas (izquierda).	7
<b>Fig. 1.5.</b>	Teliosporas de <i>Thecaphora frezii</i> . <b>A:</b> Vista de teliosporas observadas al microscopio óptico. <b>B:</b> Vista de teliosporas observadas al microscopio confocal (Laboratorios LAMARX - FAMAFA – UNC). <b>C:</b> Vista de teliosporas observadas al microscopio electrónico de barrido (Núcleo de apoio à pesquisa em microscopia eletrônica aplicada à pesquisa agropecuária, Piracicaba, Brasil).	7
<b>Fig. 1.6.</b>	Ciclo biológico de <i>Thecaphora frezii</i> .	8
<b>Fig. 1.7.</b>	Fungicida granulado aplicado al voleo en ensayos para el manejo del carbón del maní.	9
<b>Fig. 1.8.</b>	Escala de severidad de carbón del maní.	10
<b>Fig. 1.9.</b>	Nube de polvo liberada durante la cosecha del maní (imágenes de Rodolfo Bongiovanni).	11
<b>Fig. 1.10.</b>	Grano de maní con un soro provocado por <i>Thecaphora frezii</i> . Principal vehículo del patógeno a larga distancia.	11
<b>Fig. 1.11.</b>	Esquema del proceso de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	13
<b>Fig. 1.12.</b>	Esquema del ADN ribosomal (ADNr) en hongos.	14
<b>Fig. 1.13.</b>	Interacciones entre cebadores. A: horquilla o <i>hairpin</i> . B-C: dímero de <i>primers</i> .	15
<b>Fig. 3.1.</b>	Gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de ADN de los diferentes aislados de <i>T. frezii</i> . De <b>A-D:</b> Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1 y Sa-EM1.	23
<b>Fig. 3.2.</b>	Gel de agarosa con los productos de PCR usando los cebadores universales ITS1 e ITS4 para los cuatro aislamientos de <i>T. frezii</i> . <b>M:</b> marcador molecular 100pb; <b>A-D:</b> Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1 y Sa-EM1; <b>Mix:</b> Mezcla de reacción sin ADN.	24
<b>Fig. 3.3.</b>	Árbol filogenético construido con el método de NJ basado en las secuencias ITS de los 4 aislamientos de <i>T. frezii</i> , 19 representantes del género <i>Thecaphora</i> y <i>Ustilago scitaminea</i> usado como extragrupo.	27
<b>Fig. 3.4.</b>	Gel de agarosa con los productos de PCR empleando los cebadores específicos diseñados para <i>T. frezii</i> . <b>M:</b> marcador molecular de 100pb. <b>1-2:</b> Productos de PCR empleando el juego de cebadores TF1. <b>3-4:</b> Productos de PCR empleando el juego de cebadores TF2. <b>Mix:</b> Mezcla de reacción sin ADN.	29
<b>Fig. 3.5.</b>	Sitio de unión de los cebadores específicos para <i>T. frezii</i> a la secuencia consenso	30

- Fig. 3.6.** Gel de agarosa con los productos de PCR usando los cebadores específicos TF-2F y TF-2R para los cuatro aislamientos de *T. frezii*. **M:** marcador molecular 100pb; **A-D:** Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1 y Sa-EM1; **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN. 30
- Fig. 3.7.** Esquema de las condiciones de PCR para la detección de *T. frezii* usando los cebadores específicos diseñados, TF-2F y TF-2R. 31
- Fig. 3.8.** Gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de ADN de semillas de maní infestadas superficialmente con teliosporas de *T. frezii*. **A, B y C:** Muestras 1, 2 y 3 respectivamente. 32
- Fig. 3.9.** Gel de agarosa con los productos de PCR resultantes de la utilización del ADN extraído de semillas infestadas superficialmente con teliosporas de *T. frezii*. **A, B y C:** Muestras 1, 2 y 3 respectivamente; **E:** control positivo; **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN; **M:** marcador molecular 100pb. 33
- Fig. 3.10.** Gel de agarosa con los productos de amplificación de la PCR con gradientes de temperatura de *annealing*. Se observa amplificación entre los 52°C y los 57,5°C. **M:** Marcador molecular. 33
- Fig. 3.11.** Gel de agarosa con los productos de reacción de PCR usando ADN extraído de las semillas inoculadas con diferentes cantidades de teliosporas de *T. frezii*. (**De 1x10<sup>4</sup> a 1 teliosporas**) **M:** Marcador molecular 100 pb. **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN. **CP:** Control positivo. 34
- Fig. 3.12.** Gel de agarosa con los productos de reacción de PCR usando los cebadores 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*. **Fu-s:** *Fusarium solani*. **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN. 35
- Fig. 3.13.** Alineamiento de las secuencias de ADN de *Thecaphora frezii* (consenso), *Sclerotinia minor* (KC836494.1), *Sclerotinia sclerotiorum* (JQ480621.1), *Sclerotium rolfsii* (KJ578736.1) y *Fusarium solani* (AY097318.1) usando el software MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). Se observan las diferencias existentes entre la secuencia de *T. frezii* correspondiente al cebador específico y las secuencias del resto de los patógenos transportados por semilla. 35
- Fig. 5.1.** Esquema para la detección de *T. frezii* en semillas de maní. **A:** Lavado de las semillas de maní. **B-C:** Recuperación de teliosporas del agua de lavado mediante centrifugación. **D:** Extracción de ADN del pellet por el método del CTAB. **E:** Amplificación por PCR. **F:** visualización de resultados mediante electroforesis en gel de agarosa. 42

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

**%:** por ciento

**+:** positivo

**- :** negativo

**A:** Adenina

**ADNr:** ADN ribosomal

**ADN:** Ácido Desoxiribonucleico

**C:** Citosina

**cc:** centímetros cúbicos

**cm:** centímetro

**CTAB:** Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide

**dNTP:** desoxiribonucleótidos trifosfatos

**g:** gramos

**G:** Guanina

**H<sub>2</sub>O:** agua

**ha:** hectárea

**ITS:** Internal Transcribed Spacers

**long.:** Longitud

**min:** minutos

**ml:** mililitros

**NCBI:** National Center of Biotechnology Information

**NJ:** Neighbour Joining

**ng:** nanogramos

**n°:** número

**°:** grados

**°C:** grados centígrados

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**pg:** picogramos

**qq:** quintales

**rpm:** revoluciones por minuto

**S:** South

**seg:** segundos

**sp:** especie

**subsp:** subespecie

**T:** Timina

**Ta:** Temperatura de annealing

**UV:** ultravioleta

**v/v:** volumen en volumen

**W:** West

**μl:** microlitros

**μM:** micromolar

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El maní es una planta herbácea procedente de América del Sur. Su centro de origen se localiza entre las zonas que actualmente pertenecen al Sudeste de Bolivia y Noroeste de Argentina, donde se encuentran las especies involucradas en su filiación (Fernández y Giayetto, 2006). En 1753, el botánico Linneo clasificó a la especie cultivada como *Arachis hypogaea* L. con dos subespecies, *hypogaea* y *fatstigiata* (Krapovickas y Gregory, 1994). Pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoidea*, género *Arachis* (Lavia, 1998). Es una planta herbácea anual, de porte erecto, intermedio y rastrero dependiendo de la variedad. Los cultivares de tipo erecto pueden alcanzar los 40 cm de altura y los rastreros pueden alcanzar un diámetro de 120 cm (Oddino, 2007). La planta de maní posee una estructura básica formada por un tallo central (eje n) y dos ramificaciones primarias (n+1) que se originan en las axilas de los cotiledones, pudiendo presentar otras ramificaciones de orden superior (n+2, n+3). La cantidad de ramificaciones varía de acuerdo al genotipo (Fernández y Giayetto, 2006). Las semillas sanas emergen rápidamente bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Con el inicio de la germinación, el rápido incremento del metabolismo ayuda a la translocación de sustancias al eje embrionario donde se reorganizan y favorecen al crecimiento (Cholaky, 1984). En su desarrollo, el maní se caracteriza por tener una etapa vegetativa y otra reproductiva. La fase vegetativa va desde la germinación hasta la formación de tallos y las hojas, y la fase reproductiva va desde el inicio de la floración (R1) hasta la obtención de frutos sobremaduros (R9) (Cholaky, 1996; Fernández y Krapovickas, 1994). Las flores de maní están dispuestas en inflorescencias (espigas comprimidas) que se desarrollan en los nudos foliares. Por día emerge una flor por inflorescencia. Las restantes van emergiendo sucesivamente varios días después de la anterior (Bunting y Elston, 1980). El proceso de floración abarca casi el 80% del ciclo del maní y se superpone con el período de fructificación. Después de la fecundación, las células localizadas debajo del receptáculo se dividen rápidamente dando origen al ginóforo o “clavo”. Este último crece hacia el suelo por estímulo de la luz llevando en su extremo al ovario protegido por una capa de células

lignificadas (Ashley, 1984). Una vez introducido en el suelo, la elongación se detiene y comienza el desarrollo del fruto. Para esto es necesario oscuridad, estímulo mecánico del medio, humedad y presencia de calcio (Fernández y Giayetto, 2006).

El cultivo del maní es importante en las zonas de clima tropical, subtropical y templados de América, África y Asia donde se produce para consumo humano. En algunas zonas de Europa, además se produce como forraje para alimentación animal (Hammons, 1982, 1994). La planta se desarrolla adecuadamente en suelos profundos, ligeramente ácidos y con buen drenaje. Los suelos con bajo contenido de arcilla son los adecuados ya que el sistema radicular se desarrolla ampliamente, presentan poca resistencia a la penetración del clavo, facilita el arrancado y las vainas se cosechan relativamente limpias (Pedelini, 2014).

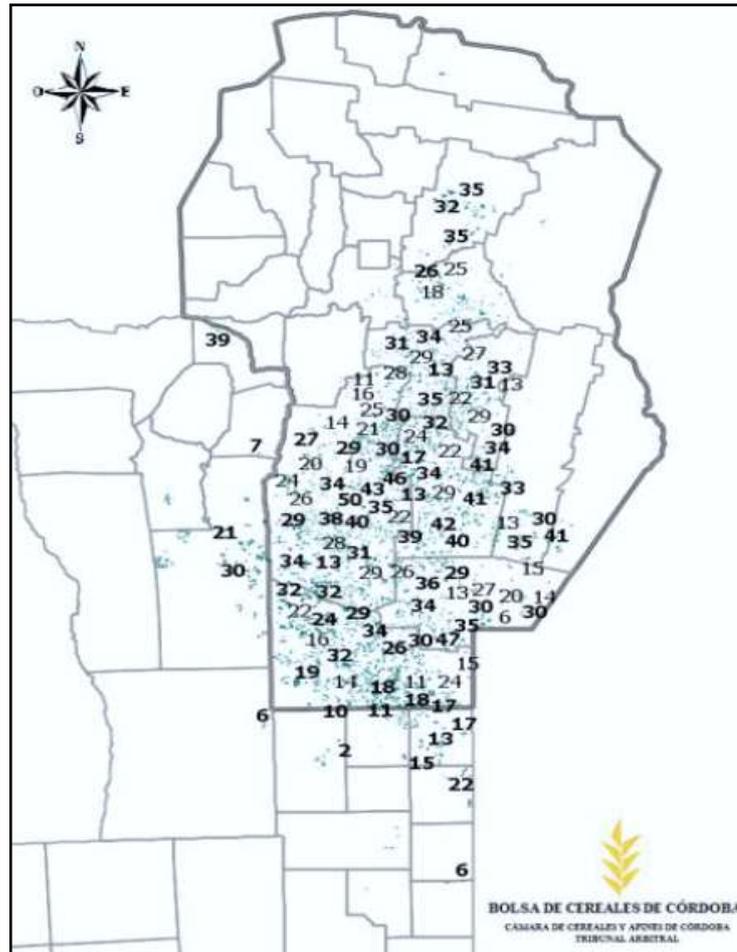
En Argentina, la producción de maní tiene como objetivo el consumo humano, ya sea de manera directa o a través de productos elaborados a partir de este, como el aceite y la pasta de maní entre otros. En la campaña 2013/14 la superficie sembrada alcanzó las 383.116 ha, de las que se cosecharon 997.225 toneladas de maní en caja con un rendimiento promedio de 27 qq por hectárea (Bolsa de cereales de Córdoba, 2014). El 80% de lo producido se destina a exportación, caracterizando a la industria manisera como netamente exportadora. Estas características de mercado posicionan a Argentina como el séptimo productor y el primer exportador de maní a nivel mundial (Fiant *et al.*, 2013). Entre los principales destinos de la producción se encuentran la Unión Europea, USA, Rusia, China, India y Japón entre otros. No solo se exporta la producción primaria, sino también productos manufacturados como maní confitería, maní saborizado, pasta, manteca, aceite, harina y pellets de maní (Cámara Argentina del maní, 2013).

En Argentina, el cultivo del maní se distribuye en las provincias de Córdoba, La Pampa, San Luis, Salta y Jujuy, siendo Córdoba la responsable del 92% de la producción total. En esta provincia el área manisera se encuentra principalmente distribuida en la región Centro-Sur, incluyendo los departamentos de Río Cuarto, Gral. Roca, Juárez Celman, Pte. Roque Sáenz Peña, Tercero Arriba, Gral. San Martín, Río Segundo, Unión, Río Primero, San Justo y Calamuchita (Tabla 1.1, Fig. 1.1). Del total de la superficie sembrada en la provincia de Córdoba, aproximadamente el 59% se encuentra distribuida entre los departamentos de Gral. Roca y Río Cuarto (Bolsa de cereales de Córdoba, 2014).

**Tabla 1.1.** Distribución por departamentos del área sembrada con maní en la provincia de Córdoba en la campaña 2013/14.

<b>Departamento</b>	<b>Superficie de maní (has)</b>	<b>Rendimiento en caja (qq/ha)</b>
General Roca	106.966	22
Río Cuarto	96.139	29
Juárez Celman	46.697	32
Pte. Roque Sáenz Peña	26.556	29
Tercero Arriba	19.842	27
Gral. San Martín	16.886	27
Río Segundo	9.976	25
Unión	9.349	31
Río Primero	7.560	34
Santa María	1.426	26
Marcos Juárez	1.200	38
San Justo	823	25
Río Seco	338	25
Calamuchita	283	11
<b>Total</b>	<b>344.041</b>	<b>27</b>

**Fuente:** Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de Córdoba. 2014.  
Informe especial n° 69, Campaña 2013/14: Producción final de maní.



**Fig. 1.1.** Área de siembra y rendimientos de maní en caja (qq/ha) en la campaña 2013/2014 en las provincias de Córdoba, La Pampa y San Luis. Fuente: Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de Córdoba. 2014. Informe especial n° 69, Campaña 2013/14: Producción final de maní.

