



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Trabajo Final de Graduación
Modalidad “Pasantía”

Título: “Identificación de fitopatógenos utilizando técnicas moleculares”

Autor: Acosta, María Elizabeth

Asesor: Dra. Galdeano, Ernestina

Lugar de realización del trabajo: Laboratorio de Fisiología Vegetal,
Facultad de Ciencias Agrarias- UNNE. Corrientes, República
Argentina.

Año: 2021

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
LUGAR DE TRABAJO.....	6
FUENTE DE DATOS EMPLEADOS	6
Fuente primaria.....	6
Fuente secundaria:	6
DESCRIPCIÓN DE TAREAS.....	6
DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS CULTIVABLES.....	6
Podredumbre de la espiga de maíz (<i>Fusarium spp.</i>).....	6
Material biológico.....	7
Aislamiento de <i>Fusarium</i>	7
Caracterización cultural de <i>Fusarium</i>	8
Caracterización morfológica de especies de <i>Fusarium</i>	9
Caracterización molecular de especies de <i>Fusarium</i>	11
Purificación de ADN	11
Técnica de purificación utilizando CTAB (Doyle & Doyle,1990)	11
Técnica de purificación utilizando SDS (Cenis et.al., 1992)	12
Análisis de PCR	13
Electroforesis.....	13
BACTERIOSIS EN MAÍZ Y TOMATE	14
Aislamiento de bacterias.....	14
Preparación de suspensiones bacterianas	15
Reacción de hipersensibilidad en Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	15
Descripción de la técnica.....	15
Test de patogenicidad en maíz (<i>Zea mays</i>).....	Error! Bookmark not defined.
Descripción de la técnica.....	Error! Bookmark not defined.
Conservación de bacterias	15
Detección e identificación de mollicutes patógenos.....	16
Material biológico. Recolección de muestras.	16
Insectos	16
Extracción de ácidos nucleicos	18
Extracción de ARN	Error! Bookmark not defined.

Extracción de ADN a partir de láminas foliares de maíz (<i>Zea mays</i>)	18
Extracción de ADN a partir de insectos (<i>Dalbulus maidis</i>)	18
Detección de mollicutes	18
ACTIVIDADES DE TRABAJO COMÚN DE LABORATORIO	19
SOLUCIONES BUFFER	19
ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL	19
INVERNÁCULO	20
TRABAJO EN CÁMARA DE FLUJO LAMINAR	20
TRABAJO EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN	20
ELECTROFORESIS	20
PREPARACIÓN DE MEDIOS	24
ÁGAR AGUA (BACTERIOLÓGICO)	24
ÁGAR 1%	24
Medio de cultivo YDC	Error! Bookmark not defined.
Medio de cultivo KING B	Error! Bookmark not defined.
Medio de cultivo Hugh and Leifson	Error! Bookmark not defined.
Medio AN	Error! Bookmark not defined.
PREPARACIÓN DE BUFFER	24
CTAB	24
TE	24
TBE	24
CLOROFORMO 24:1	25
ANEXO	24
PROTOCOLOS	24
AISLAMIENTO DE HONGOS	Error! Bookmark not defined.
Desinfección	Error! Bookmark not defined.
Productos antagónicos	Error! Bookmark not defined.
Siembras	Error! Bookmark not defined.
Incubación	Error! Bookmark not defined.
Observación	Error! Bookmark not defined.
Observación en cultivo sobre portaobjeto	Error! Bookmark not defined.
PURIFICACIÓN DE HONGOS	Error! Bookmark not defined.
Extracción de ADN genómico fúngico	Error! Bookmark not defined.
Técnica de purificación utilizando CTAB (Doyle & Doyle,1990)	Error! Bookmark not defined.
Técnica de purificación utilizando SDS (Cenis et.al., 1992)	Error! Bookmark not defined.
ELECTROFORESIS	Error! Bookmark not defined.

Extracción de ARN	Error! Bookmark not defined.
Extracción de ADN a partir de láminas foliares de maíz (Zea mays)	Error! Bookmark not defined.
Extracción de ADN a partir de insectos (Dalbulus maidis)	Error! Bookmark not defined.
COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	Error! Bookmark not defined.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Error! Bookmark not defined.

INTRODUCCIÓN

La identificación de fitopatógenos mediante técnicas moleculares constituye una herramienta de vital importancia cuando se las utiliza de manera correcta, siendo, en algunos casos, determinantes al momento de dar un diagnóstico. Es por esto que debe seleccionarse el procedimiento que más se adecue al caso en cuestión, y para lo cual es relevante el conocimiento de las prácticas de laboratorio. En el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste trabajan a diario una gran cantidad de personas, por lo cual resulta imprescindible que todos tengan conocimiento de cómo proceder en cada área del mismo.

OBJETIVO GENERAL

Realizar prácticas en un laboratorio de diagnóstico molecular de patógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprender y participar en el proceso de elección de las técnicas adecuadas para cada situación de diagnóstico.
- Comprender los fundamentos y practicar técnicas de laboratorio que conducen a la identificación molecular de diferentes tipos de patógenos.
- Participar de las actividades compartidas por el grupo de trabajo del laboratorio.

LUGAR DE TRABAJO

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias UNNE.

FUENTE DE DATOS EMPLEADOS

Fuente primaria: Datos obtenidos a partir de los análisis en el laboratorio.

Fuente secundaria: Revisión bibliográfica (Biblioteca BAUNNE, IBONE, Cátedra de Fitopatología, Internet).

DESCRIPCIÓN DE TAREAS

DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS CULTIVABLES

Los métodos clásicos de identificación de hongos fitopatógenos incluyen el aislamiento, cultivo *in vitro*, técnicas bioquímicas y de microscopía. La técnica más usual en laboratorios de diagnóstico es la observación de estructuras fúngicas típicas para cada género o especie, principalmente esporas. Esta técnica presenta algunas desventajas. Entre ellas, las estructuras reproductivas no siempre se forman sobre el órgano vegetal enfermo y a veces es necesario el uso de medios de cultivo selectivos o específicos que promuevan la esporulación. Por otra parte, el reconocimiento de las mismas requiere amplio conocimiento y experiencia en taxonomía de grupos taxonómicos de hongos muy diferentes. Por estas razones, en muchos laboratorios de diagnóstico se trabaja de manera complementaria con técnicas moleculares que permiten la identificación más rápida y precisa de los hongos que están causando la enfermedad. Un caso de diagnóstico que requirió la aplicación de técnicas moleculares fue la identificación de especies de *Fusarium* causantes de podredumbre de la espiga del maíz.

Podredumbre de la espiga de maíz (*Fusarium spp.*)

Las mazorcas de maíz infectadas con *Fusarium spp.* presentan granos con una coloración blanca a rosada sobre la superficie, posteriormente el hongo se desarrolla y forma un micelio de color blanco o rosado, que puede ser fácilmente observado sobre o entre los granos (De Agudelo y Sarria, 2007). Sin embargo, esta sintomatología es común a varias especies de este hongo, por lo cual no puede ser utilizada para identificación precisa del patógeno causante de la enfermedad. Este complejo de hongos está formado por las especies *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* que pueden ser distinguidas por el origen de los microconidios (esporas asexuales). En el caso de *F. proliferatum* se caracteriza por producir microconidios en polifiálides, mientras que *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*) los presenta en monofiálides (Leslie and Summerell, 2006). Sin embargo, la observación es muy complicada y requiere el conocimiento de taxónomos especialistas para confirmar los resultados. Por ello se recurrió a técnicas moleculares de extracción de ADN y posterior detección por PCR. Para el análisis utilizamos primers específicos diseñados por Jurado y col. (2006) y seguimos los protocolos según Sampietro y col. (2010).

