

## **Comparación de moléculas antigénicas unidas a la pared celular y ADNg de *Rhizoctonia solani* AG-3 y *R. solani* AG-2-1, patógenos de papa en Mérida, Venezuela.**

Comparison of antigen molecules bound to the cell wall of *Rhizoctonia solani* AG gDNA-3 and *R. solani* AG-2-1, potato pathogens in Merida, Venezuela.

Carrero, Chrystian<sup>1</sup>; García, Lugo Pablo<sup>2</sup>; Stege, Patricia<sup>3</sup>; Sombra, Lorena<sup>3</sup> y Olsina, Roberto<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes (ULA). Dirección: Santa Rosa - La Hechicera, Mérida, Venezuela. Apdo. postal 77.  
E-mail: cfcarrer@ula.ve

<sup>2</sup>Postgrado de Biotecnología de Microorganismos de la Facultad de Ciencias de la ULA.

<sup>3</sup>Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis, Argentina.  
Investigación Iniciada en marzo de 2007 y finalizada en noviembre de 2010.

Fecha de Inicio de la investigación: 07/2006

Fecha de terminación de la investigación: 02/2009

### **RESUMEN**

La papa es un rubro agrícola de destacada importancia en el área andina venezolana. *Rhizoctonia solani* es un fitopatógeno que diezma los rendimientos al causar lesiones considerables en tubérculos, estolones y tallo en el cultivo. En la zona andina venezolana la papa es afectada por los grupos de anastomosis 3 y 2-1 de *R. solani*. Características epidemiológicas han sido estudiadas y demuestran que estos grupos presentan diferencias en los niveles de incidencia y severidad en que se presentan en el campo. El presente estudio se realizó con la finalidad de comparar moléculas antigénicas unidas a la pared celular de los dos grupos de anastomosis en estudio y su genética. Los resultados demuestran la gran similitud existente en los antígenos de AD-3 y AG-2-1 y explica de algún modo la razón por la cual los anticuerpos desarrollados a partir de éstos presentan reacción cruzada entre los grupos comparados. La comparación del fragmento de ADNg permitió determinar el grado de similitud entre AG-3 y AG-2-1.

Palabras claves: *Solanum tuberosum*, electroforesis capilar, ADN, Grupos de anastomosis

#### ABSTRACT

The potato is an important crop in the Venezuelan Andean region. *Rhizoctonia solani* is a plant pathogen that decreases yields to cause considerable harm in tubers, stolons and stems in the crop. In the Venezuelan Andes, the potato is affected by anastomosis groups 3 and 2-1 of *R. solani*. Epidemiological characteristics have been studied and demonstrate that these groups differ in levels of incidence and severity occurring in the field. This study was conducted to compare antigen molecules bound to the cell wall of two anastomosis groups and genetic study. The results demonstrate the great similarity in the antigens of AD-3 and AG-2-1 and somehow explains why antibodies developed from these cross-reactive between the groups compared. Comparison of gDNA fragment allowed us to determine the degree of similarity between AG-3 and AG-2-1.

**Key Words:** *Solanum tuberosum*, capillary electrophoresis, anastomosis groups

#### INTRODUCCIÓN

El hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn [estado teleomórfico de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] es un fitopatógeno cosmopolita importante en diferentes especies vegetales. En el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) causa la enfermedad denominada "rizoctoniosis" o "muñequeo". Este hongo posee numerosas variantes genéticas denominadas o agrupadas en grupos de anastomosis (AG), para la papa en el país se han reportado *R. solani* AG-2-1 y *R. solani* AG-3, siendo esta última la de mayor incidencia en la zona andina venezolana (Cedeño et al., 2001). Estos patógenos han sido comparados en base a su patogenicidad, sin embargo, no se ha realizado una comparación de aspectos bioquímicos o genéticos para conocer las similitudes o diferencias entre estos dos organismos presentes en Venezuela. Algunos estudios de comparación entre diferentes AGs han sido realizados, Kuninaga y Yokosawa (1982 y 1983) utilizaron medidas espectrofotométricas de la hibridación ADN/ADN estimando las relaciones genéticas entre los grupos de anastomosis y los grupos intraespecíficos, los valores de hibridación ADN/ADN de los AG fueron establecidos alrededor del 30 %. Aunque la similitud dentro de un AG es usualmente alta (más del 70 %), algunos como AG-4 y AG-6 mostraron reducida similitud, Kuninaga y Yokosawa (1983 y 1982) también observaron reducida complementariedad del ADN en los grupos AG-1, AG-2 y AG-9.