Unos de los principales inconvenientes en el cultivo del maní están dados por las enfermedades causadas por hongos del suelo. Esto se debe a la morfología de la planta, por su capacidad de producir geocarpos (frutos subterráneos), y por el hábito de crecimiento rastrero de las variedades utilizadas comercialmente en Argentina. Esta particularidad, deja a las vainas y ramificaciones expuestas a infecciones por el inóculo presente en suelos infestados. En la provincia de Córdoba, las enfermedades más importantes son el “tizón” causado por *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*, el “marchitamiento” por *Sclerotium rolfsii*, la “podredumbre parda” por *Fusarium solani* y el “carbón” por *Thecaphora frezii* (March y Marinelli, 2005). Los agentes causales de estas enfermedades poseen la capacidad de permanecer en los lotes por medio de sus estructuras de resistencia y, salvo *T. frezii*, todos poseen un amplio rango de hospedantes, lo que dificulta su

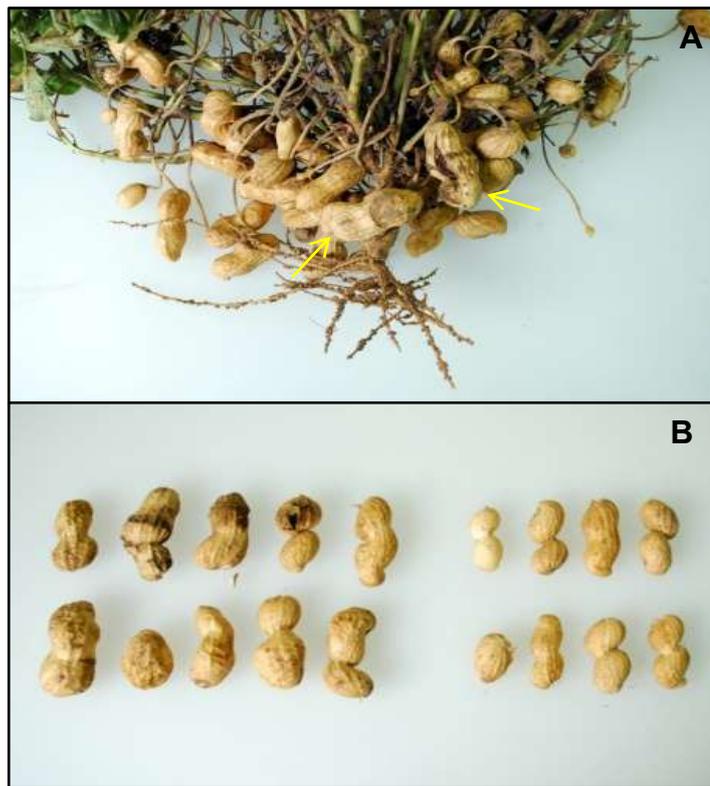
erradicación (Barreto, 1992). Debido al aumento de las pérdidas producidas por estos hongos, durante las décadas de 1980 y 1990 ocurrió una migración del área de producción de maní desde la zona central hacia el sur de la provincia de Córdoba, siendo la presencia de estos patógenos un factor limitante de la producción (Marinelli y March, 1996; Busso *et al.*, 2003; Oddino *et al.*, 2005).

El carbón del maní fue reportado por primera vez en el año 1962 en muestras de maní silvestre provenientes de Aquidauma, Matto Grosso, Brasil (Carranza y Lindquist, 1962) (Fig. 1.2). En el año 1995 *T. frezii* fue detectada en lotes de producción comercial en Argentina (Marinelli *et al.*, 1995). Desde entonces la intensidad de la enfermedad fue creciendo hasta registrarse valores de prevalencia del 100% en las campañas agrícolas 2011/2012 (Bonessi *et al.*, 2011; Cazzola *et al.*, 2012). Hasta el momento, Argentina es el único país que informó la enfermedad en lotes comerciales.

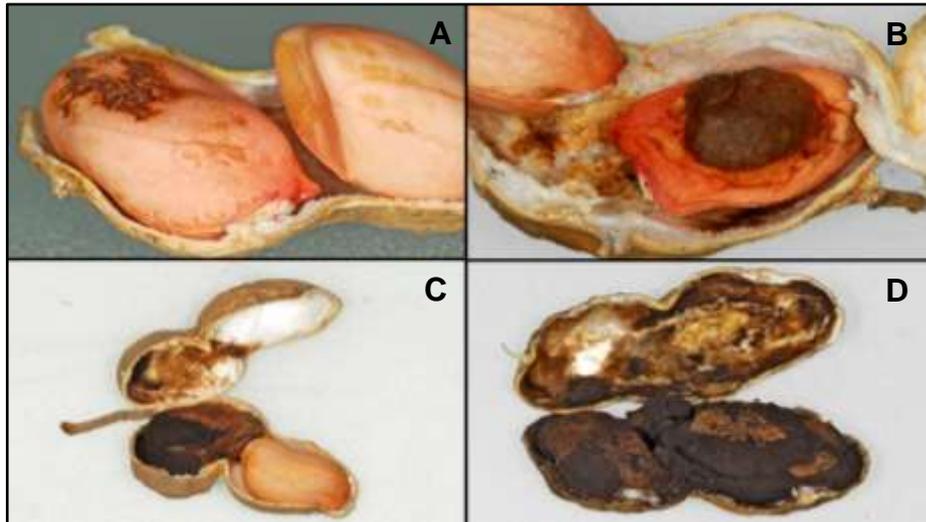
La clasificación taxonómica de *T. frezii* se realizó en base a la morfología de las teliosporas y las características de los síntomas de la enfermedad, en el año 1962 por Carranza y Lindquist. Conforto *et al.*, (2012, 2013) confirmaron dicha clasificación mediante la caracterización molecular de la región D1-D2 de la subunidad mayor del ADN ribosomal (28S ADNr). Es un hongo perteneciente a la Clase *Ustilaginomycetes*, Familia *Glomosporiaceae*, Género *Thecaphora* (Marinelli *et al.*, 2010). Los frutos afectados presentan hipertrofia y consistencia gomosa (Fig. 1.3), mientras que los granos se encuentran total o parcialmente convertidos en una masa carbonosa compacta de color pardo-rojiza formada por teliosporas (Fig. 1.4). Estas últimas, vistas al microscopio óptico son de color marrón, con un tamaño de entre 20 y 40 micras y presentan la superficie espinulada (Marraro Acuña *et al.*, 2013) (Fig. 1.5).



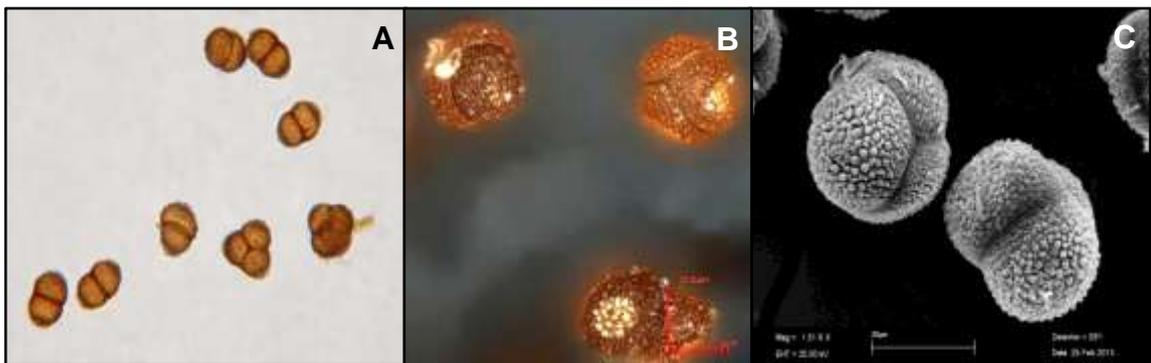
**Fig. 1.2.** Vaina de maní silvestre afectadas por carbón.



**Fig. 1.3.** Vainas afectadas por carbón del maní. **A:** Planta de maní con vainas hipertrofiadas por carbón. **B:** Comparación entre vainas sanas (derecha) y vainas afectadas (izquierda).



**Fig. 1.4.** Síntomas producidos por *Thecaphora frezii* en vainas de maní con distintos grados de afectación. **A:** Lesión leve en una semilla. **B:** Lesión de mayor tamaño en una semilla. **C:** Una semilla totalmente carbonosa y la otra sana. **D:** Ambas semillas totalmente carbonosas.



**Fig. 1.5.** Teliosporas de *Thecaphora frezii*. **A:** Vista de teliosporas observadas al microscopio óptico. **B:** Vista de teliosporas observadas al microscopio confocal (Laboratorios LAMARX - FAMAF – UNC). **C:** Vista de teliosporas observadas al microscopio electrónico de barrido (Núcleo de apoyo a pesquisa em microscopia eletrônica aplicada à pesquisa agropecuária, Piracicaba, Brasil).

Una vez que las teliosporas se encuentran libres en el suelo, su germinación es estimulada por la presencia del ginóforo o “clavo” cuando penetra en el suelo infestado, produciéndose de esta manera una infección y colonización “localizada” del tejido vegetal (Marinelli *et al.*, 2008; Marraro Acuña, 2012). El proceso de germinación incluye la formación de un probasidio y basidiosporas que luego de la conjugación, dan origen a un micelio dicariótico e infeccioso que penetra en el clavo, y con el desarrollo del fruto, se origina la masa carbonosa de teliosporas (Marinelli *et al.*, 2010; Astiz Gassó y Marinelli, 2013) (Fig. 1.6).

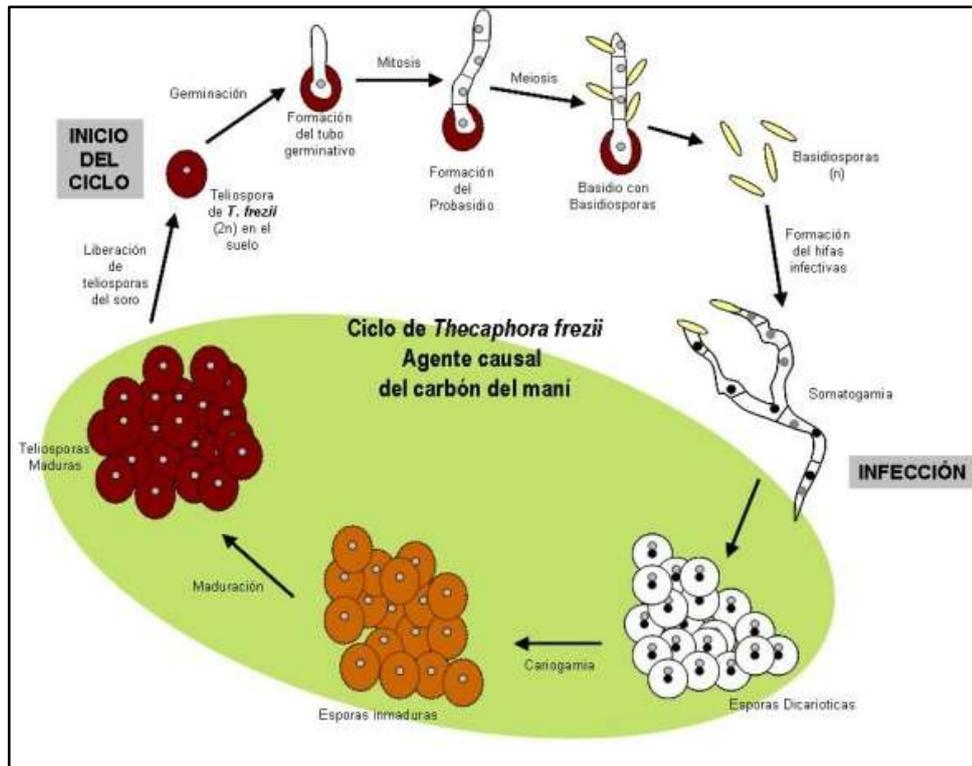


Fig. 1.6. Ciclo biológico de *Thecaphora frezii*.

Se estudiaron diferentes estrategias de manejo que pueden disminuir la intensidad de la enfermedad en el campo. Farías *et al.*, (2011) evaluaron la respuesta de cultivares alto-oleico frente al carbón del maní. Concluyeron que el cultivar Pepe ASEM-INTA presentaba mejor comportamiento frente a la enfermedad, mostrando un 34% de incidencia contra un 71% del cultivar Colorado Irradiado-INTA usado como testigo. Otra herramienta importante está relacionada con la rotación de cultivos. Fundación Maní Argentino (2010), a través de sus informes sobre manejo de enfermedades fúngicas de maní asegura que aquellos cultivos que provienen de rotaciones con más de 3 años sin maní, muestran un descenso importante en densidad de inóculo en el suelo, además de presentar sensibles disminuciones en los niveles de incidencia y severidad. Además, datos de Marraro Acuña y Haro (2011), indican que el cultivo de maní que fue antecedido por maíz presenta menos enfermedad que el antecedido por soja. Otra práctica que podría ser usada es la realización de una labranza profunda. Spinazzé y Marraro Acuña (2011), concluyen que la aplicación de prácticas que entierren las teliosporas a más de 15 cm de profundidad, disminuye las

probabilidades de ocurrencia de la enfermedad, ya que el fruto se desarrolla entre los 5 y 7 cm en el suelo.

Con respecto al uso de fungicidas, no existe un principio activo que controle la enfermedad en un 100%. En el año 2011 Astiz Gassó y Wojszko realizaron pruebas *in vitro* con fungicidas curasemillas (Carboxim, Metalaxil, Metiltiofanato, Captan), obteniendo buenos resultados, aunque dicho comportamiento no se repite en el campo. Existen fungicidas foliares que proporcionan una eficiencia de control moderada. El uso de picoxystrobin+cyproconazole en dosis dobles y con 2 aplicaciones (900 cc/ha - inicio de clavado + 4 días), provee una eficiencia de control del 41% en el campo (Cazón *et al.*, 2013). Paredes *et al.* (2014) evaluaron de manera experimental la aplicación de fungicidas granulados agregados al voleo. El fundamento de dicha formulación está en la lenta liberación al suelo de los fungicidas para la protección del cultivo durante el período de clavado (Fig. 1.7). La formulación más efectiva es la de picoxystrobin+cyproconazole, con un 42% de eficiencia de control al igual que la aplicación foliar de los mismos principios activos.



**Fig. 1.7.** Fungicida granulado aplicado al voleo en ensayos para el manejo del carbón del maní.

Para determinar el daño producido por carbón se tienen en cuenta 2 parámetros: incidencia y severidad. Se define a la incidencia como el porcentaje de cajas afectadas y la severidad se determina según una escala de 0-4, que considera la proporción en que se encuentran afectadas las vainas (El grado 0 representa vainas sin carbón; Grado 1: vaina normal con un pequeño soro en una semilla; Grado 2: vaina deformada o no con una

semilla mitad afectada; Grado 3: vaina malformada y una semilla totalmente carbonosa, Grado 4: vaina malformada, dos semillas totalmente carbonosas (Astiz Gassó *et al.*, 2008) (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8.** Escala de severidad de carbón del maní.