Material biológico

Se trabajó con mazorcas de maíz con síntomas, las cuales a simple vista presentaron coloración rosa-violácea (Figura 1).



Figura 1. Material biológico con sintomatología característica de *Fusarium*.

Aislamiento de *Fusarium*

Se desgranaron las mazorcas para lograr el aislamiento de los hongos presentes (Figura 2). Los granos extraídos fueron desinfectados. El procedimiento consistió en preparar una solución con una parte de lavandina y 3 partes de agua. Luego se introdujo la muestra 5 o 10 minutos. A continuación, se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril. Se colaron los granos y se sembraron bien separados en cajas de Petri con el medio APG (Ágar Papa Glucosa) al 2%. Luego de la siembra, fueron incubados a 28°C durante 7 días. Se observaron los signos y, con un ansa esterilizada, se tomó una porción de micelio de cada grano y se transfirió a una caja de Petri con medio APG.



Figura 2. Granos de maíz sintomáticos. Se observa la coloración rosado-violácea y micelio blanco.

Caracterización cultural de *Fusarium*

Se procedió a la identificación de los hongos presentes, en base a la observación de caracteres macro- microscópicos y el uso de claves correspondientes (Leslie y Summerell, 2006). Se pudo distinguir 2 tipos de colonias: unas de color blanquecino con gran cantidad de conidios y las otras más púrpura con estructuras fúngicas poco visibles.

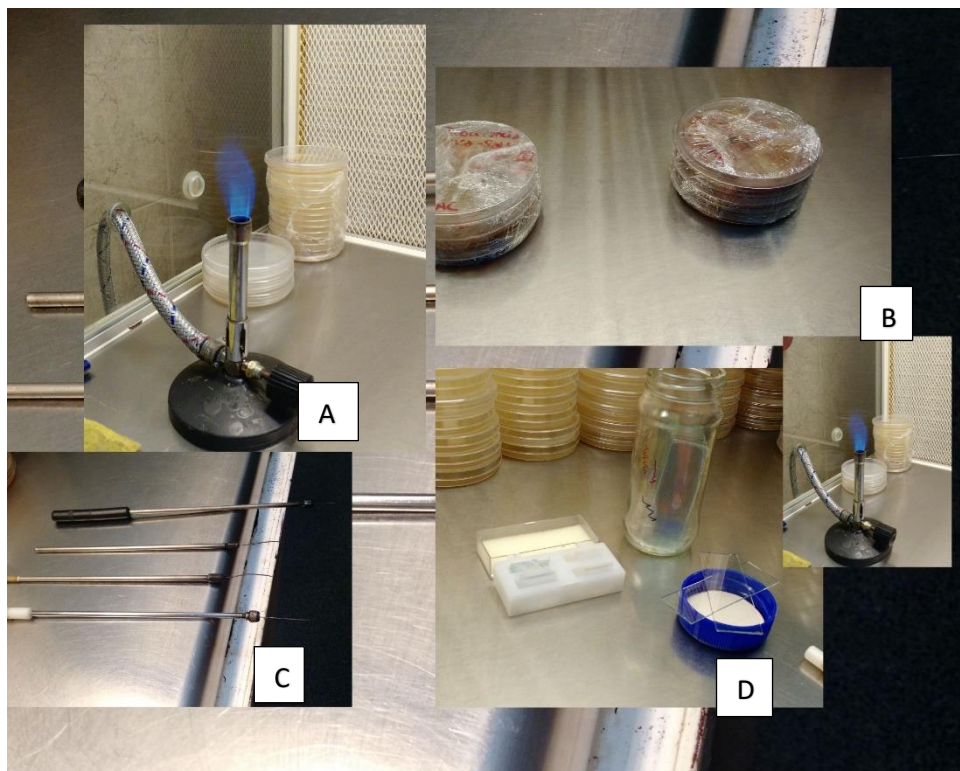


Figura 4. A. Mechero para esterilizar materiales. B. Cajas de Petri con aislamientos fúngicos. C. Aguja histológica esterilizada. D. Portaobjeto para observación microscópica de aislamientos.

Se recurrió a la técnica de cultivo a partir de una única espora (monospórico) para asegurar la homogeneidad genética de un cultivo de hongos (Figura 4). Se probaron 2 técnicas:

- Sembrando en superficie una suspensión de esporas y luego observando bajo lupa o microscopio.
- Sembrando diluciones de forma que crezcan colonias aisladas.

Procedimiento

Se esterilizaron todos los materiales en mechero. Se preparó la suspensión en agua estéril tomando una pequeña cantidad de micelio con el ansa en aro y se fue sembrando en la placa con ágar agua (AA), ya preparada previamente. Se dejó reposar la siembra durante 20 horas, luego se observó la placa en microscopio hasta localizar el conidio aislado para proceder luego a cortarlo con el objetivo monospórico. Para realizar esta técnica se quitan los demás objetivos del microscopio y se trabaja solamente con un aumento de 10X. Es importante que, al localizar la espora, se barra en los 4 sentidos para corroborar que esté aislado.

Caracterización morfológica de especies de *Fusarium*

Los aislamientos fueron clasificados según la coloración de las colonias obtenidas y posteriormente transferidas a tubos con medio APG para promover la esporulación de los mismos. Las colonias presentaron, respectivamente, color blanquecino con gran cantidad de conidios y las otras púrpuras con estructuras fúngicas poco visibles (Figura 5). La coloración de las colonias en el medio de cultivo utilizado coincidió con el signo que se observa generalmente en las mazorcas infectadas con *Fusarium spp.*

