

# Implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de los agentes causales de roya marrón y roya naranja en caña de azúcar en Tucumán, R. Argentina

Romina P. Bertani\*, M. Francisca Perera\*\*, Claudia Funes\*\*\*, Cesar R. Kairuz\*\*\*, Marta E. Arias\*\*\*\*, Victoria González\*\*, L. Daniel Ploper\*\*\*\*\* y Atilio P. Castagnaro\*\*\*\*\*

## Introducción

La caña de azúcar es el cultivo que dio origen a la actividad agroindustrial más antigua de la República Argentina y su producción se concentra en la región del Noroeste Argentino (NOA).

Este cultivo está sometido a diversos factores bióticos y abióticos que condicionan su rendimiento. Las enfermedades son unos de los factores más importantes que afectan adversamente la producción de los cañaverales. Entre ellas se encuentran la **roya marrón**, causada por el hongo *Puccinia melanocephala* H. y P. Sydow, y la **roya naranja** producida por *Puccinia kuehnii* Butler.

La roya marrón se encuentra ampliamente distribuida en las regiones cañeras del mundo (Glynn *et al.*, 2010). En el continente americano, se la encontró por primera vez en República Dominicana en el año 1978 (Purdy y Dean, 1984). Hasta el momento se registraron pérdidas de producción desde el 10% al 40% en variedades susceptibles, según estudios realizados por Comstock *et al.* (1992) en Canal Point, Florida, EE. UU.

En Tucumán (República Argentina), la roya marrón se detectó en 1988 (Würschmidt *et al.*, 1988) y no existen estimaciones precisas del daño económico causado por esta enfermedad.

En general, *P. melanocephala* ocasiona un retraso en el desarrollo de la planta, que se manifiesta tanto en la reducción de la longitud de los tallos, como en la disminución del número de tallos por cepa (Victoria *et al.*, 1984).

El efecto de este patógeno también genera un impacto económico considerable en los programas de mejoramiento genético, ya que la resistencia a

roya es uno de los criterios de selección, por lo que se eliminan líneas pre-comerciales susceptibles al patógeno.

En el caso de la roya naranja, se la citó por primera vez en el continente americano en 2007 en Florida, EE. UU., y desde allí se esparció a Méjico, Cuba y otros países de Centroamérica. En 2009 fue detectada en Brasil y en 2010 en Colombia, constituyéndose en los primeros países de Sudamérica en reportar la presencia de este patógeno (Funes *et al.*, 2011). Si bien la roya naranja aún no ha sido detectada en la Argentina, se estima que su introducción podría causar pérdidas significativas para el sector azucarero.

En general, las royas son enfermedades que afectan principalmente el follaje de las plantas. Se caracterizan por la aparición de pequeñas manchas alargadas y amarillentas, visibles en ambos lados de las hojas, que aumentan progresivamente en longitud y se tornan de color café, naranja-café o rojo-café con el paso del tiempo (Purdy y Dean, 1984). Los hongos que las causan son parásitos obligados; es decir, inician una nueva infección solo en el tejido vivo del hospedante. Las royas se transmiten principalmente por el viento, pudiendo también, en menor grado, ser diseminadas por el agua.

El método más efectivo de control de estas enfermedades es el empleo de variedades resistentes. Sin embargo, las royas se caracterizan por producir explosiones cíclicas, que se exacerban en función del inóculo, el hospedero susceptible y las condiciones ambientales favorables. De modo que la permanencia constante de este patógeno en el campo hace factible la selección de razas más viru-

\*Lic. Biotecnología, \*\*\*Ing. Agr., \*\*\*\*\*Ing. Agr. Ph.D., Sección Fitopatología; \*\*Lic. Dra. Biotecnología, \*\*\*\*\*Ing. Agr. Dr., Sección Biotecnología, EEAOC; \*\*\*\*Lic. Biol. Dra., Facultad de Ciencias Naturales, Instituto Miguel Lillo, UNT.

lentas. Esto provoca que algunas variedades pierdan su resistencia, tal como sucedió con la variedad LCP 85-384, que en 2005 quebró su resistencia a *P. melanocephala* (Ramallo *et al.*, 2005).