Entre los medios de dispersión del patógeno podemos mencionar al viento, la maquinaria agrícola y las semillas (Marraro Acuña *et al.*, 2011). La nube de polvo que se genera en el momento de la cosecha del maní se encuentra cargada de teliosporas, que por acción del viento pueden ser transportadas hacia otros lotes (Fig. 1.9). La maquinaria agrícola también puede transportar al patógeno, ya que este último se adhiere a su superficie. La semilla representa la forma de dispersión más eficiente a largas distancias, por la cual ingresa a nuevos lotes (Marraro Acuña *et al.*, 2009, 2011). Las teliosporas se pueden encontrar infestando externamente a la semilla o en pequeños soros (Fig. 1.10). La contaminación superficial del grano se produce principalmente en el proceso de descapotado, donde los frutos que se encuentran total o parcialmente carbonosos, liberan millones de teliosporas que se adhieren a la superficie de granos sanos (Marinelli *et al.*, 2008). Estas teliosporas pueden ser detectadas utilizando microscopía óptica. Para esto se realiza un lavado de las semillas y observación al microscopio del agua de lavado (Marraro

Acuña *et al.*, 2012). Es un método económico, aunque poco sensible y requiere de mucho tiempo al momento de procesar un gran número de muestras.



**Fig. 1.9.** Nube de polvo liberada durante la cosecha del maní (imágenes de Rodolfo Bongiovanni).



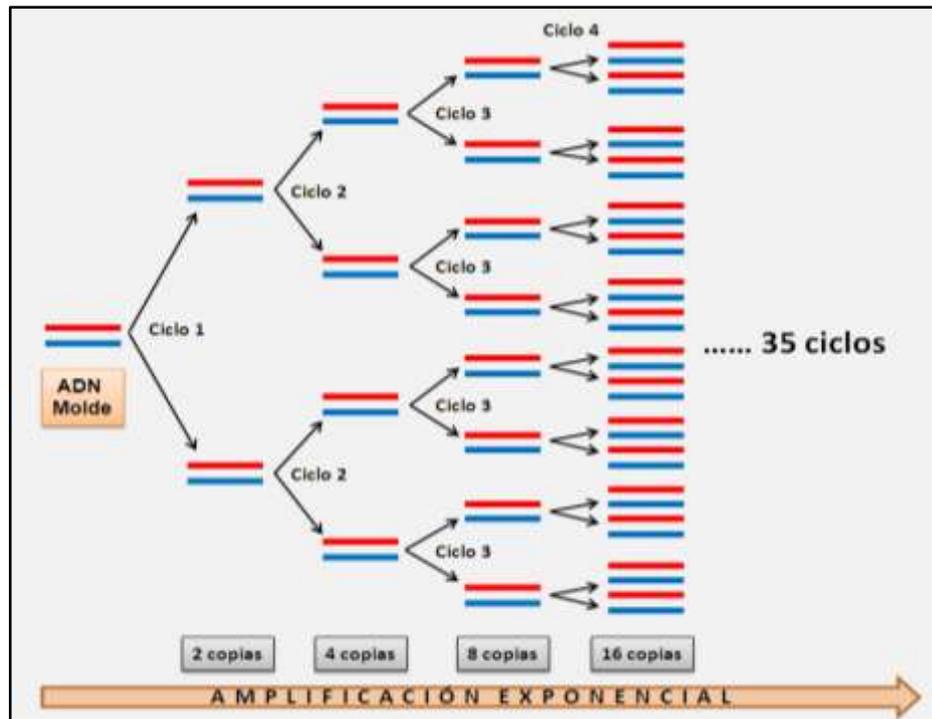
**Fig. 1.10.** Grano de maní con un soro provocado por *Thecaphora frezii*. Principal vehículo del patógeno a larga distancia.

Una alternativa a la microscopía óptica como método de detección, son las técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN. Poseen la ventaja de ser altamente sensibles,

específicas e independientes del efecto ambiental, ya que detectan secuencias específicas de ADN en muy bajas concentraciones (Narayanasamy, 2011). La mayoría de los métodos moleculares empleados tienen como base la técnica de PCR que consiste en amplificar *in vitro* un segmento de ADN del organismo en estudio y realizar un gran número de copias del mismo para su visualización (Gardes y Bruns, 1993; Kendall y Rygiewicz, 2005; Vánky y Lutz, 2007).

Los elementos importantes en la PCR son el ADN molde, la enzima ADN polimerasa, los oligonucleótidos o cebadores específicos, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), una solución buffer y agua (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Los oligonucleótidos o cebadores específicos son secuencias cortas de nucleótidos (entre 15 y 25 pb) complementarias a las secuencias que flanquean el segmento de ADN que queremos amplificar (ADN molde). A partir de estos, la ADN polimerasa multiplica el segmento de interés a través de los distintos ciclos de PCR. Cada ciclo consta de 3 etapas. En la primera se produce la separación de las hebras de ADN (desnaturalización) por incremento de la temperatura (95°C). En la segunda etapa la temperatura se reduce para permitir que los cebadores se unan a las cadenas individuales del ADN molde (hibridación o “*annealing*”). La temperatura de *annealing* varía de acuerdo a la composición y longitud de los cebadores específicos (Borah, 2011). En la tercera etapa, la enzima ADN polimerasa sintetiza la cadena de ADN complementaria del ADN molde usando los dNTPs (Mullis, 1990). La enzima ADN polimerasa utilizada comúnmente en las mezclas de reacción es la *Taq* ADN Polimerasa, que tiene la capacidad de ser estable a temperaturas elevadas, debido a que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*. Su temperatura óptima de trabajo es de 72°C (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Por lo general se necesitan de 25 a 45 ciclos de amplificación para que el segmento de interés pueda ser visualizado (Fig. 1.11). El proceso de PCR se lleva a cabo en un Termociclador, que proporciona las condiciones de temperatura necesarias para la amplificación geométrica del segmento de ADN a través de sucesivos ciclos. Una vez finalizada la PCR, los productos obtenidos son observados mediante una electroforesis en gel de agarosa. Éste último actúa como un tamiz que separa las moléculas cargadas por tamaño (peso molecular) y forma (Ochoa Cueva, 2008). En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona carga negativa, por lo que en una electroforesis migran hacia el polo positivo. Para poder visualizar los fragmentos de diferentes tamaños en un gel

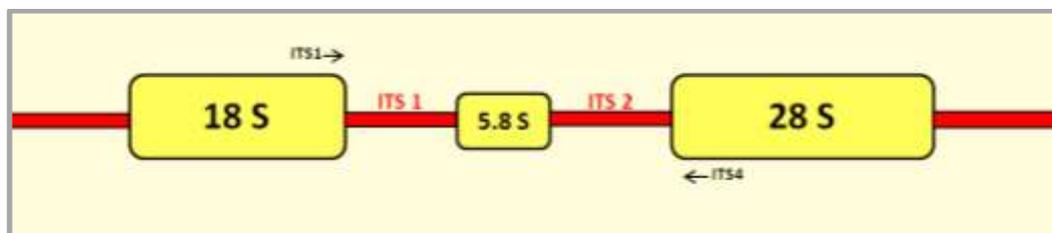
de agarosa es necesaria la tinción del mismo en Bromuro de Etidio. Este se intercala entre las dobles cadenas de ADN y emite una señal al ser expuesto a la luz UV, lo que permite la visualización en forma de bandas de los productos amplificados en la PCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).



**Fig. 1.11.** Esquema del proceso de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Existen regiones del ADN más adecuadas que otras para la identificación molecular de hongos, debido a la gran variabilidad que presentan entre especies. La primera y más utilizada es la región del ADN ribosomal (ADNr) (Gardes y Bruns, 1993), la segunda es el gen de  $\beta$ -tubulina y la tercera es un gen “mating-type” en ascomycete (Chen *et al.*, 2007). El ADNr consiste en repeticiones en tándem del gen 18S, el espaciador intergénico 1 (ITS1), el gen 5.8S, el espaciador intergénico 2 (ITS2) y el gen 28S. Las secuencias correspondientes a los genes 18S, 5.8S y 28S se encuentran relativamente conservados en hongos, por lo que son usadas para estudios filogenéticos (Yang, *et al.*, 2005; Ochoa Cueva, 2008). Sin embargo, las regiones intergénicas (internal transcribed spacers) ITS1 e ITS2 son utilizadas con fines de identificación de especies (Gardes y Bruns, 1993; Sander *et al.*, 1995; Shahnazi *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012). Al tratarse de secuencias que no transcriben, no poseen una función biológica aparente y acumulan mutaciones neutrales a

lo largo del tiempo que le otorgan gran variabilidad (Cruz, 2003; Atkins y Clark, 2004; Rodríguez Gonzales, 2007). La región ITS posee la característica de ser una secuencia relativamente corta (entre 600 y 800 pb), es fácil de amplificar usando cebadores universales a partir de muestras con ADN degradado y en bajas concentraciones (Lorena *et al.*, 1999; Weiland y Sundsbäck, 2000; Le Cam *et al.*, 2001; Villalobos *et al.*, 2005; Smith y Stanosz, 2006; Zaho *et al.*, 2007; Magalhães de Abreu y Pfenning, 2012). En 1990 se diseñaron los primeros cebadores universales para la amplificación de la región ITS en hongos, los ITS1, ITS2, ITS3 e ITS4 (White *et al.*, 1990), que además de amplificar los espaciadores intergénicos, también amplifican el gen 5.8S (Fig. 1.12). Dichos cebadores fueron ampliamente utilizados para la detección molecular de hongos fitopatógenos (Gardes y Bruns, 1993; Sander *et al.*, 1995; Shahnazi *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012). A partir de los productos amplificados obtenidos con los cebadores ITS universales, es posible el desarrollo de cebadores que amplifiquen secuencias específicas de cada tipo de patógeno (Zhao *et al.*, 2007). Esta es la estrategia más eficiente para desarrollar un método de diagnóstico sensible y específico (Montpetit *et al.*, 1992).

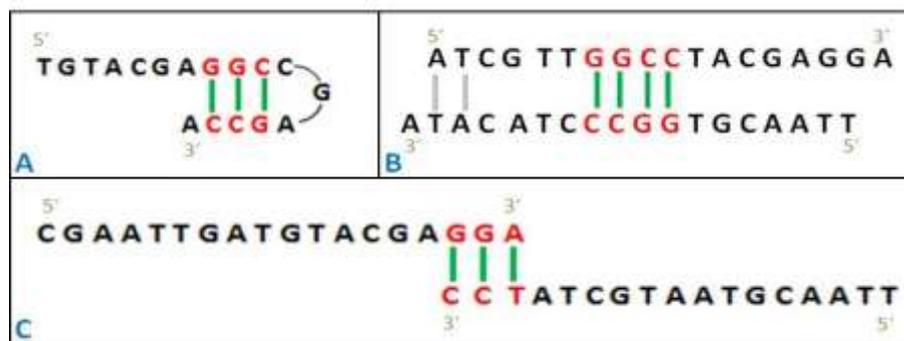


**Fig. 1.12.** Esquema del ADN ribosomal (ADNr) en hongos.

Existen varios factores a considerar en el diseño de cebadores. El primero está relacionado a la temperatura de hibridación (**T<sub>a</sub>**), que es la temperatura en la cual los cebadores hibridarán con la secuencia complementaria de la hebra molde de ADN blanco para iniciar el proceso de amplificación. La **T<sub>a</sub>** depende directamente de la longitud de los cebadores, del contenido de Citosina y Guanina y de la concentración de los cebadores en la mezcla de reacción (Innis and Gelfand, 1990). Una **T<sub>a</sub>** demasiado baja puede disminuir la especificidad de los cebadores por la secuencia blanco, la aparición de amplificadores espurios (Rychlik *et al.*, 1990). Una **T<sub>a</sub>** demasiado alta, puede generar bajo rendimiento en la amplificación, ya que la reacción es más restrictiva, incluso para cebadores

específicos (Pinzón, 2006). La **Ta** utilizada en la reacción de PCR debe ser similar para los dos cebadores, de esta manera se optimizan los rendimientos del proceso (Dieffenbach *et al.*, 1993).

Otros factores que se deben tener en cuenta son la longitud de los cebadores y su composición (Lowe *et al.*, 1990). Con respecto a la longitud, los cebadores deben poseer entre 18-28 bases. Los cebadores más cortos pueden disminuir la especificidad, mientras que los más largos pueden afectar a la sensibilidad del método (Wu *et al.*, 1991). Con respecto a la composición de bases nitrogenadas, el contenido de Citosina y Guanina no debe superar el 60% del total y no debe haber más de tres de estas bases en la región 3'. Esto reduce la posibilidad de formación de horquillas o *hairpins*, situación donde los cebadores tienden a plegarse por apareamiento entre sus propias bases. Además, las secuencias de los dos cebadores deben ser tales que eviten el apareamiento entre ellos (formación de dímeros), situación que también puede originarse por una elevada concentración de cebadores en la mezcla de reacción (Dieffenbach *et al.*, 1993) (Fig. 1.13). Por el contrario, si la concentración de los cebadores es baja puede ocasionar un pobre rendimiento de la reacción, afectando la sensibilidad del método.



**Fig. 1.13.** Interacciones entre cebadores. A: horquilla o *hairpin*. B-C: dímero de *primers*.

#### Consideraciones para el diseño de cebadores (Innis and Gelfand, 1990; Wu *et al.*, 1991)

- Los cebadores deben tener una longitud de 18-28 bases.
- El contenido de G+C debe estar alrededor del 50-60%.
- La **Ta** debe ser muy próxima para ambos cebadores.
- Se deben evitar secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3'.
- Las terminaciones 3' no deben ser complementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros.

- Deben evitarse los cebadores que formen secuencias auto-complementarias.

Todos estos parámetros pueden calcularse mediante expresiones matemáticas y deben ser tenidos en cuenta al momento de diseñar los cebadores. Actualmente, esta tarea se ve simplificada por el uso de programas Bioinformáticos básicos que, dentro de sus algoritmos contemplan todos los parámetros necesarios proporcionando una lista de posibles secuencias de bases para sintetizar los cebadores que serán probados en la PCR para la detección de microorganismos (Rychlik *et al.*, 1989; Hyndman *et al.*, 1996). Muchos de estos programas se encuentran en internet para su uso gratuito. Uno de ellos es el Primer3 versión 0.5, ampliamente usado para el diseño de cebadores (Untergrasser *et al.*, 2012). Este *software* es relativamente fácil de utilizar y los resultados son confiables y de fácil interpretación (Koressaar y Remm, 2007). También considera modelos termodinámicos para la predicción de la temperatura de hibridación y la formación de *hairpins* y dímeros de *primers* (Allawi and Santa Lucía, 1997, 1998; Peyret *et al.*, 1999; Bommarito *et al.*, 2000; Santa Lucía and Hicks, 2004). Además, a diferencia de otros *software*, el Primer3 posee una interface con el banco de genes NCBI denominada “*Primer-BLAST*” (Benson *et al.*, 2010). Esto permite chequear la especificidad de los cebadores diseñados, considerando todas las secuencia de ADN de otros organismos almacenadas diferentes al de nuestro interés (Rozen and Skaletsky, 2000; Sayers *et al.*, 2012; Untergrasser *et al.*, 2012).

La disponibilidad de todas estas herramientas, permiten la puesta a punto de un método de detección para *Thecaphora frezii* basado en biología molecular.