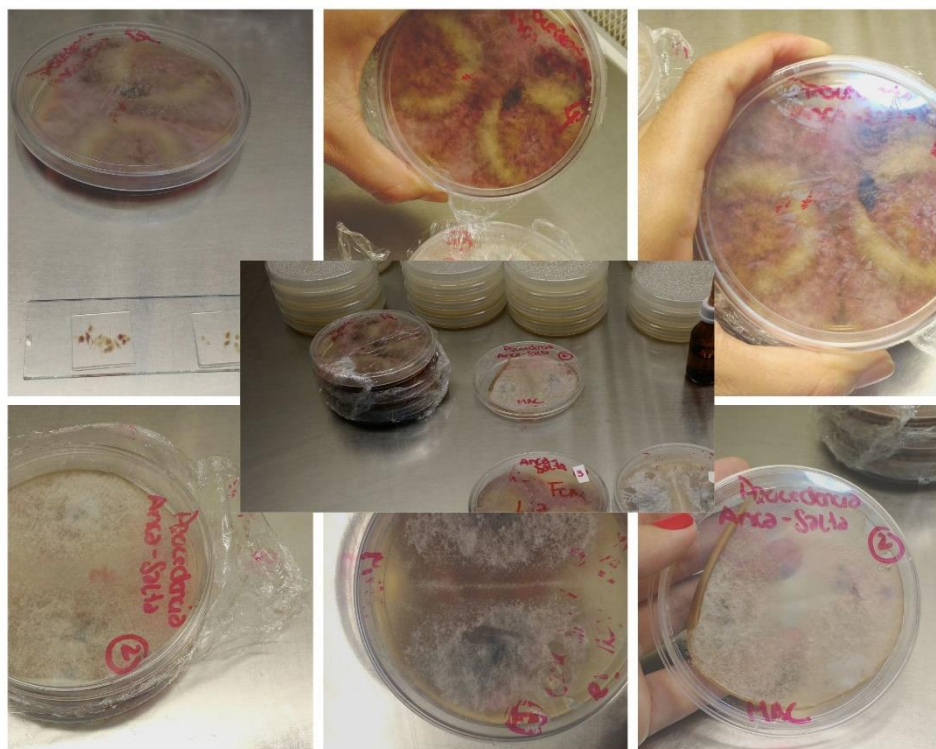


Figura 5. Cajas de Petri con medio APG, el cual promueve la esporulación. Se observan los colores típicos de la infección por *Fusarium*.

Como el género *Fusarium* se caracteriza por la formación de macro y microconidios, se realizaron preparados microscópicos para su observación. En las muestras de micelio blanco se observaron microconidios mientras que en las muestras de micelio violeta se observaron escasos macroconidios (Figura 6).

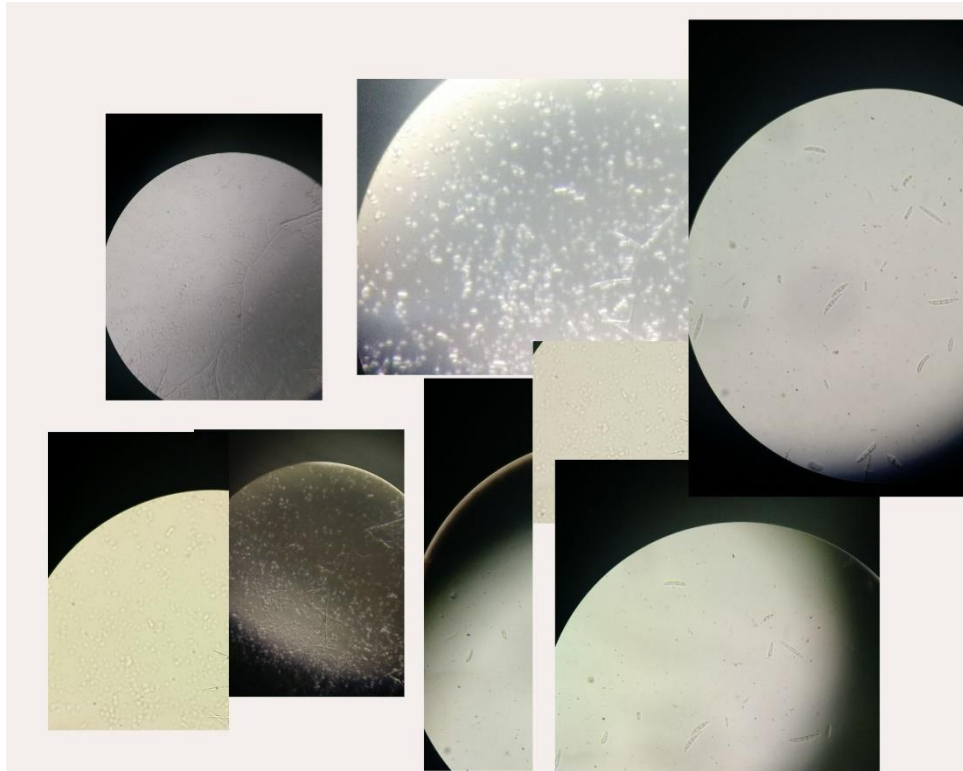


Figura 6. Observación bajo microscopio. Se pueden apreciar los conidios.

Los preparados para la observación microscópica se realizaron tomando la muestra con cinta adhesiva, a fin de levantar menor cantidad de conidios, los cuales obstruyen la visibilidad y dificultan la determinación del lugar donde se desprenden (Figura 7). A partir de la observación microscópica de los preparados se realizaron dibujos a mano de las estructuras observadas, a fin de poder comparar con la bibliografía y situarnos en la especie de *Fusarium* correspondiente. La morfología del hongo presente en las muestras analizadas se correspondió con las características de especies que forman parte del complejo *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (sección Liseola) que podrían ser distinguidas por el origen de los microconidios.

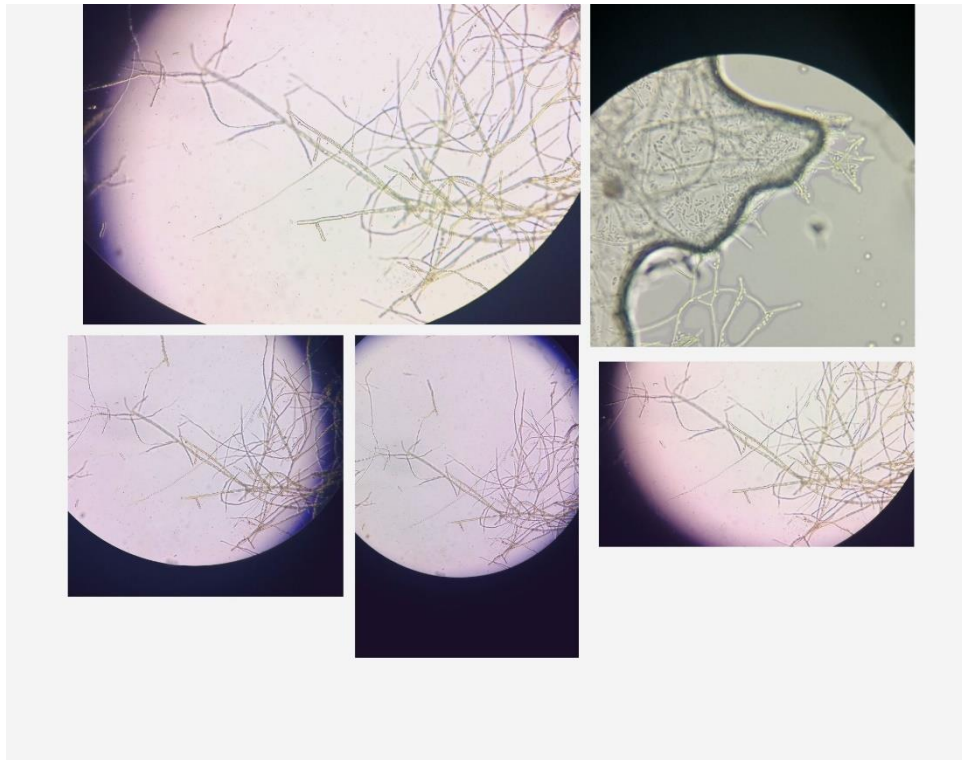


Figura 7. Observación de estructuras fúngicas bajo microscopio.