Las diferencias en coloración de las esporas (urediniosporas) y pústulas (lesiones uredinales) son características morfológicas que permiten distinguir ambas royas, sin constituir un método definitivo (Glynn *et al.*, 2010). Las pústulas, típicamente de color naranja, más cortas y de forma ovoide se pueden asociar a *P. kuehnii*, mientras que las de color marrón oscuro y forma alargada se asocian a *P. melanocephala* (Figuras 1 y 2).

Considerando lo anteriormente expuesto, y siendo la roya naranja una amenaza potencial para la agroindustria cañera, es imprescindible disponer de técnicas de diagnóstico precisas y específicas para diferenciarla de la roya marrón. El objetivo de este trabajo fue optimizar una metodología molecular basada en PCR (del inglés “polymerase chain reaction”), para el diagnóstico de los patógenos causantes de ambas royas.

## Descripción de las experiencias

### 1) Recolección del material

Se recolectaron 30 muestras de hojas +1 o +2 (primera y segunda hoja con lígula visible, respectivamente) con síntomas de roya, recogidas en lotes cañeros de diferentes localidades de la provincia de Tucumán (Cevil Pozo, dpto. Cruz Alta; El Colmenar, dpto. Tafí Viejo; Santa Ana, dpto. Río Chico; Río Seco, dpto. Río Seco; Padilla, dpto. Famaillá; Mercedes, dpto. Lules y La Fronterita, dpto. Famaillá). Se trabajó con las siguientes variedades: LCP 85-384, TUCCP 77-42, CP 65-357, TUC 95-37, TUC 04-29, TUC 03-53, TUC 03-69, TUC 03-58, TUC 03-66, TUC 04-28, TUC 03-72, TUC 03-55, TUC 99-14 y TUC 00-44.

Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas selladas y se conservaron a -70°C.

Previo a la extracción de los ácidos nucleicos, el material vegetal fue molido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se mantuvo a -70°C. Se seleccionó material con diferentes grados de severidad, de manera de ajustar el tipo de muestra.



Figura 1. Hojas de caña de azúcar con lesiones (pústulas) color café a café oscuro y áreas necróticas alrededor, causadas por roya marrón (*Puccinia melanocephala*). Tucumán, R. Argentina, marzo de 2011.

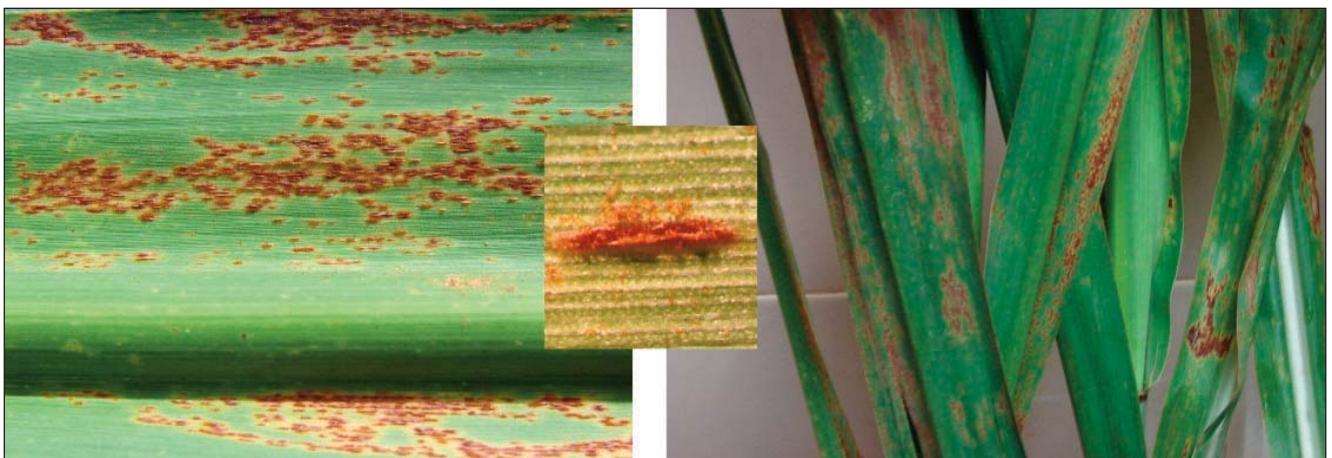


Figura 2. Hojas de caña de azúcar con lesiones ligeramente café, a veces amarillas o amarillento-naranjas, con algunas áreas necróticas causadas por roya naranja (*Puccinia kuehnii*). San Pablo, Brasil, marzo de 2010.