Debido a que Argentina es el único país donde se ha reportado en maní cultivado la presencia de carbón, es necesario contar con un método rápido, preciso y sensible para la detección de *Thecaphora frezii* en las semillas de esta leguminosa. Esta necesidad se refuerza en las características agroexportadoras de la industria manisera (Cámara Argentina del maní, 2013), que además de productos manufacturados, exporta granos y semillas de maní. Esto representa un riesgo fitosanitario, ya que son el principal vehículo del patógeno a lotes no infestados (Marraro Acuña *et al.*, 2009, 2011). La exigencia de sanidad por parte de los países compradores podría constituir una barrera para-arancelaria, lo que representaría grandes problemas, especialmente para las zonas cuyas principales actividades económicas se sustentan en la industria manisera. La disponibilidad de un

método de detección sensible, no solo resultaría útil para verificar la sanidad de las partidas de exportación. También podría aplicarse en el estudio de la epidemiología de la enfermedad y en los procesos de producción de semillas, para lo que se necesitan suelos libres de patógenos y material de partida sano. Los métodos moleculares basados en la técnica de PCR resultan eficientes para tal finalidad.

## **HIPÓTESIS**

Las teliosporas de *Thecaphora frezii* que se encuentran como contaminantes en las semillas de maní pueden ser detectadas mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando cebadores específicos diseñados *de novo*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detectar *Thecaphora frezii* en semillas de maní mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con cebadores específicos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I- Diseñar cebadores específicos para *Thecaphora frezii* utilizando la región ITS del ADN ribosomal.
- II- Estandarizar el método de detección de teliosporas de *Thecaphora frezii* en semillas de maní.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1- Diseño de cebadores específicos para *Thecaphora frezii*

##### 1.1.- Extracción de ADN de teliosporas de *T. frezii*

Se recolectaron muestras de frutos carbonosos de diferentes zonas del área productora de maní de Argentina. Las teliosporas presentes en las vainas infectadas fueron extraídas y conservadas en sobres de papel en contenedores individuales con sílica gel a 4 °C hasta su utilización. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo del CTAB con modificaciones del propuesto por Doyle y Doyle (1990) (Conforto *et al.*, 2013). Se realizó la molienda con nitrógeno líquido de 1 g de teliosporas de cada muestra en morteros de porcelana esterilizados (Andrade *et al.*, 2004). La molienda resultante se colocó en microtubos de 1,5 ml. Se agregaron 490 µl de buffer CTAB al 2% y 10 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 20 min homogeneizando cada 5 min. A temperatura ambiente, se agregaron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1 v/v) y se agitaron 30 seg en vortex. Se centrifugaron por 5 min a 10.000 rpm, se recuperó el sobrenadante de cada muestra en nuevos tubos rotulados. Se agregó nuevamente cloroformo/alcohol isoamílico (500 µl) y se centrifugó 5 min a 10.000 rpm. En un nuevo tubo se recuperaron 300 µl del sobrenadante y se precipitó el ADN con 210 µl de isopropanol frío (-20 °C). Se incubó 1 h en freezer a -20 °C y se centrifugó 30 min a 12.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó 10 min a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet en una secadora. Se agregaron 40 µl de H<sub>2</sub>O calidad Milli-Q y se dejó resuspender toda la noche a 4 °C. La calidad del ADN extraído se controló mediante espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3.5 (NanoDrop Technologies, USA) y mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

## **1.2.- Amplificación de la región ITS**

Para la amplificación de la secuencia correspondiente a la región ITS del ADN ribosomal se usaron los cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') – ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Gardes y Bruns, 1993; Zhao *et al.*, 2007). La mezcla de reacción para PCR se realizó en un volumen total de 25 µl, conteniendo 0.5 U de GoTaq® ADN polimerasa y 5× buffer (Promega, USA), 0.25 µM de cada primer, 0.25 µM de dNTP, y 1 µl de DNA (20-30 ng/ µl). Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; seguida de 32 ciclos de 94 °C por 45 seg, 58 °C por 45 seg y 72 °C por 45 seg; con una extensión final a 72 °C por 10 min. Se utilizó el termociclador Biometra T-Personal. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y previa tinción con bromuro de etidio, el ADN amplificado fue visualizado bajo luz UV (Gardes y Bruns, 1993; Sander *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2007; Shahnazi *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012).

## **1.3.- Secuenciación del amplificado de la región ITS y diseño de cebadores específicos para *Thecaphora frezii*.**

El ADN amplificado a partir de los cebadores universales ITS1 e ITS4, de las muestras recolectadas se purificó mediante columnas Wizard® (Promega, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Shahnazi *et al.*, 2012; Conforto *et al.*, 2013) y se acondicionaron para la secuenciación automática (Macrogen, Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas usando el software SeqMan (Lasergene software, DNASTAR ver. 8.0.2, 2008) (Camacho López *et al.*, 2014) y depositadas en el Banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de los aislamientos analizados fueron comparadas con las disponibles en el banco de genes mediante el programa Blast-n (Altschul *et al.*, 1990). Se realizó un alineamiento con las secuencias de los diferentes aislamientos y se obtuvo una secuencia consenso. En base a ésta se realizó el diseño de cebadores específico para *T. frezii* usando el programa *on line* Primer3 versión 0.5 (Koressaar y Remm, 2007). Los cebadores específicos se sintetizaron en Invitrogen™ y fueron testeados de acuerdo al protocolo de Conforto *et al.*, (2013). Para determinar la

temperatura óptima de hibridación de los cebadores diseñados, se realizó una PCR con gradientes de temperatura.

## **2- Estandarización del método de detección de teliosporas de *Thecaphora frezii* en semillas de maní.**

### **2.1.- Recuperación de teliosporas en semillas de maní y extracción de ADN.**

En un vaso de precipitado se realizó el lavado con 200 ml de agua destilada estéril de 400 semillas de maní infestadas artificialmente con teliosporas de *T. frezii*. Se agitó manualmente durante tres minutos. El agua de lavado filtrada con filtros de gasa se dividió en cuatro tubos falcon de 50 ml y se centrifugó a 3500 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y cada pellet se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. Se colocó el contenido de los 4 tubos en uno solo y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en pellet en 1 ml de agua destilada estéril y se trasladó el contenido a un microtubo de 1.5 ml. Se centrifugó a 3500 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue macerado con un micropistilo EPPI de polipropileno estéril con el agregado de 200 µl buffer CTAB para comenzar la extracción de ADN. Todo el procedimiento se realizó por triplicado.

### **2.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en la detección de *Thecaphora frezii*.**

Para la determinar de la sensibilidad de la técnica de PCR utilizando los cebadores específicos diseñados en este trabajo para la detección de *T. frezii* en semillas infectadas, se prepararon suspensiones de teliosporas en diferentes concentraciones:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 10 y 1 teliosporas/ml. Las mismas se obtuvieron realizando un conteo inicial de teliosporas al microscopio óptico y realizando diluciones sucesivas. Con dichas suspensiones se inocularon diferentes grupos de semillas de maní a partir de las cuales se realizó la extracción de ADN de la manera descrita anteriormente. Para la determinación de

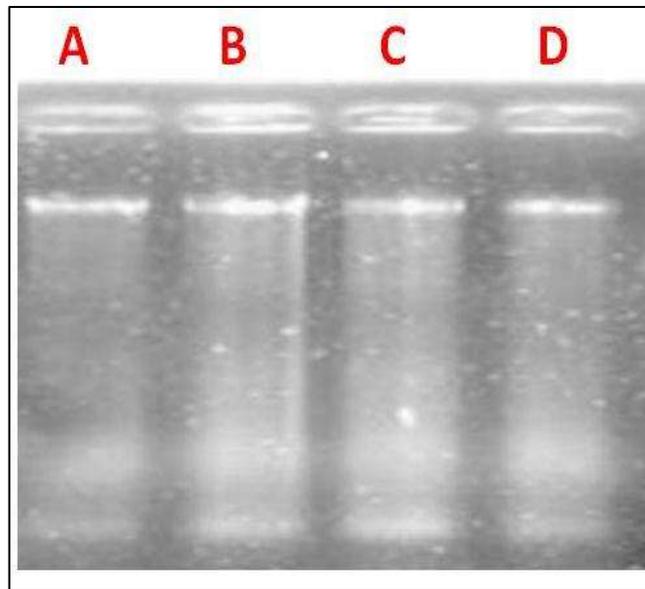
especificidad se realizó una PCR usando el ADN extraído de cuatro aislados de *T. frezii* y de 4 aislados de especies fúngicas transmitidas por semillas de maní: *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium solani* usadas como control. Para estas últimas, la extracción de ADN se realizó a partir de micelio obtenido en cultivos *in vitro* usando el método del CTAB.

### RESULTADOS

#### 1- Diseño de cebadores específicos para *Thecaphora frezii*

##### 1.1.- Extracción de ADN de teliosporas de *T. frezii*

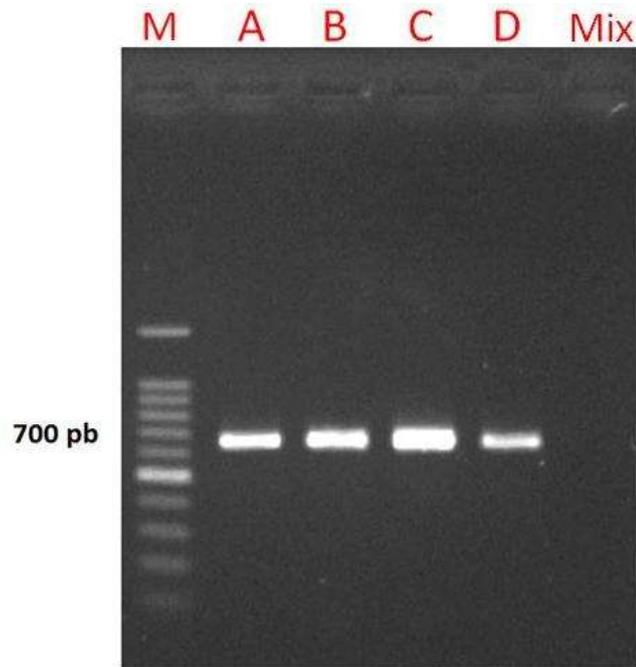
En la recolección de muestras se obtuvieron cuatro aislamientos en total. Dos aislados (Cba-GD1 y Cba-GD2) de General Deheza, Córdoba (32° 45' 20.53"S, 63° 46' 56.5"W) un aislado (Cba-CH1) de Charras, Córdoba (33° 1' 33.03"S, 64° 2' 49.44"W) y un aislado (Sa-EM1) de Embarcación, Salta (23° 12' 37.16"S, 64° 5' 50.3"W). El ADN extraído a partir de teliosporas usando el método del CTAB con modificaciones (Conforto *et al.*, 2013) tuvo concentraciones entre 100 y 140 ng/ $\mu$ l (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1.** Gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de ADN de los diferentes aislados de *T. frezii*. De **A-D**: Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1 y Sa-EM1.

## 1.2.- Amplificación de la región ITS

A partir del ADN extraído de cada aislamiento se realizó la amplificación por PCR de la región ITS usando los cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') – ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Para los cuatro aislamientos de *T. frezii* se obtuvieron fragmentos de ADN de aproximadamente 680 pb, de acuerdo a lo esperado para los cebadores utilizados (Fig. 3.2).



**Fig. 3.2.** Gel de agarosa con los productos de PCR usando los cebadores universales ITS1 e ITS4 para los cuatro aislamientos de *T. frezii*. **M:** marcador molecular 100pb; **A-D:** Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1 y Sa-EM1; **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN.

## 1.3.- Secuenciación del amplificado de la región ITS y diseño de cebadores específicos *Thecaphora frezii*.

Las secuencias obtenidas después del proceso de secuenciación automática fueron editadas y depositadas en el banco de genes (NCBI) (Benson *et al.*, 2010) con los siguientes números de acceso:

**Cba-GD1: KP994417**  
**Cba-GD2: KP994418**  
**Cba-CH1: KP994419**  
**Sa-EM1: KP994420**

Las secuencias publicadas fueron las siguientes:

Cba-GD1: 716 pb

TTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGTCTGAGGCCAGATGTCAAAGAGTGC  
GAAGACGCGACCCTGGACCCTTTCGAAAAAGAAAAAGGCCAAGACCGGCTCCCTTGGTTAAGA  
AGCAAAATTCCGACCGGCACAGACGCCCCCTCCCAAAAGGAAATTCCAATGATTTTTTCGCTCA  
ACAGCCTACCAGCAAGATACTTATCACGCTGACAGTCCGCTTCGCTACTTTTTTCAAAGGAAAA  
AAAGGCGATCCGACCATATGGAAAGAATTCCAGCTAATATATTTAGAGCGAGCCCGCGCGAAC  
GGGCAAAAAAACGCTCAAGACTAAACCCAAGCAGACTTTAATGAAAAAATCCGAGGTTTAAAG  
GGTGTCTGTGACTCAAACAGGCATGCCCTAAGGAATACCAAAGGGCGCAAGATGCGTTCAA  
AGATTCGATGATTCACTGACTTCTGCAATTCACAATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCAT  
CGATAGGAGAACCTAGAGATCCGTTGCCGAAAGTTGTGTTTAACTTTCACCTTCCTTCGAAGGA  
TTTTTTGTTTACATTCTTAAGATAGTTGCTTTGCGTTTGAATGAATTTTCATATGTGCACAGGTGT  
GTGTGTGTGTGGTTGGTGGATCGCAGCTCTAAGACGGCCGGTGAAGGCCATCTCGGAAGTGC  
TACGTTTTTTTTAC

Cba-GD2: 719 pb

ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGTCTGAGGCCAGATGTCAAAGAGTGC  
GACGCGACCCTGGACCCTTTCGAAAAAGAAAAAGGCCAAGACCGGCTCCCTTGGTTAAGAAGC  
AAAATTCGACCGGCACAGACGCCCCCTCCCAAAAGGAAATTCCAATGATTTTTTCGCTCAACA  
GCCTACCAGCAAGATACTTATCACGCTGACAGTCCGCTTCGCTACTTTTTTCAAAGGAAAAAAA  
GGCGATCCGACCATATGGAAAGAATTCCAGCTAATATATTTAGAGCGAGCCCGCGCGAACGGG  
CAAAAAAACGCTCAAGACTAAACCCAAGCAGACTTTAATGAAAAAATCCGAGGTTTAAAGGGT  
GCTCGTGACTCAAACAGGCATGCCCTAAGGAATACCAAAGGGCGCAAGATGCGTTCAAAGA  
TTCGATGATTCACTGACTTCTGCAATTCACAATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGA  
TAGGAGAACCTAGAGATCCGTTGCCGAAAGTTGTGTTTAACTTTCACCTTCCTTCGAAGGATTTT  
TTGTTTACATTCTTAAGATAGTTGCTTTGCGTTTGAATGAATTTTCATATGTGCACAGGTGTGTG  
TGTGTGTGTGGTTGGTGGATCGCAGCTCTAAGACGGCCGGTGAAGGCCATCTCGGAAGTGC  
GTTTTTTTACAACAAT