Caracterización molecular de especies de *Fusarium*

Se seleccionaron los aislamientos previamente identificados como especies de *Fusarium* correspondientes a la sección Liseola. La caracterización incluyó la purificación de ADN genómico fúngico y el análisis por PCR con primers específicos.

Purificación de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de discos de micelio cortados del margen de colonias crecidas en medio APG. Los mismos fueron molidos en microtubos y se probaron 2 técnicas de purificación utilizando como detergentes CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromid) (Doyle & Doyle, 1990) y SDS (dodecilsulfato sódico) (Cenis et.al., 1992) (Figura 8).

Con ambas técnicas de extracción se logró obtener suficiente cantidad de ADN genómico, sin embargo, los productos de la purificación realizada con CTAB no resultaron amplificables en las reacciones de PCR, probablemente debido a la presencia de algún tipo de inhibidor, por ello se eligió para el análisis de todas las muestras, seguir el protocolo que utiliza como detergente SDS (Cenis et.al., 1992), que produjo ADN en buena cantidad y de calidad.

Técnica de purificación utilizando CTAB (Doyle & Doyle, 1990)

Se tomó una muestra de micelio de las cajas de Petri con medio APG y se colocó en microtubos de 1,5 ml. Se añadió 500 µl de buffer CTAB 2% precalentado a 65°C. Se incubó por 60 minutos a 65°C en un baño termostático, mezclando con vórtex cada 15 minutos. Se adicionó 500 µl de cloroformo, agitando los tubos en vórtex, trabajando bajo campana de extracción. Se centrifugó a 10 K por 10 minutos y luego se separó la fase acuosa a otro tubo (aproximadamente 400 µl de cada muestra). Se añadió 350 µl de isopropanol para precipitar el ADN, invirtiendo los tubos 2-3 veces. Se llevó 20 minutos a freezer, luego se centrifugó a 13 K por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 µl de etanol 70%. Se centrifugó a 13 K por 10 minutos, y a continuación se eliminó

generosamente el sobrenadante, dejando secar el pellet 5-10 minutos. Se resuspendió el pellet en 100 µl de agua ultra pura. Se almacenó en freezer para su posterior utilización en PCR.

Técnica de purificación utilizando SDS (Cenis et.al., 1992)

Se rotularon tubos de 1.5 ml con etiquetas y se reforzaron con cinta adhesiva (para que no se desprenda en la centrifuga). Luego se flamearon las espátulas, se dejaron enfriar y se usaron para levantar sólo el micelio (de toda la caja). Cuanto más micelio, mejor. Se colocó en tubo. Se tapó cada tubo y se ubicó en distinto lugar en la gradilla. Se agregó 300 µl de buffer tris EDTA y se llevó a centrifuga de forma equilibrada (igual cantidad de tubos de cada lado), 5 minutos a 13 K. Se descartó el sobrenadante y se agregó 150 µl de buffer lisis (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Se molió con pilón, se añadió 150 µl más de buffer y se mezcló en vórtex. Se agregó 150 µl de acetato de sodio y se llevó a freezer durante 10 minutos, luego se centrifugó 10 minutos a 13 K. Se retiró el sobrenadante, se colocó en tubo previamente rotulado (con tips limpios), y se añadió isopropanol para precipitar el ADN, mezclando con movimiento de vaivén a mano. Se centrifugó 10 minutos a 14 K. Se descartó el sobrenadante, dejando sólo el pellet. Se añadió 100 µl de etanol al 70%, se centrifugó y descartó el sobrenadante. Se llevó a estufa a 37°C para secar el resto del alcohol y luego se añadió agua ultrapura y autoclavada.

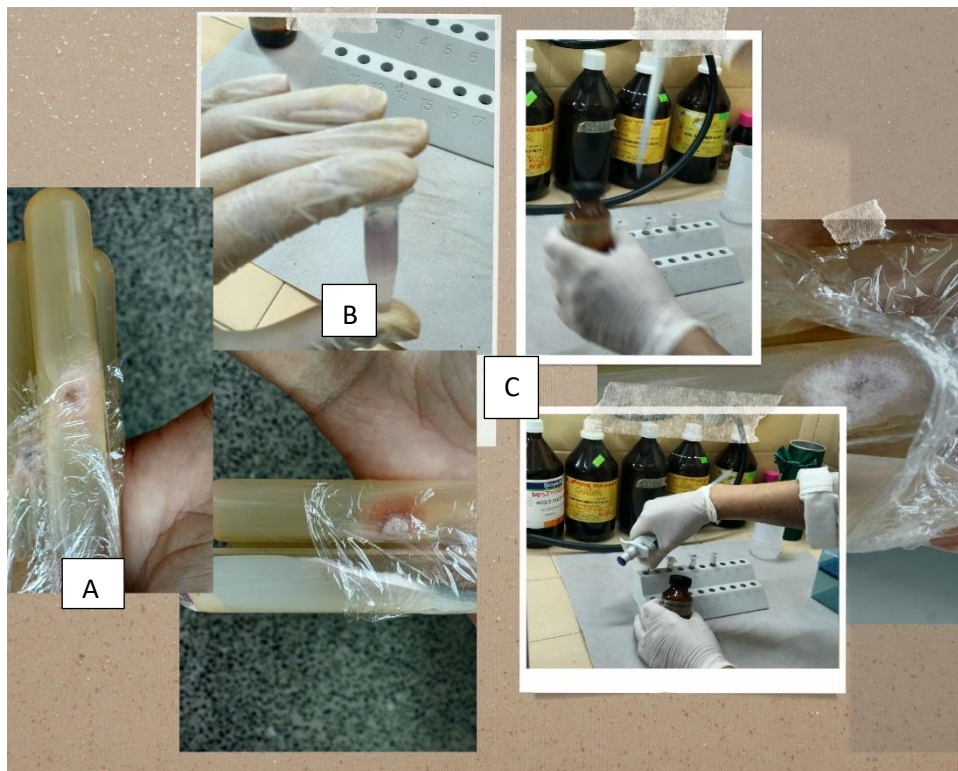


Figura 8. Tubos de ensayo con medio APG, se observa micelio con coloración propia de Fusarium. B. Extracción de micelio en buffer lisis. C. Preparados en gradilla, extracción con pipeta.

Se realizó la medición de la concentración de ADN en las muestras en espectrofotómetro de espectro total (NanoDrop) (Figura 9), con el objetivo de seleccionar la más adecuada para la técnica de PCR.