En 2011 se reportó el desarrollo de anticuerpos policlonales para la detección de *R. solani* en tejidos de papa (Carrero, et al., 2011), los antígenos fueron aislados de la pared celular del hongo, a través de técnicas de extracción de proteínas y carbohidratos de moléculas ancladas a la membrana. Los resultados mostraron reacción cruzada entre los aislados de *R. solani*. Iguales resultados encontraron

Thornton et al. (2004) donde obtuvieron reacción cruzada al realizar pruebas serológicas con los grupos de anastomosis 1, 2-1, 2-3, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y AG-BI de *R. solani*.

El presente estudio tuvo como propósito comparar bioquímicamente las moléculas antigénicas unidas a la pared celular de *R. solani* AG-2-1 y AG-3, aisladas en Venezuela, así como evaluar al grado de similitud de fragmentos de ADNg.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de antígenos para la comparación bioquímica:** Los antígenos utilizados para la comparación bioquímica entre los aislados de AG-3 y AG-2-1 causantes de rizoctoniosis en papa fueron los utilizados por Carrero et al., 2011, identificados como AG-3 de Mucuchies y AG-2-1 El Valle. Para el estudio de comparación de los antígenos fue utilizada la fracción de moléculas con anclaje a la pared celular identificada como F3.

**Electroforesis capilar:** La similitud o diferencias en los perfiles de las moléculas ancladas a la pared celular de AG-3 y AG-2-1 causantes de rizoctoniosis en papa, fue analizada con electroforesis capilar, usando Cromatografía Capilar Electrocinetica Micelar (MECK). Se utilizó buffer fosfato pH 8 con 10 mM de Sodium Dodecyl sulfato (SDS) como buffer de corrida y buffer fosfato a pH 8 como buffer muestra (Baker, 1995). Las condiciones de operación fueron: 10 s de tiempo de inyección, 35 min de tiempo de corrida, detección UV a 214 y 195 nm, 67 cm de longitud del capilar, el equipo utilizado fue un Beckman Coulter modelo P/ACE MDQ.

**Extracción de ADN genómico:** La composición de la estructura del ADN de *R. solani* AG-3 y *R. solani* AG-2-1 se realizó siguiendo la metodología de extracción y amplificación reportada por Guevara (2004): 5 g de micelio fresco fueron congelados con nitrógeno líquido y triturados en un mortero, el material se transfirió a un tubo y se agregó solución aislante [2 % (p/v) Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB); 1,4 M NaCl; 20 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 %  $\beta$ -mercaptoetanol] precalentada a 60 °C, la muestra se incubó por 30 min a 60 °C en baño de María (Marca Jubalo, modelo SW22). Luego se agregó un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se agitó suavemente hasta lograr una emulsión. El material fue centrifugado por 10 min a 3000 g. De las dos fases formadas se tomó la porción acuosa y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío, la muestra se dejó en reposo durante 15 min, posteriormente se procedió a centrifugar a 2000 g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 3 ml de etanol 70 %, se centrifugó nuevamente a 2000 g durante 5 min, eliminando el sobrenadante. El material se colocó a secar durante una hora. Se resuspendió el sedimento (sin agitación) en 400  $\mu$ l de agua mili Q autoclavada la cual se encontraba a 4 °C.

La condición del ADN extraído fue evaluada en geles de agarosa 0,8 % en buffer 45 mM Tris base; 1 mM EDTA pH 8; 5,5 % ácido bórico (TBE). En los pozos se

colocaron 5 µl de muestra, y como patrones de peso molecular se utilizaron marcadores para ADN de 100 pb (Promega), la corrida electroforética se realizó a 90 V. El gel fue teñido con solución 0,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 5 min y luego lavado con agua destilada durante 20 min. El material genómico fue observado en un transluminador UVP (Guevara, 2004). Fragmentos del ADN obtenido fueron amplificados a través de la reacción de polimerasa y se obtuvo un amplificado que fue enviado a secuenciar en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), se utilizaron los cebadores específicos para hongos LICHITSF 5'GCGGAAGGATCATTACTGAG3' y LICHTSR 5'GGGTATCCCTACCTGATCCG3', los cuales son blanco de espaciadores transcritos internos (ITS 1 y 2) de las unidades ribosomales (5.8s) (Yeates *et al.*, 1998). Se utilizó un Kit-PCR Promega y un termociclador marca Eppendorf, modelo MasterCycler Gradient que se programó para las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	3 min	1
94	1 min	35
55	1 min	
72	2 min	
72	5 min	1