## 2) Extracción de ácidos nucleicos

Se extrajeron los ácidos nucleicos totales (ADN-ARN) empleando la técnica de CTAB (del inglés “Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”), con el protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999), modificado en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC).

Se ensayó una limpieza adicional con fenol, de modo de obtener una mejor calidad de los ácidos nucleicos extraídos. Los ácidos nucleicos fueron resuspendidos en agua bidestilada estéril y su calidad se monitoreó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

## 3) Detección de *Puccinia melanocephala* y *P. kuehni* mediante la técnica de PCR

Se amplificaron por PCR diferentes fragmentos del ADN ribosomal (ADNr), dada su accesibilidad y facilidad para la amplificación. El ADNr se encuentra organizado en unidades repetidas en tándem, con cientos de copias por genoma.

Se utilizaron cinco pares de cebadores, dos generales para hongos (ITS1F/ITS4, NL1/NL4); un par que permite diferenciar a *P. melanocephala* y *P. kuehni* de acuerdo al tamaño de banda obtenido (PkPmF/PkPmR); uno específico para *P. melanocephala* (Pm1F/Pm1R) y otro específico para *P. kuehni* (PkPmF/Pk1R). Se emplearon los protocolos de Virtudazo *et al.* (2001) y Glynn *et al.* (2010), los que fueron modificados para optimizar la técnica de detección de ambos patógenos. En todos los casos, se incluyeron testigos positivos y negativos para *P. melanocephala* y *P. kuehni*. El ADN de este último fue provisto por el Centro de Tecnología Canaveira

(CTC), San Pablo, Brasil.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. Algunas bandas amplificadas fueron purificadas del gel de agarosa utilizando el “QIAGEN gel extraction kit” y secuenciadas en INTA Castelar. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el GenBank.