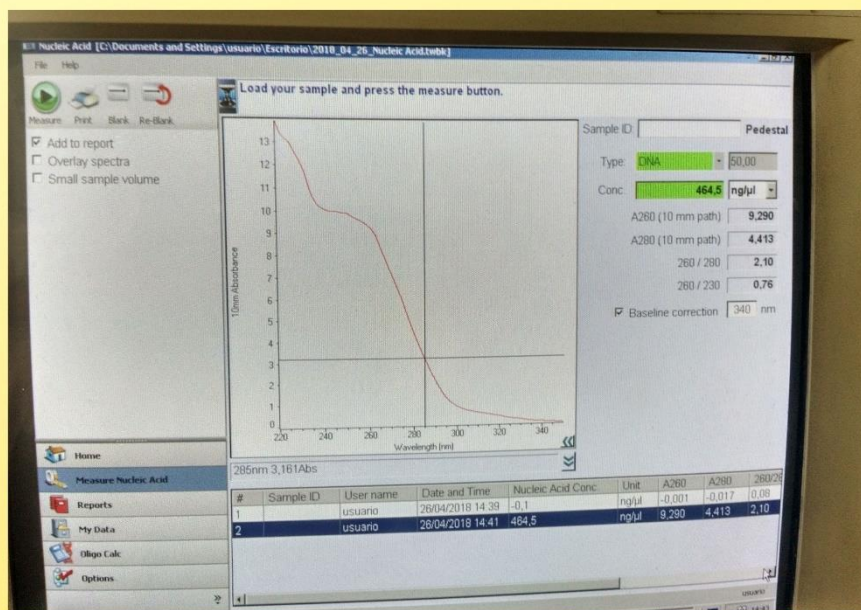


Figura 9. Resultado de una de las mediciones de la concentración de ADN en espectrofotómetro de espectro total.

Análisis de PCR

La detección se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos Fps-F/Vert2, que amplifican un fragmento de aproximadamente 700 pb específico para *Fusarium verticilloides*, y Fp3-F/Fp4-R que amplifican un fragmento de aproximadamente 230 pb, específico para *Fusarium proliferatum* (Jurado et.al.,2006). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 μ L conteniendo 200 ng de ADN blanco en 3 μ L, 1,25 μ L de cada primer (20 μ M), 0,2 μ L de polimerasa Taq ADN (5 U μ L⁻¹), 2,5 μ L de PCR buffer 10X; 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM) y 2,5 μ L de dNTPs (200 mM). Se mezcló en vórtex y centrifugó cada tubo antes de ser llevado al termociclador. La amplificación se realizó en un termociclador Axygen con gradiente de temperatura. Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 85 segundos a 94°C, 25 ciclos de 35 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 67°C (hibridación), 30 segundos a 72°C (extensión), y 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

Electroforesis

Los fragmentos resultantes de la PCR fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1%, buffer TBE (Tris Bórico EDTA 0,5 X), teñidos con bromuro de etidio y observados en transiluminador con luz UV (Figura 10).

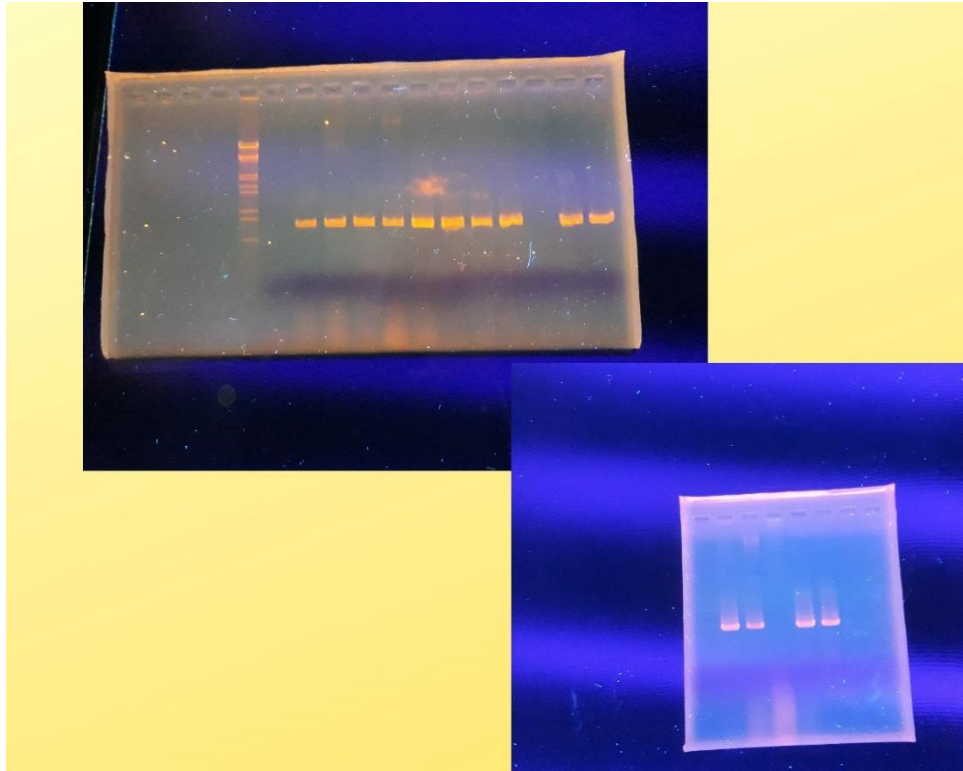


Figura 10. Observación de fragmentos resultantes de la PCR bajo transiluminador con luz UV.

BACTERIOSIS EN TOMATE

Cuando se realiza el aislamiento de bacterias a partir de plantas enfermas es muy común que crezcan diferentes bacterias que hayan sobrevivido a la desinfección de los tejidos. Por ello, antes de identificar el género y/o especie de un aislamiento se pueden realizar algunas pruebas que demuestren su patogenicidad. Entre ellas, la reacción de hipersensibilidad y la prueba de patogenicidad. Una vez que nos aseguramos de tener aislada a la bacteria responsable de la enfermedad en estudio podemos utilizar algunas técnicas simples de laboratorio para identificarla por lo menos a nivel de género. Sin embargo, para lograr reconocer las especies de bacterias sería necesario realizar una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas que requieren la preparación de diferentes medios de cultivos y reactivos (Schaad et al., 2001). Durante el desarrollo de esta pasantía se realizó la detección por PCR de bacterias patógenas de tomate.

Aislamiento de bacterias

En primer lugar, se desinfectó el material (láminas foliares), para lo cual se utilizó tijeras (desinfectadas), alcohol 70% y lavandina 5%. El procedimiento consistió en cortar una porción de la lesión, preferentemente del borde. Se pasó por alcohol y luego se dejó en lavandina durante 10 minutos. Posteriormente, se enjuagó con agua estéril y se dejó la muestra en el mismo frasco con el agua del último enjuague (Figura 11). Se tomó la muestra, se colocó en mortero, se agregó agua y maceró con pilón para que salga la bacteria. Se tomó con pipeta un volumen de 100 µl y se depositó en caja de Petri con ágar nutritivo. Se distribuyó con rastrillo de vidrio hasta que se absorbió sobre el medio. Se tapó y cubrió con papel film. La placa se colocó invertida en estufa a 27°C.



Figura 11. Preparación de materiales para aislamiento de bacterias.

Preparación de suspensiones bacterianas

A partir de las bacterias aisladas se realizaron suspensiones bacterianas para utilizar en técnicas posteriores. El procedimiento consistió en tomar 1000 μ l de agua estéril y colocarla en tubo de 1,5 ml. Luego, se tomó una muestra de la caja sembrada, se depositó en el tubo y se mezcló. A continuación, se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm, utilizando como blanco agua estéril. Se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a la concentración bacteriana deseada (10^5 - 10^6 UFC/ml) partiendo de una densidad óptica de 0,3 A.