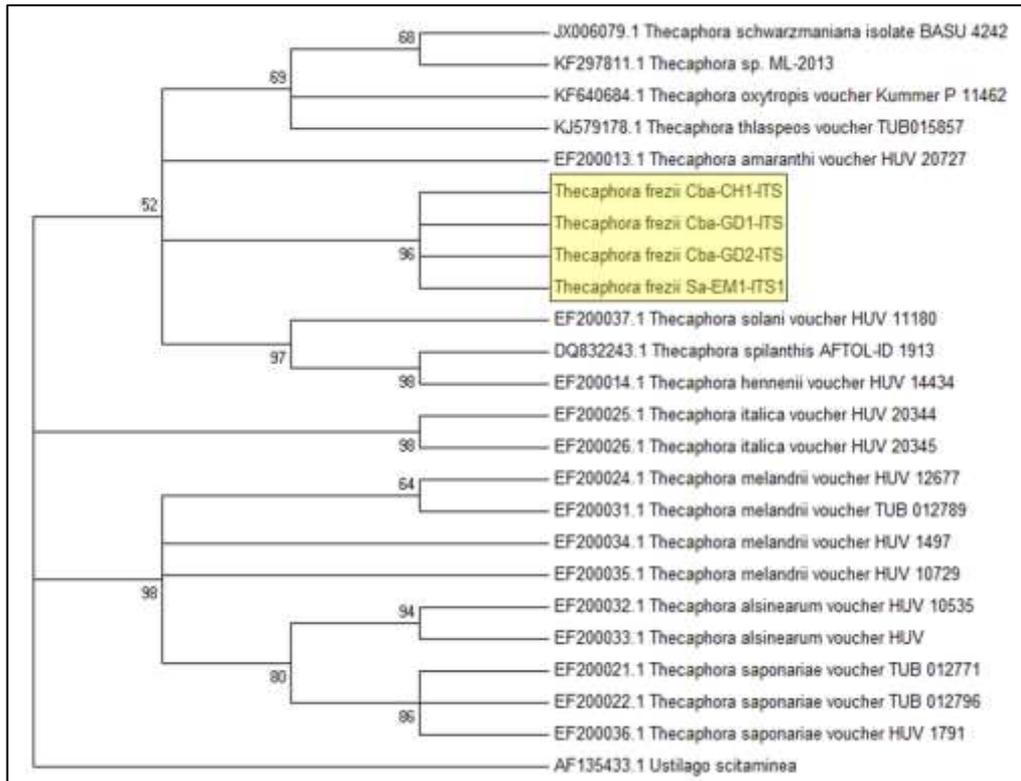
Cba-CH1: 722 pb

ATTGTTGTAAAAAACGCTAGCAGTTCGAGATGGCCTTCACCGCCGTCTTAGAGCTGCGATCC  
ACCAACCACACACACACACACCTGTGCACATATGAAATTCATTTCAAACGCAAAGCAACTAT  
CTTAAGAATGTAAACAAAAAATCCTTCGAAGGAAGGTGAAAGTTAAACACAACCTTTCGGAAC  
GGATCTCTAGGTTCTCCTATCGATGAAGAACGACGCAATTGCGATAAGTAATTGTGAATTGCA  
GAAGTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCATGCC  
TGTTTTGAGTGTACGAGCACCCTTTAAACCTCGGATTTTTTTCATTAAGTCTGCTTGGGTTTAGT  
CTTGAGCGTTTTTTTTGCCGTTTCGCGCGGGCTCGCTCTAAATATATTAGCTGGAATTCTTTCCAT  
ATGGTCGGATCGCCTTTTTTTCCTTTGAAAAAGTAGCGAAGCGGACTGTCAGCGTGATAAGTA  
TCTTGCTGGTAGGCTGTTGAGCGAAAAAATCATTGGAATTTCTTTTGGGAGGGGGCGTCTGTG  
CCGGTCGGAATTTTGCTTCTTAACCAAGGGAGCCGGTCTTGGCCTTTTTCTTTTTCGAAAGGGTC  
CAGGGTCGCGTCTTCGCACTCTTGACATCTGGCCTCAGACAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT  
AAGCATATCAATAAA

Sa-EM1: 726 pb

```
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGTCTGAGGCCAGATGTCAAAGAGTGCGAAGACGC
GACCCTGGACCCCTTTCGAAAAAGAAAAAGGCCAAGACCGGCTCCCTTGGTTAAGAAGCAAAAT
TCCGACCGGCACAGACGCCCCCTCCCAAAAGGAAATCCAATGATTTTTTCGCTCAACAGCCTA
CCAGCAAGATACTTATCACGCTGACAGTCCGCTTCGCTACTTTTTTCAAAGGAAAAAAAGGCGA
TCCGACCATATGGAAAGAATTCCAGCTAATATATTTAGAGCGAGCCCGCGCGAACGGGCAAAA
AAACGCTCAAGACTAAACCCAAGCAGACTTTAATGAAAAAATCCGAGGTTTAAAGGGTGCTCG
TGACTCAAAACAGGCATGCCCTAAGGAATACCAAAGGGCGCAAGATGCGTTCAAAGATTCTGA
TGATTCACTGACTTCTGCAATTCACAATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATAGGA
GAACCTAGAGATCCGTTGCCGAAAGTTGTGTTAACTTTCACCTTCCTTCGAAGGATTTTTTGT
TACATTCTTAAGATAGTTGCTTTGCGTTTGAATGAATTCATATGTGCACAGGTGTGTGTGTGT
GTGTGGTTGGTGGATCGCAGCTCTAAGACGGCCGGTGAAGGCCATCTCGGAACTGCTACGTTTT
TTACAACAATGATCCTTCTGC
```

Al comparar dichas secuencias con las publicadas en el banco de genes del NCBI (Benson *et al.*, 2010), se observó un 100% de identidad entre los aislamientos de *Thecaphora frezii*, 86% de identidad con *Thecaphora solani* (EF200037.1) y 83% con *Thecaphora amaranthi* (EF200013.1). El alineamiento entre secuencias para el análisis filogenético se realizó usando CLUSTAL W (versión 1.8) (Thompson *et al.* 1994), del software MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). El árbol filogenético construido usando el método de *Neighbour Joining* para el que se usaron 19 especies del género *Thecaphora* y a *Ustilago scitaminea* como extragrupo, mostró a los aislamientos de *T. frezii* agrupados en un clado particular soportado con un alto valor de bootstrap (96) (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3.** Árbol filogenético construido con el método de NJ basado en las secuencias ITS de los 4 aislamientos de *T. frezii*, 19 representantes del género *Thecaphora* y *Ustilago scitaminea* usado como extragrupo.

Con el uso del software SeqMan (Lasergene software, DNASTAR ver. 8.0.2, 2008) (Camacho López *et al.*, 2014) se obtuvo una secuencia consenso representativa de los cuatro aislamientos, a partir de la cual se diseñaron los cebadores específicos para *T. frezii*.

#### Secuencia consenso 726 pb

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGTCTGAGGCCAGATGTCAAAGAGTGCGAAGACGC  
 GACCCTGGACCCTTTCGAAAAAGAAAAAGGCCAAGACCGGCTCCCTTGGTTAAGAAGCAAAAT  
 TCCGACCGGCACAGACGCCCCCTCCCAAAGGAAATTCCAATGATTTTTTCGCTCAACAGCCTA  
 CCAGCAAGATACTTATCACGCTGACAGTCCGCTTCGCTACTTTTTTCAAAGGAAAAAAGGCCGA  
 TCCGACCATATGGAAAGAATTCCAGCTAATATATTTAGAGCGAGCCCGCGCGAACGGGCAAAA  
 AAACGCTCAAGACTAAACCCAAGCAGACTTTAATGAAAAAATCCGAGGTTTAAAGGGTGCTCG  
 TGACTCAAACAGGCATGCCCTAAGGAATACCAAGGGCGCAAGATGCGTTCAAAGATTCGA  
 TGATTCACTGACTTCTGCAATTCACAATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTCATCGATAGGA  
 GAACCTAGAGATCCGTTGCCGAAAGTTGTGTTTAACTTTCACCTTCCTTCGAAGGATTTTTGT  
 TACATTCTTAAGATAGTTGCTTTGCGTTTGAAATGAATTCATATGTGCACAGGTGTGTGTGT  
 GTGTGGTTGGTGGATCGCAGCTCTAAGACGGCCGGTGAAGGCCATCTCGGAAGTCTACGTTTT  
 TTACAACAATGATCCTTCTGCAC

Mediante el programa *on line* Primer3 versión 0.5, se pudo analizar y seleccionar las secuencias de 5 pares de cebadores con capacidad de hibridar en el ADN de *T. frezii*:

**TF-1:** 187 pb

Comienzo: 445            Fin: 631  
Forward: TGATTCACTGACTTCTGCAA  
Reverse: ACACCTGTGCACATATGAAA

**TF-2:** 160 pb

Comienzo: 43            Fin: 202  
Forward: ATGTCAAAGAGTGCGAAGAC  
Reverse: TATCTTGCTGGTAGGCTGTT

**TF-3:** 173 pb

Comienzo: 216            Fin: 388  
Forward: CAGTCCGCTTCGCTACTTTT  
Reverse: AGTGTCACGAGCACCCCTTA

**TF-4:** 179 pb

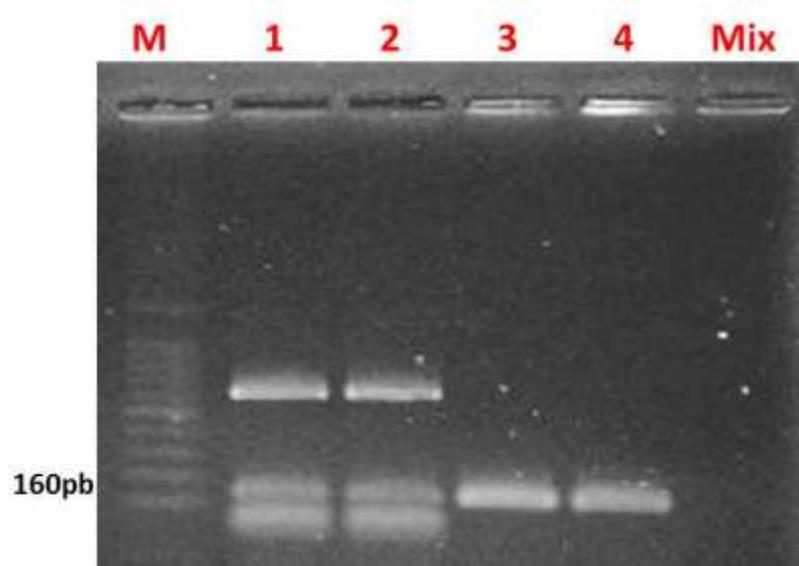
Comienzo: 487            Fin: 665  
Forward: CGCTGCGTTCTTCATCGATA  
Reverse: TTAGAGCTGCGATCCACCAA

**TF-5:** 199 pb

Comienzo: 203            Fin: 401  
Forward: CTTATCACGCTGACAGTCCG  
Reverse: GCATGCCTGTTTGAGTGCA

De los cinco pares de cebadores obtenidos *in silico*, TF-3, TF-4 Y TF-5 fueron descartados debido a que presentaban homología con *T. frezii* y también con las secuencias de diferentes especies publicadas en el banco de genes. Los pares de cebadores TF-1 y TF-2 presentaron las mejores condiciones para la reacción de PCR por lo cual sus secuencias se enviaron a sintetizar al laboratorio de Invitrogen<sup>TM</sup>. Se realizaron reacciones de PCR por separado para cada juego de cebadores y la temperatura de hibridación utilizada en ambos casos fue de 55°C, según lo proporcionada por el programa utilizado. Después de verificar

los productos de PCR en gel de agarosa al 1,5 % se descartó el par TF-1, debido a la presencia de amplificaciones espurias (Fig. 3.4).



**Fig. 3.4.** Gel de agarosa con los productos de PCR empleando los cebadores específicos diseñados para *T. frezii*. **M:** marcador molecular de 100pb. **1-2:** Productos de PCR empleando el juego de cebadores TF1. **3-4:** Productos de PCR empleando el juego de cebadores TF2. **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN.

El par de cebadores que generó productos amplificados claramente definidos fue el **TF-2** (Tabla 3.1, Fig. 3.5).

**Tabla 3.1.** Características de los cebadores específicos para la detección de *T. frezii*

Cebador	Secuencia	Long. (pb)	Ta (°C)	Contenido de CG (%)	Comienzo	Long. del fragmento (pb)
<b>TF-2F</b>	ATGTCAAAGAGTGCGAAGAC	20	55	45	43	<b>160</b>
<b>TF-2R</b>	TATCTTGCTGGTAGGCTGTT	20	54.5	50	183	