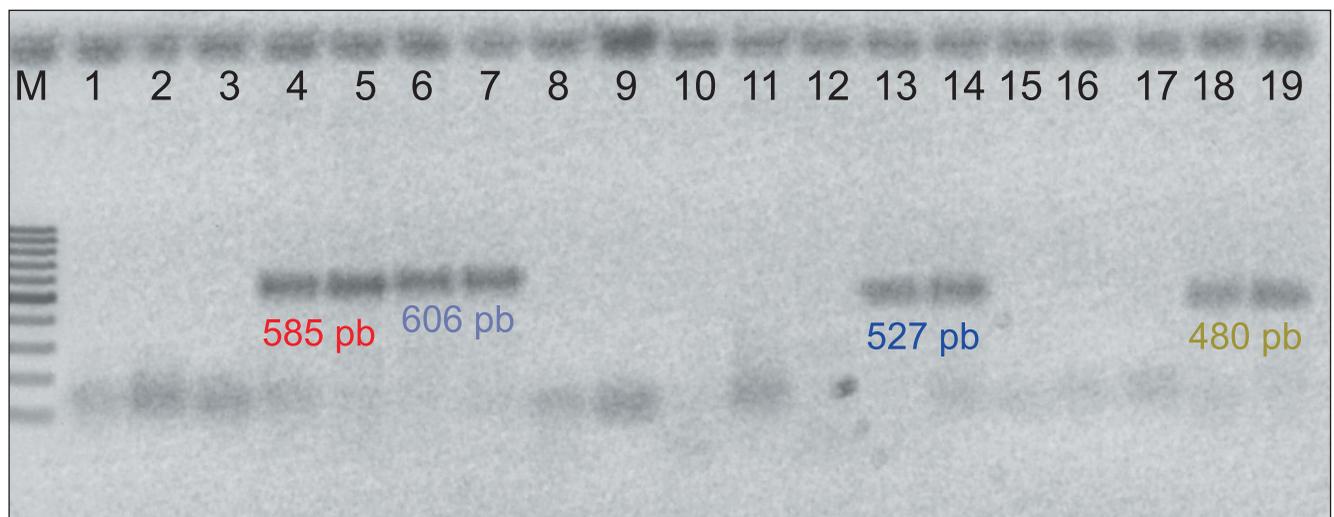
## Resultados

La utilización de material vegetal con un menor número de pústulas y el empleo adicional de fenol en la extracción de ácidos nucleicos permitieron obtener ácidos nucleicos de mejor calidad.

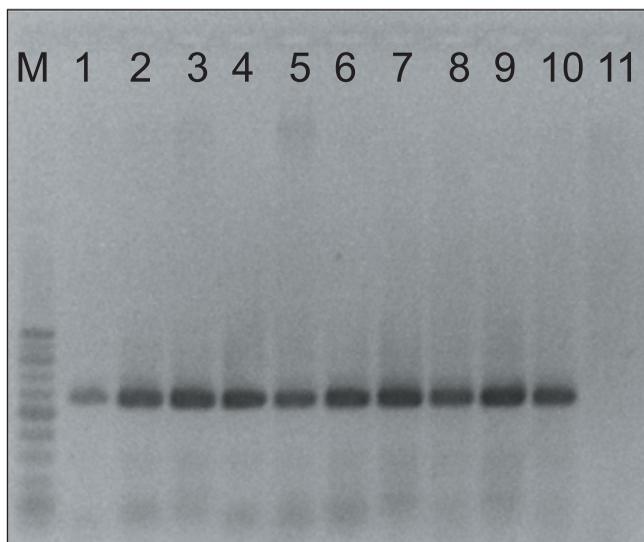
Se lograron ajustar los protocolos para el diagnóstico molecular por PCR de los agentes causales de las enfermedades roya marrón y roya naranja con los distintos pares de cebadores. Con este objetivo, se ensayaron diferentes condiciones, tales como la concentración de MgCl<sub>2</sub>, de los cebadores y de los ácidos nucleicos (molde), así como la temperatura de hibridación de los cebadores. Las temperaturas óptimas quedaron fijadas en 55°C para el par ITS1F/ITS4; 51°C para NL1/NL4 y 58°C para los tres pares PkPmF/PkPmR, Pm1F/Pm1R y PkPmF/Pk1R (Figura 3).

Las 30 muestras analizadas resultaron positivas para *P. melanocephala*, amplificando fragmentos de 670 pares de bases (pb) (ITS1F/ITS4), 608 pb (NL1/NL4), 585 pb (PkPmF/PkPmR) (Figura 4) y 480 pb (Pm1F/Pm1R). En ninguna de las muestras se observó la banda del tamaño esperado de 527 pb al utilizar el par específico para *P. kuehni*.

Los resultados de la comparación de las secuen-



**Figura 3. Productos de amplificación con el par de cebadores PkPmF/PkPmR.** Calles 1 a 3: controles negativos (plantas sanas y mezcla de reacción más agua); calles 4 y 5: controles positivos de *P. melanocephala*; calles 6 y 7: controles positivos de *P. kuehni*. Con el par de cebadores PkPmF/Pk1R (específico para *P. kuehni*), se obtuvieron los siguientes productos de amplificación: calles 8 a 10: controles negativos; calles 11 y 12: muestras positivas de *P. melanocephala* y calles 13 y 14: controles positivos de *P. kuehni*. Con el par Pm1F/Pm1R (específico para *P. melanocephala*), se obtuvieron: calle 15: control negativo; calles 16 y 17: muestras positivas de *P. kuehni* y calles 18 y 19: controles positivos de *P. melanocephala*. M: marcador de peso molecular Cien Marker, Promega (de arriba hacia abajo 1000 pb a 100 pb).