Conservación de bacterias

Los aislamientos de bacterias se conservaron en ultrafreezer a -70°C . El procedimiento consistió en tomar la bacteria de la caja y colocarla en un tubo rotulado, cerrando y mezclando suavemente.

Para el stock de bacterias se utilizó:

- Tubo de 1,5 ml
- 700 μ l medio TSA líquido
- 300 μ l glicerol

Reacción de hipersensibilidad en Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Esta reacción se debe a una respuesta rápida de defensa de la planta frente a patógenos de los que no es hospedante. Se utiliza mucho en el diagnóstico rápido porque permite seleccionar las posibles bacterias fitopatógenas entre las que han crecido en un aislamiento. Las bacterias que no son patógenas no producen reacción de hipersensibilidad. Por lo tanto, si un aislamiento es capaz de provocar reacción de hipersensibilidad será un indicio de que se trata de una bacteria fitopatógena.

Descripción de la técnica

A partir de cultivos bacterianos se realizó la dilución antes explicada en la preparación de suspensiones bacterianas. Se utilizó una jeringa sin aguja para infiltrar una hoja de tabaco, llegando al mesófilo. Esto también se realizó con agua como control negativo. En los días sucesivos se realizó la observación de las hojas a fin de corroborar la reacción de hipersensibilidad, la cual se observa 24 o 48 horas después de la inoculación, apareciendo como necrosis y desecamiento brusco que se observa exclusivamente en la zona infiltrada.

Purificación de ADN

La purificación de ADN bacteriano se realizó utilizando una resina quelante de intercambio iónico (Chelex 100[®], Bio Rad). De cada aislamiento se realizó una suspensión de colonias bacterianas en 200 μ l de agua destilada. La muestra se centrifugó a 14K por 3 minutos y se desechó el sobrenadante. Al pellet recuperado se agregó 200 μ l de NaCl 1M y se centrifugó a 14 K por 2

minutos. Se descartó el sobrenadante, se volvió a agregar 200 µl de agua estéril y centrifugar 2 minutos a la misma velocidad. Por último, el pellet formado fue resuspendido en 150 µl de una solución acuosa al 6% de resina. Esta mezcla de células y resina se llevó al vórtex y luego se incubó en un baño seco a 58°C durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se volvió a mezclar en vórtex y se incubó a 99°C durante 8 minutos (Alipi y Aguilar, 1998).

Análisis de PCR

La identificación de las bacterias aisladas se realizó a través de PCR con primers específicos. La mezcla de reacción y programación de condiciones de ciclado se realizó de manera similar a la descrita para la identificación de hongos. Entre ellas, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, que fue aislada de folíolos, canchros del tallo y manchas de frutos de tomate, se identificó utilizando los primers Cmm5 y Cmm6 (Dreier et al., 1995). Otros aislamientos, obtenidos de tallos de tomate con síntomas de necrosis medular, fueron identificados como *Pseudomonas mediterránea* utilizando dos pares de primers (PC1/1-PC1/2 y PC5/1-PC5/2, Catara et al., 2000; 2002).

Detección e identificación de mollicutes patógenos en plantas de maíz

Recolección de muestras

Como parte de las actividades del servicio de diagnóstico colaboré en muestreos de cultivos de maíz para la evaluación de incidencia del achaparramiento del maíz y recolección de muestras para analizar la presencia del mollicute *Spiroplasma kunkelii*.

Se realizaron dos muestreos en lotes de maíz para producción, en etapa vegetativa (V7) y reproductiva (R1 y R3) que es el momento en que los síntomas son más notorios (estriado clorótico, enrojecimiento, achaparramiento) (Figura 12). Se midió la incidencia de plantas sintomáticas en muestreos con un diseño estratificado al azar, dividiendo el lote en 5 estratos y en cada uno de ellos se contaron 200 plantas de un surco partiendo de un punto al azar. Se registró el número de plantas con síntomas y se tomaron muestras de láminas foliares para analizar la presencia de los diferentes patógenos. Las muestras fueron conservadas en bolsas plásticas, rotuladas por lote, y refrigeradas para su traslado al laboratorio, donde posteriormente se realizaron los análisis correspondientes.

Insectos

En los mismos lotes seleccionados para la evaluación de enfermedades se analizó la presencia de mollicutes en insectos vectores (*Dalbulus maidis*) capturados en el campo a través de red de arrastre, con 50 golpes de red con 3 repeticiones por cada sitio, y revisando el cogollo planta por planta, usando en este último caso un aspirador entomológico. Las muestras fueron conservadas en alcohol 70 % para su traslado al laboratorio, donde se almacenó en freezer a -20 °C para posterior identificación y recuento bajo microscopio estereoscópico (Figura 13).



Figura 12. Láminas foliares de maíz sintomáticas. Se puede apreciar el enrojecimiento en los márgenes.



Figura 13. Identificación de *Dalbulus maidis* bajo microscopio estereoscópico.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN se realizó por la técnica del CTAB siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1990) para plantas, y el de Bosco et. al. (2002) para los insectos vectores.

Extracción de ADN a partir de láminas foliares de maíz (*Zea mays*)

Se molió la muestra en mortero, con pilón, añadiendo nitrógeno líquido. Se tomó con espátula la molienda y se colocó en tubo de 1,5 ml. Se añadió 500 µl de buffer CTAB y se mezcló en vórtex. A partir de este punto se siguió el mismo protocolo que el utilizado para la purificación de ADN de hongos (Doyle & Doyle, 1990).

Extracción de ADN a partir de insectos (*Dalbulus maidis*)

Preparación del buffer: 1000 µl CTAB + 10 µl de B-mercapto.

Procedimiento: en campana.

Se tomó 100 µl de buffer y se añadió a la muestra (2 a 3 insectos), se molió, se agregó 400 µl más y se mezcló en vórtex. A partir de este punto se siguió el mismo protocolo que el utilizado para la purificación de ADN de hongos (Doyle & Doyle, 1990).

Detección de mollicutes

La detección de mollicutes se realizó por PCR a partir del ADN total obtenido de las muestras. Para CSS se utilizaron los iniciadores específicos CSSF2/CSSR6 (Barros et al., 2001) y para el fitoplasma MBS, MBSF1/MBSR1 (Harrison et al., 1996).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µL conteniendo 2,5 µL de cada primer (20 µM), 0,2 µL de polimerasa Taq ADN (5 U µL⁻¹), 2,5 µL de PCR buffer 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM) y 2,5 µL de dNTPs (200 mM).

Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 60°C, 3 minutos a 72°C; y 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Los fragmentos resultantes se observaron por electroforesis en agarosa 1%, buffer TBE (Tris Bórico EDTA 0,5 X), teñidos con bromuro de etidio y observados en transiluminador con luz UV.

Extracción de ARN

Se realizó como prueba la extracción de ARN de láminas foliares para la posterior detección de virus, utilizando como reactivo de aislamiento RNAzol®RT.

Todo el material utilizado fue previamente autoclavado.

- Reactivo principal: RNAzol.
- Etanol
- Isopropanol
- Agua libre de RNAsa
- Tubos de 2 ml.
- Guantes de examinación (sin talco, porque afecta el RNA). Si se ensucian durante el procedimiento se deben cambiar ya que su función es proteger la muestra.