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología empleada permitió conocer y comparar la fracción F3 de las muestras de *R. solani* AG-3 Mucuhies y *R. solani* AG-2-1 El Valle, lográndose observar la similitud de ambos hongos en cuanto a este grupo de moléculas (Figura 1), las pequeñas diferencias observadas explican de alguna manera la desigualdad en los patrones observados en los Western Blot reportados por Carrero *et al.* (2011). Sin embargo, existe una gran similitud bioquímica entre estos dos hongos, lo cual permite explicar la razón por la cual los anticuerpos desarrollados para *R. solani* AG-3 dan reacción cruzada con *R. solani* AG-2-1, otros investigadores presentan resultados de reacción cruzada entre diferentes grupos de anastomosis; sin embargo no se había aclarado las posibles implicaciones bioquímicas (Thornton *et al.*, 2004; Adams y Butler, 1979; Abe *et al.*, 1969).

La extracción, purificación y amplificación del ADN de *R. solani* AG-3 Mucuchies y *R. solani* AG-2-1 El Valle, permitió obtener fragmentos de 620 bp (Figura 1). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y 1arrojaron los siguientes resultados:

*R. solani* AG-2-1 El Valle (Forward)

```
TCTTTTGTAACTCAATTGGTTTCACCTTTGGTATTGGAGGTCTTTGCAGCTTCACACCTG
CTCCTCTTTGTTTCATTAGCTGGATCTCAGTGTTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAA
TTTTAAACGAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTG
GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTTT
GAGTATCATGAATCTTCAAAGTAAATCTTTTGTAACTCAATTGGTTTCACCTTTGGTATT
GGAGGTCTTTGCAGCTTCACACCTGCTCCTCTTTGTTTCATTAGCTGGATCTCAGTGTTATGCTT
GGTCCACTCAGCGTGATAA
```

*R. solani* AG-2-1 El Valle (Reverse)

```
ACAAAGAGGAGCAGGTGTGAAGCTGCAAAAGACCTCCAATACCAAAGTGAAAC
CAATTGAGTTAACAAAAGATTACTTTGAAGAATTCATGATACTCAAATAGACCAGCTACA
ACCAAACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTC
ACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGC
```

*R. solani* AG-3 Mucuchies (Forward)

```
CTTCTTTCTCCACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGTTGGGGAATTTATTTGTTATTTTTG
TAATAAAATGATAATAAATCATTGAACCTTTCTGTCTACTCAACTCATATAAAATCAA
TTTTATTTAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGT
ATCCTTGGAGCATGCCTGTTTGAAGTATCATGAAATCTTCAAATGAATCTTTTGTAACTCA
ATTAGTTTGAATTTGGTATTGGAGGTCTTTTGCAGCTTCACACCTGCTCCTCTT
TGTGT1ATTAGCTGGATCTCAGTGTTATGCTTGGTCCACTCAG
```

*R. solani* AG-3 Mucuchies (Reverse)

```
ATACACAAAGAGGAGCAGGTGTGAAGCTGCAAAAGACCTCCAATACCAAATCA
AACTAATTGAGTTAACAAAAGATTCAATTTGAAGATTCATGATACTCAAACAGGCATGCTC
CAAGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCT
GCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAA
GAGATCCGTTGTTGAACTTAGTATGAGATGTGTTACATCCATTACATTTAAAT
AAATTGATTTTATATGAGTTGAGTAGACAGAAGGGTTCAATGATTTATTATCATTTTATTACA
AAAAATAACAAATAAATTCCTCAACTGTCTCACAAGTTCACAGGTGTGTGTGGGAT
GAAAGAGGGAGGTGTGCACATGCCTAAATAAATAGACCAGCTACAACCAA
```

Las secuencias al ser comparadas con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y del *European Bioinformatics Institute* (EBI), permitieron determinar la relación de homología (Figura 2) para cada uno de los grupos estudiados:

*R. solani* AG-2-1 El Valle (Forward): Homología del 98 % para *Thanatephorus cucumeris* AG-2-1. Secuencia reportada por González et al. (2001) y por Kuramae et al. (2003) para fragmentos de *T. cucumeris* de 654 bp.