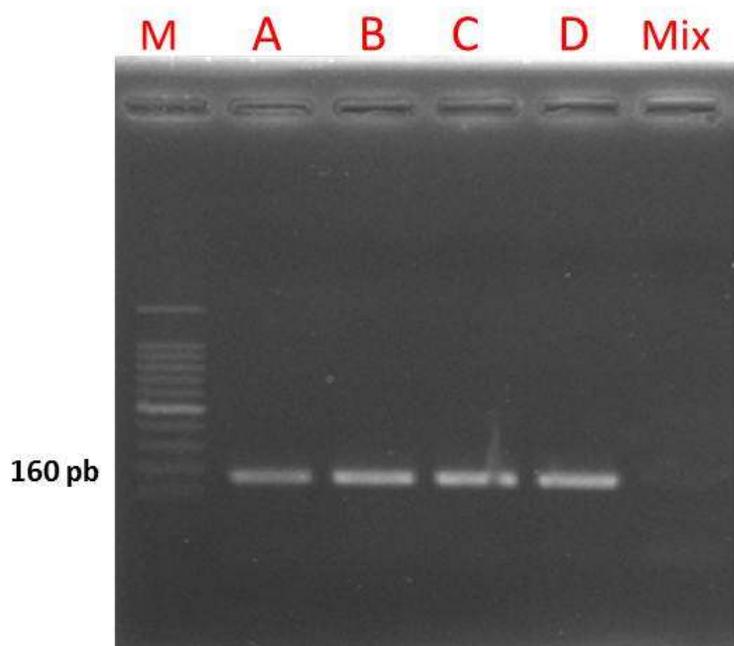
```

1   TATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGTCTGAGGCCAG ATGTCAAAGAGTGCGAAG
61  ACGCGACCCCTGGACCCCTTCGAAAAAAGAAAAAGGCCAAGACCGGCTCCCTTGGTTAAGAA
121 GCAAAAATTCGACCGGCACAGACGCCCCCTCCAAAAAGGAAATTC AATGATTTTTTCGC
181 TC AACAGCCTACCAGCAAGATA CTTATCAGCTGACAGTCCGCTTCGCTACTTTTTCAA
241  AGGAAAAAAGGCGATCCGACCATATGGAAAGAATTCCAGCTAATATATTTAGAGCGAGC
301  CCGCGCGAACGGGCAAAAAACGCTCAAGACTAAACCCAAGCAGACTTTAATGAAAAAAT
361  CCGAGGTTTAAAGGGTGCTCGTGACACTCAAACAGGCATGCCCTAAGGAATACCAAAGGG
421  CGCAAGATGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGACTTCTGCAATTCACAATTACTTATC
481  GCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATAGGAGAACCTAGAGATCCGTTGCCGAAAGTTGTGT
541  TTAACTTTCACCTTCCTTCGAAGGATTTTTGTGTTACATTCTTAAGATAGTTGCTTTGCG
601  TTTGAAATGAATTCATATGTGCACAGGTGTGTGTGTGTGTGGTTGGTGGATCGCAGC
661  TCTAAGACGGCCGGTGAAGGCCATCTCGGAAGTCTACGTTTTTTACAACAATGATCCTT
721  CTGCA

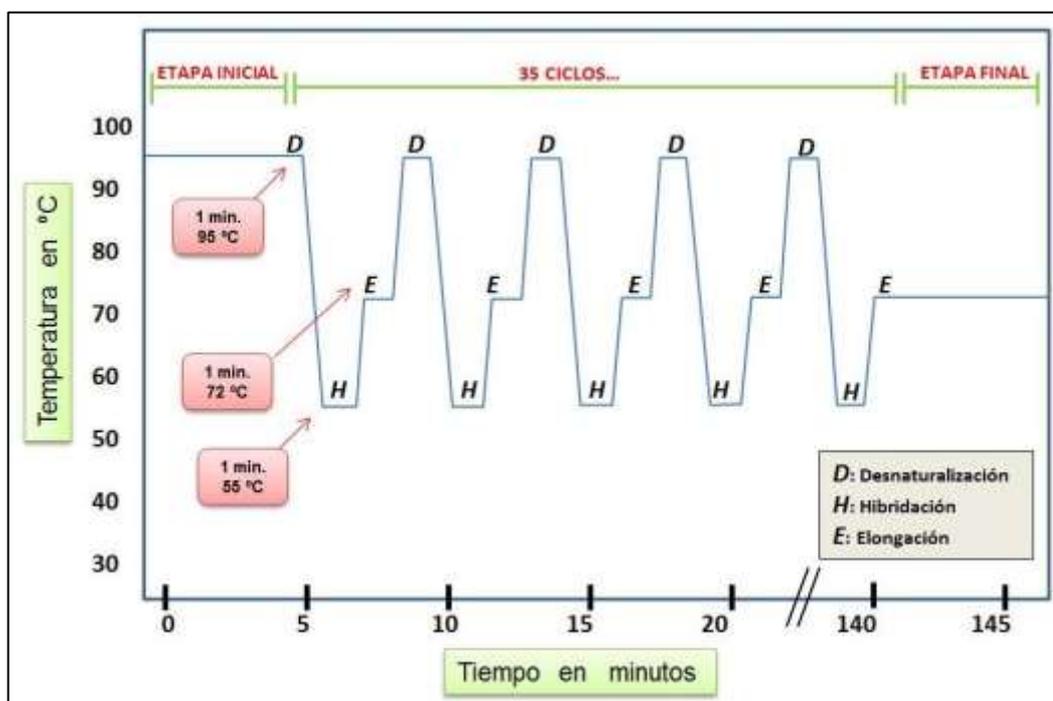
```

Fig. 3.5. Sitio de unión de los cebadores específicos para *T. frezii* en la secuencia consenso.

Las reacciones de PCR realizadas usando la temperatura de hibridación de 55 °C fueron positivas para los cuatro aislamientos de *T. frezii* (Fig. 3.6). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguida de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; con una extensión final a 72 °C por 5 min (Fig. 3.7).



**Fig. 3.6.** Gel de agarosa con los productos de PCR usando los cebadores específicos TF-2F y TF-2R para los cuatro aislamientos de *T. frezii*. **M:** marcador molecular 100pb; **A-D:** Cba-GD1, Cba-GD2, Cba-CH1 y Sa-EM1; **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN.

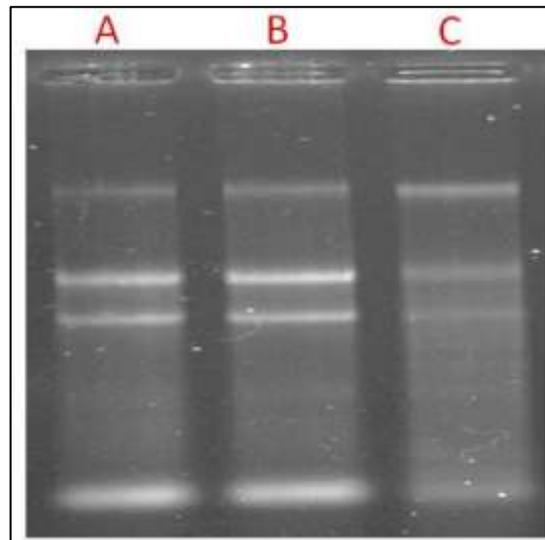


**Fig. 3.7.** Esquema de las condiciones de PCR para la detección de *T. frezii* usando los cebadores específicos diseñados, TF-2F y TF-2R.

## 2- Estandarización del método de detección de teliosporas de *Thecaphora frezii* en semillas de maní

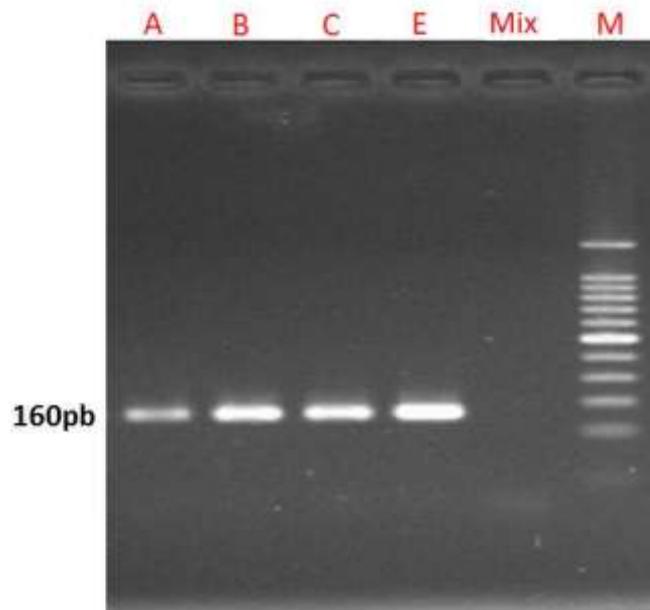
### 2.1.- Recuperación de teliosporas en semillas de maní y extracción de ADN.

La extracción de ADN de semillas de maní infestadas superficialmente con *T. frezii* arrojó resultados positivos. La calidad y cantidad de ADN se verificó mediante electroforesis de los productos de extracción en gel de agarosa al 1% (Fig. 3.8).



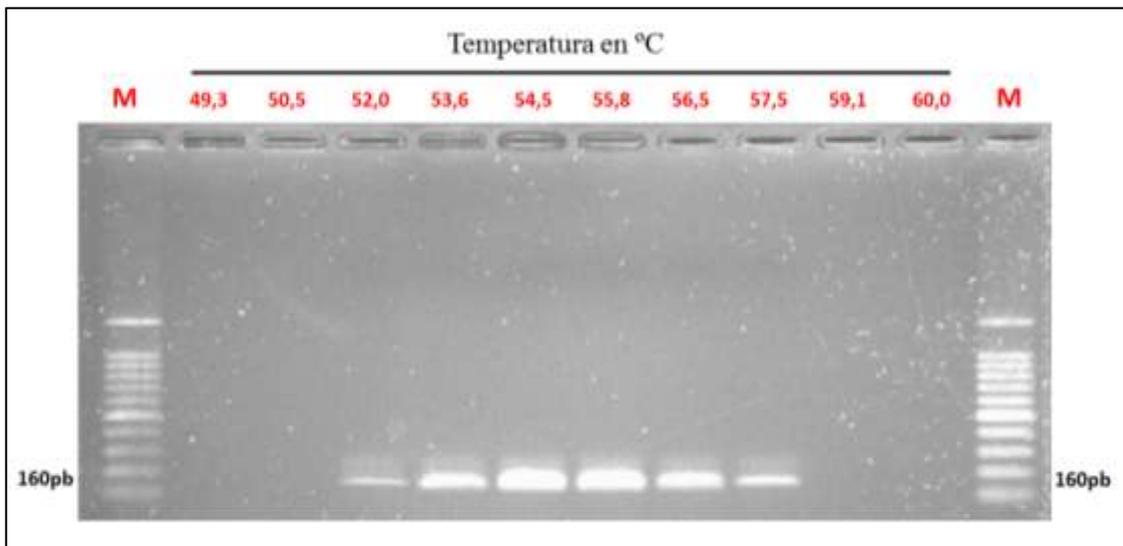
**Fig. 3.8.** Gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de ADN de semillas de maní infestadas superficialmente con teliosporas de *T. frezii*. A, B y C: Muestras 1, 2 y 3 respectivamente.

Se realizó una PCR para las tres muestras usando los cebadores específicos y las condiciones descritas anteriormente. Se obtuvieron bandas de amplificación de ADN en el orden de los 160 pb, tamaño esperado para *T. frezii* (Fig. 3.9).



**Fig. 3.9.** Gel de agarosa con los productos de PCR resultantes de la utilización del ADN extraído de semillas infestadas superficialmente con teliosporas de *T. frezii*. **A, B y C:** Muestras 1, 2 y 3 respectivamente; **E:** control positivo; **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN; **M:** marcador molecular 100pb.

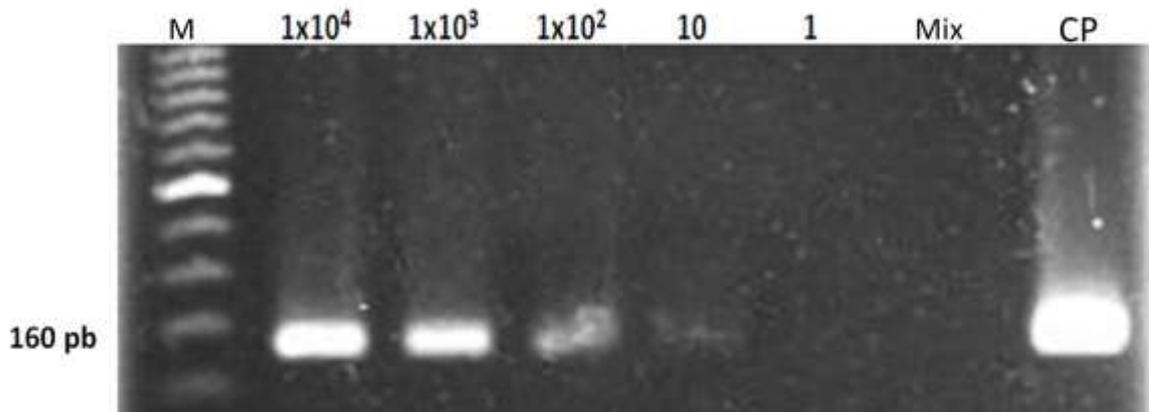
Para corroborar que la temperatura de óptima de hibridación es de 55 °C, se realizó una PCR con gradientes de temperatura. El rango testado fue de 49 a 60 °C. Solo se observó amplificación entre los 52 y los 57,5°C (Fig. 3.10).



**Fig. 3.10.** Gel de agarosa con los productos de amplificación de la PCR con gradientes de temperatura de *annealing*. Se observa amplificación entre los 52°C y los 57,5°C. **M:** Marcador molecular.

## 2.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en la detección de *Thecaphora frezii*.

En la determinación de sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de *T. frezii* en semillas de maní, los resultados fueron positivos para las semillas inoculadas con  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 10 teliosporas. Los resultados fueron negativos para la muestra inoculada con 1 teliospora y el control sin inocular (Tabla 3.2, Fig. 3.11).



**Fig. 3.11.** Gel de agarosa con los productos de reacción de PCR usando ADN extraído de las semillas inoculadas con diferentes cantidades de teliosporas de *T. frezii*. (De  $1 \times 10^4$  a 1 teliosporas) **M:** Marcador molecular 100 pb. **Mix:** Mezcla de reacción sin ADN. **CP:** Control positivo.

En la determinación de especificidad de la técnica de PCR, sólo los aislamientos correspondientes *T. frezii* arrojaron resultados positivos, mientras que los aislamientos correspondientes a *Sclerotium rolfii*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium solani* no presentaron reacción (Tabla 3.2, Fig. 3.12). Para explicar los resultados realizó un alineamiento entre las secuencias de *T. frezii* (consenso) y de los patógenos mencionados anteriormente. No se observó homología entre las regiones correspondiente a la unión de los cebadores específicos diseñados (Fig. 3.13).



**Tabla 3.2.** Resultados de las pruebas de especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR en la detección de teliosporas de *Thecaphora frezii*.

Especie fúngica	Aislamiento	Resultados						
		Especificidad	Sensibilidad (t/m)*					
			10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10	1	0
<i>T. frezii</i>	Cba-GD1	+	+	+	+	+	-	-
<i>T. frezii</i>	Cba-GD2	+	+	+	+	+	-	-
<i>T. frezii</i>	Cba-CHA1	+	+	+	+	+	-	-
<i>T. frezii</i>	Sa-EM1	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. minor</i>	Sc-m	-						
<i>S. sclerotiorum</i>	Sc-s	-						
<i>S. rolfsii</i>	Sc-r	-						
<i>F. solani</i>	Fu-s	-						

\*número de teliosporas por muestras

### DISCUSIÓN

En el desarrollo de este trabajo de tesis se generó una metodología para la detección de *T. frezii* en semillas de maní usando la técnica de PCR. Este método presenta muchos beneficios aplicables a la detección de patógenos en semillas (Zhang *et al.*, 1999; Hussai *et al.*, 2000; Pryor y Gilbertson, 2001; Marcinkowska, 2002; Narayanasamy, 2011). A diferencia de los métodos tradicionales que poseen periodos prolongado de incubación para la identificación de algunos patógenos que acompañan a la semilla, el uso de la técnica de PCR proporciona resultados en pocas horas (Limonard, 1966; Warham *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2001). Posee gran especificidad, ya que detecta secuencias de ADN específicas del patógeno de interés, pudiendo diferenciar especies y sub especies dentro de un mismo género (Mullis, 1990; Ward y Bateman, 1999; Narayanasamy, 2011). Otra característica relevante es la gran sensibilidad de la técnica, ya que se pueden detectar pequeñas concentraciones de patógenos después de la amplificación de su ADN (Tsedaley, 2015). Otro beneficio radica en la fácil interpretación y la objetividad de los resultados. Se determina el estado sanitario de la semilla según la presencia o ausencia del fragmento de ADN amplificado con el tamaño específico esperado para el patógeno mediante electroforesis en geles de agarosa, de baja complejidad técnica y costo (Frederick *et al.*, 2002; Walcott, 2003). Todas estas características, otorgan ventajas a la técnica de PCR respecto a otras, como la microscopía óptica (Marcinkowska, 2002; Guillemette *et al.*, 2004).