Procedimiento: en campana.

Se tomó aproximadamente 100 mg de tejido vegetal (hojas) y se colocó en mortero, se añadió 500 µl de RNazol, se molió, se agregó 500 µl más. El RNazol lisa y protege el RNA de la molienda. Luego se añadió 400 µl de agua libre de RNAsas (cada 1 ml de RNazol, 400 µl de agua libre de RNAsa). Se mezcló fuerte en vórtex, por lo menos 15 a 20 segundos, y luego se dejó 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 K durante 15 a 20 minutos, a 20°C. Luego se retiró el sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó a 12 K durante 20 minutos, a 20°C. Se retiró el sobrenadante con pipeta y se descartó, verificando la presencia de pellet. Se añadió 200 µl de etanol 75% y se centrifugó 2 minutos a 4-8 K, realizando este paso 2 veces. Se extrajo el etanol con pipeta y se resuspendió en 20 µl de agua ultra pura y libre de RNAsas.

Se observaron altas concentraciones de ARN en las primeras muestras, las cuales también se presentaron limpias. Sin embargo, las siguientes muestras, si bien presentaron elevadas concentraciones, mostraron valores de impurezas altos.

Las extracciones con el reactivo de aislamiento RNazol se repitieron en varias muestras a fin de descartar que las impurezas detectadas en las mediciones puedan deberse a errores en el procedimiento. Se decidió realizar las extracciones empleando Nitrógeno líquido a -96°C dentro del mismo procedimiento, pero los resultados no mejoraron respecto a los anteriores.

ACTIVIDADES DE TRABAJO COMÚN DE LABORATORIO

SOLUCIONES BUFFER

El empleo de soluciones buffer es común a todo el equipo de trabajo del laboratorio. La preparación de las mismas se realiza cuando se agota el stock existente, y puede ser realizada por cualquiera de los miembros siguiendo las indicaciones del protocolo correspondiente. Dichos protocolos se encuentran disponibles de manera física y se puede recurrir a ellos a modo de consulta. Los insumos para las soluciones buffers se guardan en distintos armarios, de manera organizada.

Las soluciones buffer preparadas durante mi pasantía fueron:

- CTAB
- SDS
- Tris EDTA
- TBE

ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL

Todos los insumos que se utilizan en el laboratorio son esterilizados en autoclave: medios de cultivo, buffers, tubos de ensayo, cajas de Petri, entre otros. El proceso se realiza durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

Las superficies son desinfectadas previo a iniciar cualquier labor, para lo cual se utiliza alcohol 70%. Esto incluye mesadas, campana de extracción, flujo laminar.

Las agujas histológicas, espátulas y otros materiales de metal se someten a las altas temperaturas de un mechero para asegurar la asepsia de los mismos.

La desinfección también incluye las manos del operario y el uso de la vestimenta adecuada como ser guardapolvos, guantes, cofias y barbijos.

INVERNÁCULO

El laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias Agrarias cuenta además con una instalación destinada al cuidado de plantas. Allí se hacen crecer las mismas dándoles las condiciones ideales. El riego es una actividad compartida entre los miembros del equipo. Cada uno tiene un sector asignado donde se distribuyen distintos ensayos. En mi caso, el riego se realizaba con regadera, puesto que eran plantines en almácigo.

TRABAJO EN CÁMARA DE FLUJO LAMINAR

Consiste en una cabina en la cual el aire se mueve en forma pareja, ordenada y suave, lo cual crea un ambiente libre de partículas, tomando aire a través de un sistema de filtración y expulsándolo a través de la superficie de trabajo mediante una corriente de aire laminar o unidireccional. Allí se realizaron varias prácticas como preparación de cajas de Petri o tubos de ensayo conteniendo distintos medios de cultivo, siembra, repiques, a fin de evitar la contaminación de las mismas con agentes externos. La mesada contaba además con un sistema de iluminación a fin de favorecer la visibilidad, considerando que estas prácticas requieren precisión; un mechero, para esterilizar agujas, espátulas y otros instrumentos de laboratorio, y de esta manera trabajar en un ambiente aséptico, ofreciendo protección al producto y al proceso.

Es muy importante destacar que al trabajar en las cámaras de flujo laminar se sanitizó completamente la superficie, tanto antes como después de finalizada su labor, y no se dejaron cajas, tubos y otros contenedores que pudieran llegar a contaminar, ya que además restan espacio de trabajo. El sanitizante empleado en este caso fue alcohol 70%.

TRABAJO EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN

Es un equipo de protección colectiva. Se utilizó en caso de operar con sustancias que desprenden vapores tóxicos, inflamables o irritantes. También en caso de manipular compuestos de olor fuerte, como por ejemplo B-mercapto, fentanilo, entre otros. Se encendió la campana antes de comenzar a trabajar en ella. Se introdujeron sólo los brazos dentro de la campana, siendo protegido el rostro por una superficie transparente que permite visualizar la mesa de trabajo. Aquí se realizó la extracción de ADN a partir de plantas e insectos (*Dalbulus maidis*), para la cual el buffer estaba compuesto de B-mercapto, compuesto de olor fuerte y tóxico para la salud humana. También se llevó a cabo la extracción de ARN, utilizando RNazol.

ELECTROFORESIS

Para este procedimiento se utiliza agarosa 1% disuelta en buffer TBE 0,5 X, la cual gelifica a temperatura ambiente, por lo cual es necesario disolverla previamente en una fuente de calor, en este caso se utilizó microondas a baja potencia. Se dejó enfriar antes de colocarla en cama de acrílico para confeccionar el gel que servirá de sustrato para la electroforesis.

Para realizar los pocillos de siembra se utilizó un peine. Se dejó gelificar, lo cual fue notable a la vista porque cambió de apariencia y color. Se retiró el peine, se extrajo la placa con gel y se llevó a la cuba. Se agregó TBE 0,5 X y se sembró las muestras en los pocillos respectivos. El buffer de siembra utilizado estaba compuesto de glicerol, que le da peso a la muestra y colorantes o indicadores, en este caso azul de bromofenol y xileno cianol FF, compuestos coloreados y con carga, utilizados para comprobar el progreso de la electroforesis. Se conectó la cuba a una fuente de energía y se encendió. Se corroboró en qué sentido se encontraba el desplazamiento, considerando que el ácido nucleico tiene carga negativa y se mueve hacia el positivo. Finalizado este procedimiento se desconectó la cuba de la fuente de energía y se retiró la placa de agarosa para llevarla a un

recipiente donde se realizó la tinción con bromuro de etidio. Se dejó reposar por lo menos 15 minutos y luego se observó bajo luz UV (Figura 14).

Es importante destacar que el bromuro de etidio es un agente tóxico clasificado como mutágeno categoría 2 por la Agencia Europea para la seguridad y el trabajo, ya que existe la posibilidad de que una exposición prolongada cause mutaciones hereditarias y cáncer. En virtud de lo antedicho este reactivo no fue manipulado por personal que no estuviera capacitado, como así también se usó equipo de protección personal, como guardapolvos y guantes, preferentemente de nitrilo.

