

Identificación de la invasión de *Verticillium Dahliae* en plantas de girasol mediante anticuerpos monoclonales específicos

Quiroz Facundo¹, Clemente Gladys³, Escande Alberto^{1,2}.

¹INTA EEA Balcarce, ²UNMDP-FCA Balcarce, ³CONICET. E-Mail: fquiroz@balcarce.inta.gov.ar

La Marchitez por *Verticillium dahliae* es la enfermedad más importante para el cultivo de girasol en la Argentina (2) y es endémica en aproximadamente en el 55% de la superficie sembrada en la Argentina (1). Existen técnicas de ELISA para detectar la invasión del hongo en papa (3). Para utilizarla en girasol es necesario adaptar las técnicas de trabajo.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es medir la invasión de *Verticillium dahliae* en girasol mediante anticuerpos monoclonales específicos.

Materiales y Métodos

- Conjunto ELISA de BIOREBA® con anticuerpo monoclonal específico para *Verticillium dahliae*.
- Plantas de girasol sin síntomas y con más del 60% de severidad de abigarrado (síntoma en hoja que caracteriza a la enfermedad).
- Plantas de girasol cultivadas en suelo pasteurizado a 70 C por 2 horas.
- Aislamiento América de *Verticillium dahliae* (micoteca EEA INTA Balcarce).

Trabajos previos mostraron escasas reacciones positivas a partir de muestras de tejidos de plantas de girasol con alta severidad de abigarrado y en los controles positivos (BIOREBA®). Esto motivó la realización de las siguientes pruebas: para ajustar el muestreo se probaron cuatro alturas (25; 50; 75 y 100 cm); dos órganos (tallo y peciolo); dos estadios sanitarios (con y sin síntomas de abigarrado); tres estadios fenológicos (R6, R7 y R8); dos diluciones de tejidos en buffer de extracción (1:5 y 1:10 p.v) y para el desarrollo de un control positivo se incluyeron suspensiones de conidios de *V. dahliae* (200.000 y 20.000 conidios/ml) en buffer de extracción o en agua destilada como diluyentes. Los tejidos fueron macerados en buffer de extracción y sembrados en placas ELISA Nunc sensibilizadas con anticuerpos específicos para *Verticillium dahliae* (BIOREBA®; 1 µl/ml). Se utilizaron los controles positivos y negativos del conjunto BIOREBA®. Se utilizaron como controles negativos tejidos de plantas de girasol sin síntomas cultivadas en suelo pasteurizado. La lectura de absorbancia se realizó en un lector de ELISA Tecan-Sunrise Remote Control a 405 nm. Se realizó análisis de la varianza de la absorbancia (405 nm) de reacciones ELISA y los promedios fueron comparados con la prueba de Duncan (a£0.05). Los resultados de los análisis de la varianza (R2 del modelo, CV y valores P) se presentan en cada figura.

Resultados

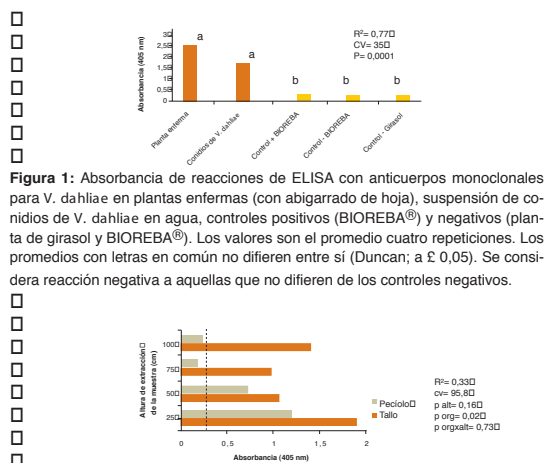


Figura 1: Absorbancia de reacciones de ELISA con anticuerpos monoclonales para *V. dahliae* en plantas enfermas (con abigarrado de hoja), suspensión de conidios de *V. dahliae* en agua, controles positivos (BIOREBA®) y negativos (planta de girasol y BIOREBA®). Los valores son el promedio cuatro repeticiones. Los promedios con letras en común no difieren entre sí (Duncan; a £ 0,05). Se considera reacción negativa a aquellas que no difieren de los controles negativos.

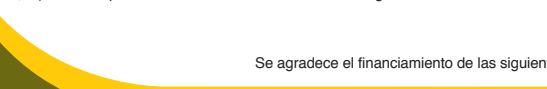


Figura 2: Efecto de cuatro alturas de extracción de tejidos de girasol con síntomas de abigarrado (alt=25, 50, 75, 100 cm) y dos órganos (org= peciolo y tallo) sobre la absorbancia (405 nm) de reacciones ELISA con anticuerpos de *V. dahliae* monoclonales. Los valores son el promedio dos plantas y tres estadios fenológicos. Los promedios con letras en común no difieren entre sí (Duncan; a £ 0,05). La línea punteada muestra el valor del control negativo.