*R. solani* AG-2-1 El Valle (Reverse): Homología del 96 % para *T. cucumeris* AG-2-1. Secuencia reportada por Kuramae et al. (2003) y Toda et al. (2004) para fragmentos de 649 bp.

*R. solani* AG-3 Mucuchies (Forward): Homología de 98 % para *T. cucumeris* AG-3. Secuencia reportada por González et al. (2001) para fragmentos de 655 bp.

*R. solani* AG-3 Mucuchies (Reverse): Homología del 99 % para *T. cucumeris* AG-3. Secuencia reportada por Kuninaga et al. (2000b) y González et al. (2001) para fragmentos de 655 bp.

El principal objetivo de las secuencias era su comparación para evaluar la similitud genética entre los aislados. Al comparar con el programa EMBOSS Aling del EMBL se obtuvieron los siguientes resultados:

Similaridad entre *R. solani* AG-2-1 El Valle y *R. solani* AG-3 Mucuchies (Forward): 76,8 %

Similaridad entre *R. solani* AG-2-1 El Valle y *R. solani* AG-3 Mucuchies (Reverse): 45,2 %

### CONCLUSIONES

El estudio comparativo del ADN de *R. solani* AG-3 Mucuchies y AG-2-1 El Valle, confirma las diferencias genéticas existentes entre los dos grupos de anastomosis (Gonzalez et al., 2001 y Carling et al., 2002), esta característica los ubica como grupos genéticamente diferentes dentro de la especie *R. solani*, los cuales carecen de la capacidad de recombinación genética entre sí (fusión hifal) (Sneh et al., 1991); sin embargo, el estudio realizado de los antígenos con electroforesis capilar demuestra la estrecha afinidad bioquímica que poseen. Estos resultados son soportados por estudios previos realizados por Mohammadi et al., 2003; O'Brien y Zamani, 2003; y Silveira y Alfenas, 2002 en investigaciones relacionadas con la fisiología y la proteómica. Estos resultados explican de alguna manera porque diferentes grupos de anastomosis de *R. solani* con diferencias genéticas significativas, sean capaces de mostrar reacción cruzada en pruebas serológicas debido a sus coincidencias bioquímicas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen toda la colaboración prestada por el Dr. Nestor Añez y el equipo de trabajo del Laboratorio de parasitología "J.F. Torrealba" de la ULA.

#### REFERENCIAS

- Adams, G. C. Jr. y Butler, E. E. 1983. Environmental factors influencing the formation of basidia and basidiospores in *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 73: 152-155.
- Abe, H., Baba, T. y Takakuwa, T. 1969. Serological reaction of root rot pathogen (*Rhizoctonia solani*) of sugar beets. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 35: 374.
- Baker, D. R. (1995) *Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA.
- Carling, D. E., Kuninaga, S. y Brainard, K. A. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rADN-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92: 43-50.
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, Q., Araujo, Y., Pino, H. y García, R. (2001) Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* 26: 296-300.
- Guevara, P. 2004. Identificación y diagnóstico molecular de microorganismos. Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. 101 pp.
- González, D., Carling, D. E., Kuninaga, S., Vilgalys, y Cubeta, M. 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia* 93: 1138-1150.
- Kuninaga, S., Nicoletti, R., Lahoz, E. y Naito, S. 2000a. Ascription of Nt-isolates of *Rhizoctonia solani* to anastomosis group 2-1 (AG-2-1) on account of rDNA-ITS sequence similarity. *Journal of Plant Pathology* 82: 61-64.
- Kuninaga, S. y Yokosawa, R. 1983. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. III. Genetic relatedness within AG-3, AG-5, and AG-BI. *Ann Phytopath. Soc. Japan* 48:668-673
- Kuninaga, S. y Yokosawa, R. 1982. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuehn II. Genetic relatedness within anastomosis group 2. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 48: 668-673.