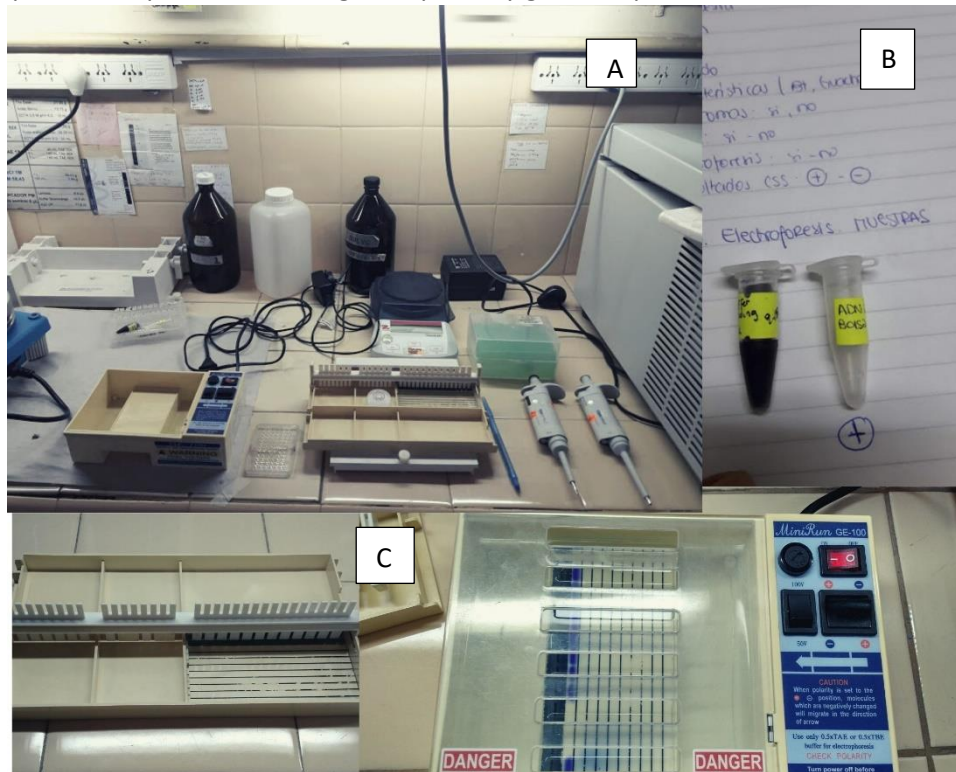


Figura. 14. Preparación de materiales para electroforesis. B. Tubos conteniendo buffer (coloreado, izq.) y muestra de ADN (der). C. Cuba de electroforesis.

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Pude involucrarme con el trabajo que se realiza en un laboratorio, con mayor alcance del que se tiene durante el cursado de materias que involucran prácticas en este lugar. Pude comprender y participar en el proceso de elección de las técnicas adecuadas para cada situación de diagnóstico, enfatizando en la identificación molecular de diferentes patógenos. Personalmente es un área de trabajo en el cual me sentí cómoda, proyectando a futuro una oportunidad laboral en este ámbito. Es importante resaltar la seguridad, la cual debe mantenerse constantemente en un laboratorio, dado los riesgos que implica este sector. Tuve la oportunidad de capacitarme, participando en investigaciones científicas, solventadas por becas, lo cual despertó un gran interés en mí por esta vocación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alippi AM, Aguilar OM (1998) Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. J Invertebr Pathol 72:21–27.
- Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende, R. O., and Dally, E. L. 2001. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. Plant Dis. 85:475-480.
- Bosco, D., Palermo, S., Mason, G. et al. DNA-based methods for the detection and the identification of phytoplasmas in insect vector extracts. Mol Biotechnol 22, 9–18 (2002). <https://doi.org/10.1385/MB:22:1:009>
- Catara, V., Arnold, D., Cirvilleri, G. & Vivian, A. (2000). Specific oligonucleotide primers for the rapid detection of the causal agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*: evidence for two genomic groups. Eur J Plant Pathol 106, 753–762.
- Catara V., Sutra L., Morineau A., Achouak W., Christen R., Gardan L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52, 1749–1758.
- Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Res. 20:2380.
- De Agudelo, F. V. Sarria Villa, G.A. 2007. Enfermedades del maíz y su manejo. Compendio ilustrado. Instituto colombiano agropecuario (ICA) y Federación nacional de cultivadores de cereales y leguminosas (Fenalce). Palmira, Colombia. 55 p.
- Kuhnem, P.R. Stumpf, R. Spolti, P. Ponte, E. 2013. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. Ciência Rural 43 (4):583-588.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 N° 1:13-15.
- Dreier, J., BERPPOHL, A., and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85:462-468.
- Harrison, N.A; Richardson, P.A; Tsai, J.H; Ebbert, M.A; Kramer, J.B. 1996. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. Plant Disease 80: 263-269.
- Jurado M., Vázquez C, Marín S, Sanchis V, González-Jaén MT. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. Systematic and Applied Microbiology 29: 681–689.
- Leslie J.F. Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA. 388 pp.
- Sampietro DA, Marín P, Iglesias J, Presello DA, Vattuone MA, Catalan CA, Gonzalez Jaen MT. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. Fungal Biol. 2010 Jan;114(1):74-81. doi: 10.1016/j.mycres.2009.10.008.
- Schaad, W., Jones, J.B. and Chun, W. (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Edition, APS Press, St. Paul, 373

ANEXO

PROTOCOLOS

PREPARACIÓN DE MEDIOS

ÁGAR AGUA (BACTERIOLÓGICO)

Disolver 20 g en 1 L de agua.

- APG (Ágar Papa Glucosa)

Para 2 L:

- Pesar 40 a 45 g de Potato Dextrosa Ágar.
- Disolver lentamente en aproximadamente 100 cm³ de agua tibia.
- Pesar nuevamente 40 a 45 g de Potato Dextrosa Ágar y disolver a baño maría con lo anteriormente disuelto.
- Añadir antibiótico.

AGAROSA 1%

- Disolver 1 g de agarosa en 100 ml TBE 0,5X.
- Llevar a microondas hasta total disolución.
- Dejar enfriar.

PREPARACIÓN DE BUFFER

CTAB

- 10 ml de 1M Tris-HCl pH 8.4
- 8.18 g de 1,4 M NaCl
- 5 ml 0.5 EDTA pH 8.0
- 2 g CTAB 2% (H-6929)
- H₂O hasta completar 100 ml

Es necesario calentar a 55°C en baño de agua para disolver CTAB.

TE

- 200 mM Tris HCl pH 8.5
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 0.5% SDS

TBE

- 27 g Tris base
- 13,75 g Ácido bórico
- 10 ml EDTA 0,5 M (pH 8)

- Añadir primero EDTA y llevar a volumen con agua.
- Colocar en agitador magnético e ir agregando Tris base más el ácido bórico.

- Añadir más agua de ser necesario.

Tomar 50 ml TBE y añadir 450 ml agua para obtener TBE en una concentración 0,5X.

CLOROFORMO 24:1

- 2 ml alcohol isoamílico
- 48 ml cloroformo