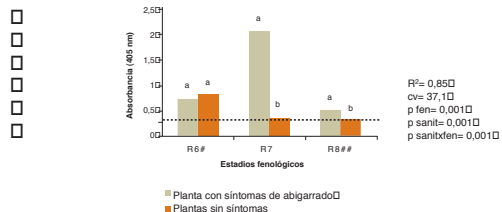


Figura 3: Efecto de dos estados sanitarios (sanit= plantas con y sin síntomas de abigarrado) y tres estadios fenológicos (fen= R6, R7 y R8) sobre la absorbancia (405 nm) de reacciones ELISA con anticuerpos monoclonales para *V. dahliae* BIOREBA®. Los valores son el promedio de cuatro alturas de muestreo y dos repeticiones. Los promedios con letras en común no difieren entre sí (Duncan; a £ 0,05). La línea punteada muestra el valor del control negativo. # Este resultado puede deberse a que en R6 aún hay plantas que no presentaron síntomas. ## Esto puede deberse a que en R8 el tejido es poco suculento pudiendo afectar la extracción.

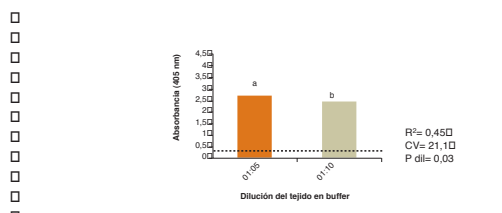


Figura 4: Efecto de la dilución del tejido en buffer de extracción (dil) sobre la absorbancia (405 nm) de reacciones de ELISA con anticuerpos monoclonales para *V. dahliae* BIOREBA®. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones y dos sitios de muestreo (tallo y peciolo). Los promedios con letras en común no difieren entre sí (Duncan; a £ 0,05). Se trabajó con muestras de una planta con 90% de severidad de abigarrado. La línea punteada muestra el valor del control negativo.

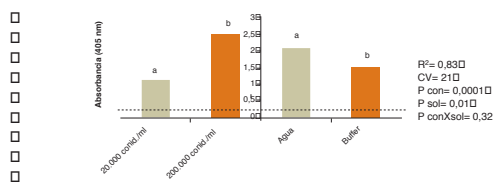


Figura 5: Efecto de la concentración de conidios de *V. dahliae* (con) y de su suspensión en agua o buffer (sol) sobre la absorbancia (405nm) de reacciones de ELISA con anticuerpos monoclonales para *V. dahliae* BIOREBA®. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones y dos concentraciones de conidios o dos diluyentes (agua o buffer de extracción). Los promedios con letras en común no difieren entre sí (Duncan; a £ 0,05). La línea punteada muestra el valor del control negativo.

Conclusiones

La técnica de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales para *V. dahliae* (BIOREBA®) permite detectar la presencia del patógeno en plantas de girasol con síntomas de abigarrado.

El control positivo de BIOREBA® no fue efectivo. Las muestras de tallo extraídas desde plantas con síntomas de abigarrado dan mayor absorbancia que aquellas de peciolo.

En tallo de plantas con más del 60% de severidad de abigarrado el hongo se detecta hasta los 100 cm de altura.

En peciolo de plantas con más del 60% de severidad de abigarrado el hongo se detecta sólo hasta los 50 cm de altura.

Plantas con síntomas de abigarrado presentaron mayor absorbancia en el estadio R7 que en R6 y R8.

Las muestras de tejido diluidas 1:5 (p.v) en buffer de extracción dan reacciones con mayor absorbancia que en la diluida 1:10.

La suspensión de 200.000 conidios/ml de *V. dahliae* en agua es un buen control positivo de la presencia del hongo.

Referencias

- (1) Bertero de Romano AB, 1999. *Verticillium Wilt*. Working sub-group on *Verticillium dahliae* Kleb (1998-1999). Helia, Special Issue 1: 279-292.
- (2) Pereyra V y Escande A, 1994. Enfermedades del girasol en la Argentina. Manual de reconocimiento. Unidad Integrada Balcarce. Balcarce, Argentina.
- (3) Plasencia J, y Bantrari EE, 1997. Comparison between a culture plate method and an immunoassay to evaluate vascular colonization of potato by *Verticillium dahliae*. Plant Disease 81, 53-56.

Se agradece el financiamiento de las siguientes instituciones: ASAGIR, FONCYT, INTA, UNMDP.