**Figura 4. Productos de amplificación con el par de cebadores PkPmF/PkPmR.** Calles 1 a la 9: muestras de la provincia de Tucumán positivas para roya marrón; calle 10: control positivo de *P. melanocephala* y calle 11: control negativo. M: marcador de peso molecular Cien Marker, Promega (de arriba hacia abajo 1000 pb a 100 pb).

cias obtenidas con las del GenBank reconfirmaron la presencia de roya marrón en las muestras evaluadas.

### Consideraciones finales

Se optimizó la extracción de ácidos nucleicos para la detección del hongo responsable de la roya marrón de la caña de azúcar, a partir de material vegetal con pústulas. Esto permitió simplificar y acelerar el proceso de detección del patógeno, dado que no fue necesaria la extracción a partir de tejido exclusivo del hongo (esporas de las pústulas).

Si bien hasta el momento no se ha encontrado roya naranja (*P. kuehni*) en los cultivos comerciales de caña de azúcar de Tucumán, es necesario realizar monitoreos permanentes a fin de detectar su introducción. Además, es importante disponer de métodos específicos ajustados para la detección del patógeno. Este aspecto resulta de vital importancia para encarar estrategias de manejo de esta patología, cuyas posibles consecuencias son aún desconocidas.

Un posterior estudio de la diversidad genética de *Puccinia melanocephala* permitirá establecer patrones de ataque diferenciales de las razas del patógeno a un mismo cultivo y respuestas diferenciales de los cultivos a una misma raza patogénica, logrando así

una mejor interpretación de los grados de infección que sufren las distintas variedades cultivadas.

La optimización de los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y detección de *P. melanocephala* y *P. kuehni* mediante la técnica de PCR, permite poner a disposición del sector cañero una metodología precisa y específica para el diagnóstico de ambos patógenos.

### Bibliografía citada

- Aljanabi, S. M.; L. Forget and A. Dookun. 1999.** An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plan Molecular Biology Reporter* 17: 1-8.
- Comstock, J. C.; J. M. Shine and R. N. Raid. 1992.** Effect of sugarcane rust on growth and biomass. *Plant. Dis.* 76: 175-177.
- Funes, C.; A. M. Rago; M. F. Perera; S. G. Pérez Gómez; R. Fernández de Ullivarri y M. I. Cuenya. 2011.** Roya naranja de la caña de azúcar: situación actual en el continente americano. *Avance Agroind.* 32 (1): 13-17.
- Glynn, N. C.; L. J. Dixon; L. A. Castlebury; L. J. Szabo and J. C. Comstock. 2010.** PCR assays for the sugarcane rust pathogens *Puccinia kuehni* and *P. melanocephala* and detection of a SNP associated with geographical distribution in *P. kuehni*. *Plant Pathol.* 59: 703-711.
- Purdy, L. H. y J. L. Dean. 1984.** La roya, una vieja enfermedad con nueva importancia en la caña de azúcar. *Sugar y Azucar* 79 (1): 67-70.
- Ramallo, J. C.; L. D. Ploper; E. Brito y J. Giardina. 2005.** Distribución y severidad de la roya marrón de la caña de azúcar en la variedad LCP 85-384 en Tucumán. *Avance Agroind.* 26 (1): 9-11.
- Victoria, J. I.; B. O. Ochoa y J. F. Gómez. 1984.** La roya de la caña en el valle del Cauca: diseminación y efecto en la producción. En: *Memorias del Congreso de la Sociedad Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar, Tecnicaña*, 1, Cali, Colombia, 1984, pp. 209-218.
- Virtudazo, E. V.; H. Nakamura and M. Kakishima. 2001.** Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8 S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 28-36.
- Würschmidt, G.; N. E. V. de Ramallo y C. Levi. 1988.** Distribución e incidencia de la roya de la caña de azúcar en Tucumán. *Avance Agroind.* 9 (33): 5-8.

Revista

**avance**  
agroindustrial

Contacto por publicidad

Tel. (0381) 431 3209

Cel. (0381)155 198890

e-mail: revistaavance@yahoo.com.ar