Cuando se utilizaron los cebadores universales ITS1/ITS4 para la amplificación de la región ITS en *T. frezii* se obtuvo un fragmento de ADN de 680 pb, lo que concuerda con lo reportado por Kageyama *et al.*, (1997), Weiland y Sundsbak (2000), Lin *et al.*, (1994), Lee *et al.*, (2001), Ma y Michailides (2002), Guillemette *et al.*, (2004) entre otros. Una vez obtenida esta secuencia, se diseñaron los cebadores específicos usando el programa *on line* Primer3 versión 0.5. El principal motivo de la elección de este programa radica en la simplicidad de su uso, además de la accesibilidad al mismo, ya que se encuentra disponible para su uso libre en internet (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>) (Untergrasser *et al.*, 2012). Además, este *software* permite especificar un gran número de

variables y obtener los cebadores según los parámetros mencionados anteriormente (Allawi y Santa Lucía, 1997, 1998; Peyret *et al.*, 1999; Bommarito *et al.*, 2000; Santa Lucía y Hicks, 2004).

Una de las principales actividades realizadas en este proceso fue la puesta a punto de la extracción de ADN de *T. frezii* en semillas de maní. Chen *et al.*, (2014) utilizó el mismo método para la recuperación de esporas de *Ustilagoideia virens* en semillas de arroz, para el posterior diagnóstico molecular del falso carbón usando la técnica de PCR. Dipali *et al.*, (2013) también recomienda la recuperación de esporas del agua de lavado para la detección de patógenos que se encuentran infestando la semilla de trigo. En todos estos casos, se realiza la extracción de ADN de los microorganismos que se encuentran infestando superficialmente las semillas. Esto tiene ventajas respecto a realizar una extracción de ADN del tejido de la semilla de maní, ya que esta última posee altos niveles de polifenoles, polisacáridos y lípidos que tienden a precipitar los ácidos nucleicos, disminuyendo la cantidad y calidad del ADN obtenido durante el proceso de extracción (Narayanasamy, 2011; Dang y Chen, 2013).

Los componentes más importante del método de detección están relacionados con la especificidad y la sensibilidad (Chiocchetti *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Pryor y Gilbertson, 2001; Ma y Michailides, 2002; Guillemette *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Zaho *et al.*, 2007). La especificidad se debe a que los cebadores fueron diseñados a partir de la región ITS, altamente conservada dentro de la especie, pero muy variable entre especies diferentes (Lee *et al.*, 2001; Ma y Michailides, 2002; Villalobos *et al.*, 2005). Esta característica se evidencia en la Fig. 3.13, al realizar un alineamiento entre las secuencias de *T. frezii* (consenso) y de los otros patógenos transportados por semillas (*Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*), no se observa homología entre las regiones correspondientes a la unión de los cebadores específicos. Otro factor que influye en la especificidad de la técnica es la temperatura de hibridación de los cebadores. Pérez de Castro (2011), afirma que a mayor  $T_a$ , la reacción se hace más restrictiva, debido a que los cebadores solo se unirán a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Al realizar una PCR en gradientes de temperatura, se observa amplificación en el rango entre los 52 °C y 57,5 °C, 2 °C por debajo y 2,5 °C por encima de la temperatura recomendada por el *software* utilizado en el diseño de los cebadores para *T. frezii* (Fig. 3.10) lo que supone un rango de  $T_a$  de 6,5 °C.

Esto confirma lo que establece Pinzón (2006) sobre las temperaturas de *annealing* muy altas y muy bajas.

Con respecto a la sensibilidad del método, los resultados concuerdan con lo reportado por Hossein *et al.* (2009), quien realizó la detección de *Puccinia horiana* por PCR convencional en muestras donde al menos el 0,1% del material vegetal se encuentra contaminado. Zaho *et al.*, (2007) reporta la detección de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, agente causal de la roya amarilla del trigo en material asintomático, con un límite de detección de 0,1 pg de ADN del patógeno. Uno de los motivos de la elevada sensibilidad está ligado al gran número de copias que posee el ADN ribosomal en los hongos, lo que incrementa la cantidad del ADN blanco para los cebadores diseñados (Zaho *et al.*, 2007; Narayanasamy, 2011). Otro factor importante es la calidad del ADN extraído. Generalmente, las semillas se contaminan en el proceso de descascarado del maní, donde los frutos totalmente carbonosos liberan millones de teliosporas que se adhieren a la semilla sana (Marinelli *et al.*, 2008). Dichas teliosporas se encuentran en buen estado, debido a que las condiciones de secado de las vainas previo al descascarado no superan los 37 °C (Accietto *et al.*, 2004; Bongiovanni, 2012; Casini y Bragachini, 2014). Además, las teliosporas son almacenadas en condiciones controladas junto con la semilla (baja temperatura y humedad relativa), lo que reduce el deterioro de su ADN.

La existencia de un método basado en la biología molecular para la detección de *T. frezii* en semillas de maní representa un aporte tecnológico de relevancia para el sector manisero. La elección de la técnica de PCR se realizó teniendo en cuenta las características de especificidad y sensibilidad que aportan los resultados obtenidos. Además, su fácil implementación en un laboratorio que cuente con la infraestructura necesaria se traduce en un protocolo sencillo de aplicar para el procesamiento de muestras, lo que se demostró en el presente trabajo de tesis.

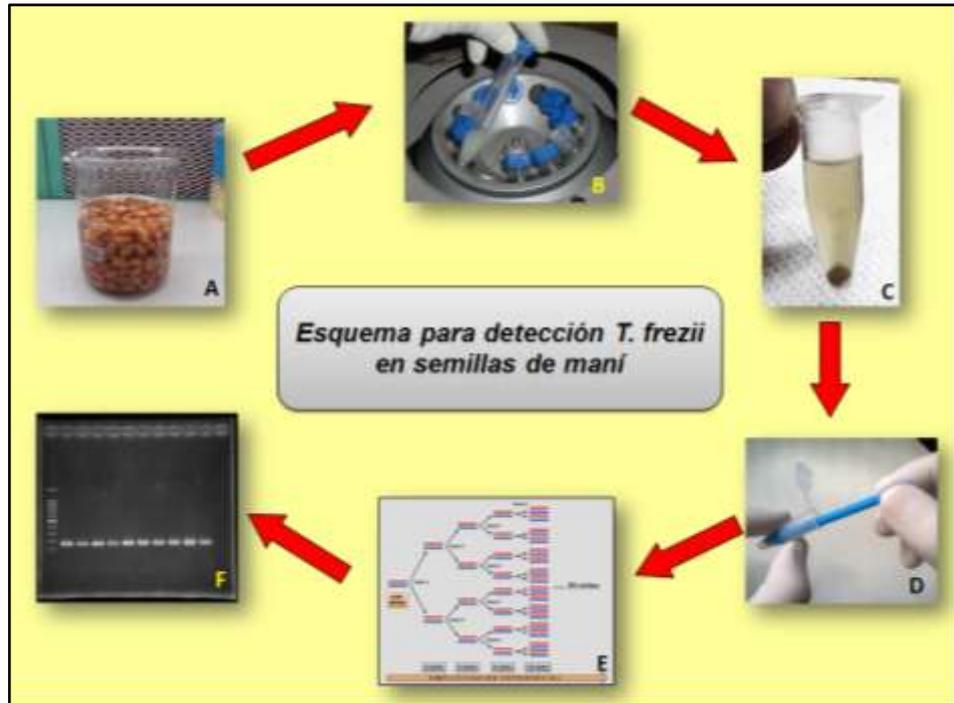
Actualmente, el carbón del maní se encuentra reportado en maní silvestre en Brasil y Bolivia (Carranza y Lindquist, 1962; Soave *et al.*, 2014). Solamente en Argentina se encuentra reportada en maní cultivado (Marinelli *et al.*, 1995). Esto podría representar grandes inconvenientes a la industria manisera por sus características netamente agro-exportadora (Fiant *et al.*, 2013), ya que además de productos manufacturados, exporta granos y semillas de maní. La presencia del patógeno podría constituir una barrera para-arancelaria impuesta por los países compradores, perjudicando especialmente a la

provincia de Córdoba, responsable del 92% de la producción nacional de maní (Bolsa de cereales de Córdoba, 2014). La disponibilidad del método de detección de *Thecaphora frezii* mediante la técnica de PCR, resulta de una herramienta útil para verificar la sanidad de las partidas de exportación, si así lo requiriesen los países compradores.

El método de detección también puede emplearse en estudios epidemiológicos de la enfermedad, debido a que la semilla es el principal vehículo del patógeno hacia nuevos lotes (Marinelli *et al.*, 1995; Marraro Acuña *et al.*, 2009, 2011). Esto adquiere gran importancia en los procesos de producción de semillas, ya que mediante el uso de la herramienta molecular se puede certificar la sanidad del material de partida durante la multiplicación. También podría adaptarse para la detección de teliosporas en el suelo de lotes destinados a semilleros. En este caso debería adaptarse el método de extracción de ADN a partir de muestras de suelo. Otra de las variantes que se podría desarrollar a partir de la PCR convencional es la PCR en tiempo real. Ésta, además de identificar al patógeno, permite determinar la cantidad presente en muestras de diferente origen (Hadas *et al.*, 2001; Van de Graaf *et al.*, 2003; Walcott, 2003; Guillemette *et al.*, 2004; Barnes y Szabo, 2007; Hossein *et al.*, 2009). Mediante el uso de la PCR en tiempo real, se podría cuantificar el aporte de inóculo por parte de la semilla a los nuevos lotes, además de verificar la cantidad de inóculo ya presente y correlacionarlo con la incidencia de la enfermedad al momento de la cosecha.

### CONCLUSIONES

- Es posible amplificar la región ITS del ADN de *Thecaphora frezii* usando los cebadores universales ITS1 – ITS4.
- La región ITS amplificada y secuenciada corresponde a una especie diferente a las ya publicadas en el Banco de Genes **NCBI** (*National Center of Biotechnology Information*).
- Es posible el diseño de cebadores específicos para *Thecaphora frezii* a partir de la región ITS del ADN ribosomal mediante el uso de *Software*.
- Es posible extraer el ADN de las teliosporas de *Thecaphora frezii* que se encuentran contaminando superficialmente a las semillas de maní usando el método del CTAB con modificaciones.
- Es posible detectar las teliosporas de *Thecaphora frezii* que se encuentran como contaminantes superficiales de las semillas de maní mediante el uso de cebadores específicos empleando un protocolo.
- La técnica de PCR para la detección de *Thecaphora frezii* usando cebadores específicos puede detectar hasta 10 teliosporas por muestra de 400 semillas de maní.
- La detección por PCR de *Thecaphora frezii* es específica ya que no presenta reacción positiva con otros patógenos transportados por semillas, como *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium solani*.
- Del presente trabajo de tesis, surge un protocolo de fácil implementación para la detección de *T. frezii* en semillas de maní usando la técnica de PCR.



**Fig. 5.1.** Esquema para la detección de *T. frezii* en semillas de maní. **A:** Lavado de las semillas de maní. **B-C:** Recuperación de teliosporas del agua de lavado mediante centrifugación. **D:** Extracción de ADN del pellet por el método del CTAB. **E:** Amplificación por PCR. **F:** visualización de resultados mediante electroforesis en gel de agarosa.

### BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Accietto R., Rolando R., Sirena J. y Casini C. 2004. Efectos del secado sobre la calidad fisiológica de semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) en vainas. 19° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 62-63.
- Allawi H.T. and Santa Lucia J.Jr. 1997. Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA. *Biochemistry* 36: 10581–10594.
- Allawi H.T. and Santa Lucia J.Jr. 1998. Nearest-neighbor thermodynamics of internal A.C mismatches in DNA: sequence dependence and pH effects. *Biochemistry* 37: 9435–9444.
- Altschul F., Gish W., Miller W., Myers W. and Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Andrade O., Muñoz G., Galdames R., Durán P. and Honora R. 2004. Characterization, *in vitro* culture, and molecular analysis of *Thecaphora solani*, the causal agent of potato smut. *Etiology* 94 (8): 875-882.
- Ashley J.M. 1984. Groundnut. En: *The Physiology of tropical field crops*. Golsworthy P. R. and Fisher N.M. (eds). Chichester. pp 453-494.
- Astiz Gassó M., Leis R. y Marinelli A. 2008. Evaluación de incidencia y severidad de carbón del maní (*Thecaphora frezii*) en infecciones artificiales, sobre cultivares comerciales de maní. 1° Congreso Argentino de Fitopatología. Ciudad de Córdoba, Argentina. p 118
- Astiz Gassó M. y Wojszko A. 2011. Evaluación *in vitro* de fungicidas curasemillas para el control químico del carbón del maní. 26° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 60-62.
- Astiz Gassó M. y Marinelli A. 2013. Biología de la germinación de *Thecaphora frezii in vitro*. 28° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba. pp 62-63.
- Atkins S. and Clark I. 2004. Fungal molecular diagnostics. *Journal of Applied Genetics* 45(1): 3-5.
- Barnes C.W. and Szabo L.J. 2007. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 97: 717-727.
- Barreto D. 1992. Deterioro patológico de semillas en cultivos oleaginosos. 8° Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Paraná. Entre Ríos. Presentación oral.
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. and Sayers E.W. 2010. GenBank. *Nucleic Acids Research* 38: D46–D51.
- Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de Córdoba. 2014. Informe especial n° 69, Campaña 2013/2014: Producción final de maní. Córdoba, Argentina. 6pp.
- Bommarito S., Peyret N. and Santa Lucia J.Jr. 2000. Thermodynamic parameters for DNA sequences with dangling ends. *Nucleic Acids Research* 28: 1929–1934.
- Bonessi F., Rago A., Marinelli A., March, G., Cazón L., García J., Tarditi L., D'Eramo L., Ferrari S. y Oddino C. 2011. Efecto de la fertilización sobre la intensidad del carbón del maní. 26° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 63-64.

- Bongiovanni R. 2012. Buenas prácticas agrícolas para la producción de maní. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Ediciones INTA. Córdoba. 69pp.
- Borah P. 2011. Primers designing for PCR. *science vision* 11(3): 134-136.
- Bunting A.H. and Elston J. 1980. Ecophysiology of growth and adaptation in the groundnut – an essay on structure, partition and adaptation. En: *Advances in Legume Science*. Summerfield R.J. and Bunting A.H. (eds) Royal Gardens Kew. pp 495-500.
- Busso G., Civitaresi M., Geymonta A. y Roig R. 2003. Situación socioeconómica de la producción de maní y derivados de la región centro-sur de Córdoba. Resumen ejecutivo, Facultad de Ciencias Económicas. Universidad Nacional de Río Cuarto. 22pp.
- Camacho López M.D, Valenzuela Solano C. y Hernández Martínez R. 2014. *Fusarium* spp. asociadas a clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*: 1409-1415.
- Cámara Argentina del Maní. 2013. Outlook del Cluster Manisero Argentino. Córdoba, Argentina. 16pp.
- Carranza J. y Lindquist J. 1962. *Thecaphora frezii*, parasita de *Arachis* sp. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 10: 11-18.
- Casini C. y Bragachi M. 2014. Buenas prácticas de manejo para disminuir el riesgo de aflatoxinas en el cultivo de maní. Informe técnico. En: <http://www.cosechaypostcosecha.org> . Consultado el 15 de mayo de 2015.
- Cazón I., Bisonard M., Conforto C., March G. y Rago A. 2013. Estrategias para el manejo del Carbón del maní. 28° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba. pp 28-29.
- Cazzola N., Gateu M., March G., Marinelli A., García J., Rago A. y Oddino C. 2012. Intensidad y pérdidas ocasionadas por carbón del maní según regiones de producción. 27° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 34-35.
- Chen Y., Conner R.L., Gillard C.L., Boland G.J., Babcock C., Chang K.-F., Hwang S. F. and Balasubramanian P. M. 2007. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. *Plant Disease* 91:1271-1276.
- Chen Y., Yao J., Li Y-F., Wang W-X., Yang X. and Zhang A-F. 2014. Simple and rapid detection of rice false smut pathogen *Ustilaginoidea virens* in rice seeds. *Phytoparasitica* 42:371–375.
- Chiocchetti A., Sciaudone L., Durando F., Garibaldi A., and Migheli Q. 2001. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* on basil. *Plant Disease* 85:607-611.
- Cholaky L. 1984. Maní. Influencia de los factores climáticos sobre el crecimiento-desarrollo, morfología, fotosíntesis, componentes del rendimiento, composición ácido graso del aceite y producción. Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Mimeo. 125pp.
- Conforto C., Cazón I., Fernandez F., Marinelli A., Oddino C., Rago A. 2012. Caracterización molecular de la región D1-D2 de la subunidad ribosomal mayor (DNAr 5´ LSU) de *Thecaphora frezii*, agente causal del carbón del maní. 27° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera Córdoba. pp 19-20.
- Conforto C., Cazón I., Fernandez F., Marinelli A., Oddino C. and Rago A. 2013. Molecular sequence data of *Thecaphora frezii* affecting peanut crops in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 137 (2): 663-666.
- Cruz L. P. 2003. Uso de la diversidad genética de *Beauveria bassiana* para el diseño de alternativas de control de la broca del café. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia. 71pp.

- Dang P.M. and Chen C.Y. 2013. Modified method for combined DNA and RNA isolation from peanut and other oil seeds. *Molecular Biology Reports* 40:1563–1568.
- Dieffenbach C.W., Lowe T.M. and Dveksler G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3: 30-37.
- Dipali M. Thangaswamy R., Suting E.G., Debbarma A. 2013. Detection of seed borne pathogens in wheat: recent trends. *Australian Journal of Crop Science* 7(4):500-507.
- Doyle J.J. y Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13–15.
- Farias A., Baldessari J., Marraro Acuña F. y Mazzini P.H. 2011. Evaluación de cultivares de maní alto-oleico frente al carbón (*Thecaphora frezii*). 26° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 20-22.
- Fernández A. y Krapovickas A. 1994. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 187-220.
- Fernandez E.M. y Giayetto O. (Compiladores) 2006. El Cultivo del maní en Córdoba. Ediciones UNRC. Río Cuarto. Argentina. pp 25-26.
- Fiant S., Alonso C., Fontana T., Spinazzé C., Costero D., Agosto G., Pérez C., Bonvehi L., Fuentes L. y Meriggiola P. 2013. Caracterización de la producción de maní. Campaña 2012/2013. 28° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 24-25.
- Frederick R.D., Snyder C.L., Peterson G.L. and Bonde M.R. 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology* 92:217–227.
- Fundación Maní Argentino. 2010. Manejo de enfermedades fúngicas del maní. Informe final. 48pp.
- Gardes M. and Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Guillemette T., Iacomi-Vasilescu B. and Simoneau P. 2004. Conventional and real-time PCR based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. *Plant Disease* 88:490-496.
- Hadas R., Kritzman G., Gefen T. and Manulis S. 2001. Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. *Plant Pathology* 50:117–123.
- Hammons R. O. 1982. Origin and early history of the peanut. En: Peanut Science and technology. Patte H. E. and Young C. T. (eds.) American Peanuts Research Education Society. Yoakum, TX. pp 1-20.
- Hammons, R. O. 1994. The origin and history of the groundnut. En: The Groundnut Crops (Smartt J. ed.). Chapman & Hall, London. pp 24-42.
- Hossein A., Baeyen S., Maes M., Höfte M. and Heungens K. 2009. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 76: 136–145.
- Hussain S., Tsukiboshi T. and Uematsu T. 2000. Quick detection of *Ascochyta lentis* from lentil seeds using polymerase chain reaction (PCR) based techniques. *Pakistan Journal of Botany* 32:45–56.
- Hyndman D., Cooper A., Pruzinsky S., Coad D. and Mitsushashi M. 1996. Software to determine optimal oligonucleotide sequences based on hybridization simulation data. *BioTechniques* 20:1090-1097.

- Innis M.A. and Gelfand D.H. 1990. Optimization of PCRs. En: PCR Protocols. Innis M.A., Gelfand H.D., Sninsky J.J. and White T.J. (eds.); Academic Press, New York. pp 3-12.
- Kageyama K., Ohyaama A. and Hyakumachi M. 1997. Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. *Plant Disease* 81:1155-1160.
- Kendall J.M. and Rygiewicz P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5(28): 1–11.
- Koressaar T., Joers K. and Remm M. 2009. Automatic identification of species-specific repetitive DNA sequences and their utilization for detecting microbial organisms. *Bioinformatics* 25: 1349–1355.
- Krapovickas A. and Gregory W.C. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 1-186.
- Lasergene. 2008. DNASTAR. Versión 8.0.2. Madison, WI. EE.UU.
- Lavia G.I. 1998. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number X=9. *Cytologia* 63:177–181.
- Le Cam B., Devaux M. and Parisi L. 2001. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA. *Phytopathology* 91:900-904.
- Lee H. K., Tewari J. P. and Turkington T. K. 2001. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. *Plant Disease* 85:220-225.
- Lin K. N., Rouse D. I. and German T.L. 1994. PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Applied Environmental Microbiology* 60: 4324-4331.
- Limonard T. 1966. A modified blotter test for seed health. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. pp 319-321.
- Linneo C. 1753. *Species Plantarum* 2: 741.
- Lorena I., Salazar O., González V., Julian M. and Rubio V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75: 187–194.
- Lowe T., Sharefkin J., Yang S.Q. and Dieffenbach C.W. 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research* 18:1757-1761.
- Ma Z. and Michailides T.J. 2002. A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. from pistachio and various other hosts in California. *Plant Disease* 86:515-520.
- Magalhães de Abreu L. y Pfenning L. 2012. Hongos de suelo saprófitos y patógenos de plantas. En “Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo”. Moreira F., Huising J. y Bignell D. (eds). México: Instituto Nacional de Ecología Impresiones. pp 243-280.
- March G. y Marinelli A. 2005. Enfermedades y sistema productivo. En: Enfermedades de maní en Argentina. March G. y Marinelli A. (eds). Biglia Impresores. Córdoba. pp 1-11.
- Marcinkowska J.Z. 2002. Methods of finding and identification of pathogens in seeds. *Plant Breeding and Seed Science* 46(1): 31-48.
- Marinelli A., March G. y Rago A. 1995. El carbón del maní *Thecaphora frezii* sobre *Arachis hypogaea* L. VII Congreso de Micología y XVII Jornadas Argentinas de Micología. Rosario – Santa Fe. p 134.

- Marinelli A. y March G. 1996. Epidemias del “tizón” del maní (*Arachis hypogaea*) causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Barry *S. minor* Jagger en Argentina. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas 22: 501-510.
- Marinelli A., March G.J. y Oddino C. 2008. Aspectos biológicos y epidemiológicos del carbón del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist. Agriscientia 25(1): 1-5.
- Marinelli A., March G., Oddino C., Garcia J., Rago A. y Zuza M. 2010. El carbón del maní de 1995 a 2010 de enfermedad emergente a enfermedad endémica y epidémica. 25° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 55-56.
- Marraro Acuña F., Mazzini P., Morello L. y Zazzetti M. 2009. Evaluación de cultivares de maní frente al carbón. 24° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 21-22.
- Marraro Acuña F. y Haro R. J. 2011. Carbón del maní (*Thecaphora frezii*): su incidencia en rotaciones de cultivo. 26° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 28-30.
- Marraro Acuña F. 2012. Detección de esporas de *Thecaphora frezii* en semillas de maní asintomáticas. 27° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 50-51.
- Marraro Acuña F., Wiemer A.P. y Cosa M.T. 2012. Carbón del maní bajo la lupa, anatomía de la infección. 27° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 52-54.
- Marraro Acuña F., Cosa M. y Wiemer A. 2013. Carbón del maní: Histología, incidencia y severidad. 28° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 26-27.
- Montpetit M.L., Cassol S., Salas T. and O’Shaughnessy M.V. 1992. OLIGSCAN: a computer program to assist in the design of PCR primers homologous to multiple DNA sequences. Journal of Virology Methods 36:119-128.
- Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262: 56-61.
- Narayanasamy P. 2011. Detection of fungal pathogens in plants. En: Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens. Editorial: Springer Verlag. Londres. 200pp.
- Ochoa Cueva D. 2008. Caracterización molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micológico del C.B.C.M. de la Universidad Técnica Particular de Loja. Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Loja, Ecuador. 51pp.
- Oddino C., Marinelli A., Kearney M. y March G. 2005. Efecto de la labranza sobre la incidencia de la podredumbre parda de la raíz del maní. 13° Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Córdoba, Argentina. p 371.
- Oddino C. 2007. Aspectos biológicos y epidemiológicos de la podredumbre parda de la raíz causada por *Fusarium solani*. Tesis de Magister. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 172pp.
- Paredes J.A., Edwards Molina J.P., Cazón L.I., Bisonard E.M. y Rago A.M. 2014. Alternativas tecnológicas de aplicación de fungicidas para el control de *Thecaphora frezii*. 29° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba. pp 49-50.
- Park H.S., Kim G.Y., Nam B.H., Lee S.J. y Lee J.D. 2002. The determination of the partial 28S ribosomal DNA sequences and rapid detection of *Phellinus linteus* and related species. Mycobiology 30(2): 82–87.

- Pedelini, R. 2014. Maní, guía práctica para su cultivo. Boletín de divulgación técnica N° 2, segunda edición. Ediciones INTA. 20pp.
- Pérez De Castro A. M. 2011. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) Consulta on line en <http://hdl.handle.net/10251/10700>. Mayo de 2015.
- Peyret N., Seneviratne P.A., Allawi H.T. and Santa Lucia J.Jr. 1999. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry* 38: 3468–3477.
- Pinzón A.M. 2006. Introducción al diseño *in silico* de *primers*. Guía del Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia y el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia. 9 p.
- Pryor B. M. and Gilbertson R. L. 2001. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Disease* 85:18-23.
- Rodríguez Gonzáles A.F. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. Asociado a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CDB. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia. 108pp.
- Rozen S. and Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz S. and Misener S. (eds). Humana Press, Totowa, NJ. pp 365–386.
- Rychlik W. and R.E. Rhoades. 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 17: 8543-8551.
- Rychlik W., Spencer W.J. and Rhoads R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research* 18 (21):6409-6412.
- Sanders I., Alt M., Groppe K., Boller T. and Wiemken A. 1995. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 130: 419-427.
- Santa Lucia J.Jr. and Hicks D. 2004. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu. Rev. Biophysics and Biomolecular Structure* 33: 415–440.
- Sayers E.W., Barrett T., Benson D.A., Bolton E., Bryant S.H., Canese K., Chetvernin V., Church D.M., Dicuccio M., Federhen S. *et al.* 2012. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 40: D13–D25.
- Shahnazi S., Meon S., Vadamalai G., Ahmad K. and Nejat N. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology* 78: 160-169.
- Smith D.R. and Stanosz G.R. 2006. A species-specific PCR assay for detection of *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in dead red and jack pines with collar rot symptoms. *Plant Disease* 90:307-313.
- Soave J., Bianco C., Burgoa R., Montaña R., Rago A., Cazón I., Paredes J. A., Buteler M., Faustini P., Soave S., Moresi A., Torres D. y Oddino C. 2014. Primera detección

- de carbón del maní (*Thecaphora frezii*) en Bolivia. 3° Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán, Argentina. 211p.
- Spinazzé C. Y Marraro Acuña F. 2010. Estudio del efecto de la ubicación de esporas sobre la intensidad de carbón del maní. 25° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 6-7.
- Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad 2(2): 70-78.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Thompson J.D. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.
- Tsedaley B. 2015. Review on seed health tests and detection methods of seedborne diseases. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5: 176-184.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth BC., Remm M. and Rozen SG. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.
- Van de Graaf P., Lees A.K., Cullen D.W. and Duncan J.M. 2003. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 109: 589–597.
- Vánky K. and Lutz M. 2007. Revision of some *Thecaphora* species (*Ustilaginomycotina*) on *Caryophyllaceae*. *Mycological Research* 111: 1207–1219.
- Villalobos A., Escobar M. y Santerre A. 2005. Extracción de DNA y amplificación de secuencias de ITS en *psilocybe* (agaricales, fungi). *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA* 548-553
- Walcott R.R. 2003. Detection of seedborne pathogens. *HortTechnology* 13:40–47.
- Ward E. and Bateman G. 1999. Comparison of Gaeumannomyces- and Phialophora-like fungal pathogens from maize and other plants using DNA methods. *The New Phytologist* 141: 323–331.
- Warham E.J., Butler L.D. and Sutton B.C. 1990. Seed testing of maize and wheat: Guía de Laboratorio. CYMMYT, CAB International, UK. 84pp.
- Weiland J.J. and Sundsbak J.L. 2000. Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant Disease* 84:475-482.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J. (eds). Academic Press Inc., New York. pp 315-322.
- Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Qian J. and Wallace R.B. 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology* 10 (3): 233-238.
- Xie G., Tan S. and Yu L. 2012. Morphological and molecular identification of pathogenic fungal of post-harvest tomato fruit during storage. *African Journal of Microbiology Research* 6(22): 4805-4809.

- Yang Z., Matheny P., Ge Z., Slot J. and Hibbet D. 2005. New Asian species of the genus *Anamika* (euagarics, hebelomatoidclade) based on morphology and ribosomal DNA sequences. *Mycology* 109 (11): 1259-1267.
- Zhang A.W., Hartman G.L., Curio-Penny B., Pedersen W.L. and Becker K.B. 1999. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology* 89: 796– 804.
- Zhao J., Wang X.J., Chen C.Q., Huang L.L. and Kang Z.S. 2007. A PCR-based assay for detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat. *Plant Disease* 91:1669-1674.
- Zuza M., Oddino C., Marinelli A. y March G. 2005. La semilla de maní como fuente de inóculo primario de la “podredumbre parda de la raíz” y el “tizón” del maní”. 20° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera. Córdoba. pp 14-15.