- Kuramae, E. E., Buzeto, A. L., Ciampi, M. B. y Souza, N. L. 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 391-395.
- Mohammadi, M., Banihashemi, M., Hedjarroude, G. y Rahimian, 2003. Genetic diversity among Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis group subgroup based on isozyme analysis and total soluble protein pattern. *J. Phytopathology* 151: 162-170.
- O'Brien, P. O. y Zamani, M. 2003. Production of pectic enzymes by barepath isolates of *Rhizoctonia solani* AG-8. *Australasian Plant Pathology* 32:65-72.
- Silveira, S. y Alfenas, A. 2002. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp. Patogênicos a *Eucalyptus*. *Fitopatol. Bras.* 27: 33-41.
- Sneh, B., Burpee, L., y Ogoshi, A. (1991) Identification of *Rhizoctonia solani*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 133 pp.
- Thornton, C.R., Groenhof, A.C., Forrest, R. y Lamotte, R. (2004) A one-step, immunochromatographic lateral flow device specified to *Rhizoctonia solani* and certain related species, and its use to detect and quantify *R. solani* in soil. *Phytopathology* 94: 280-288.
- Toda, T.; Mghalu, J. M.; Pryatomojo, A. y Hyakumachi, M. 2004. Comparison of sequences for the internal transcribed spacer region in *Rhizoctonia solani* AG 1-ID and other subgroups of AG-1. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 270-272.
- Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D. y Veal, D. A. 1998. Methods for microbial DNA extracting from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online* 1: 40-47

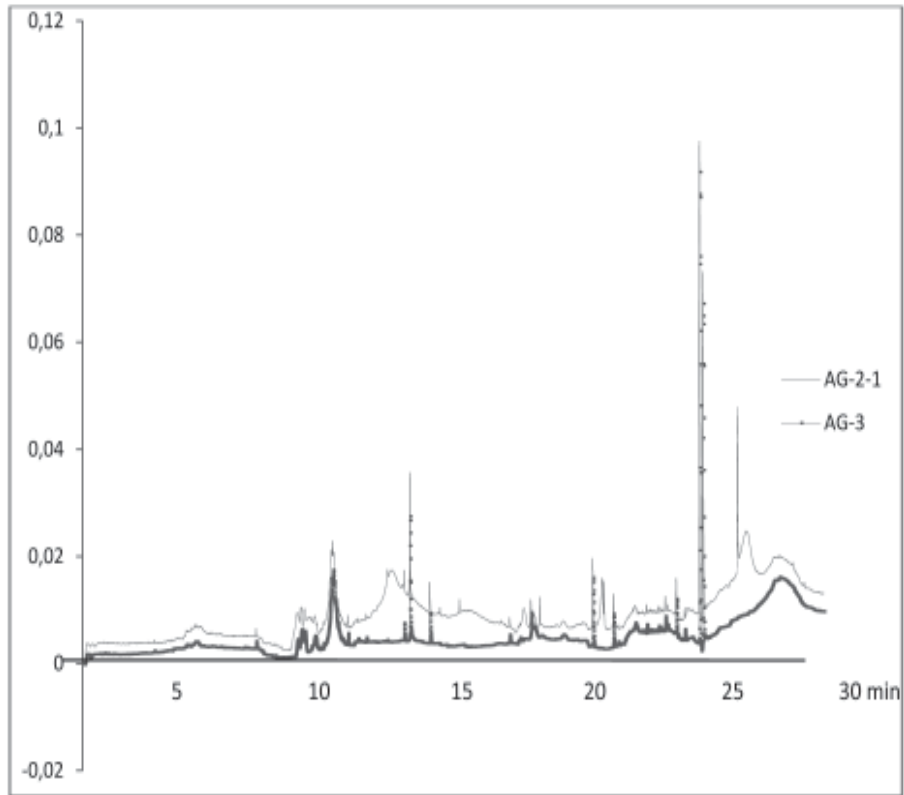


Figura 1. Electroforesis capilar. Patrones de las muestras F3 R. solani de AG-3 Mucuchies y AG-2-1 El Valle.

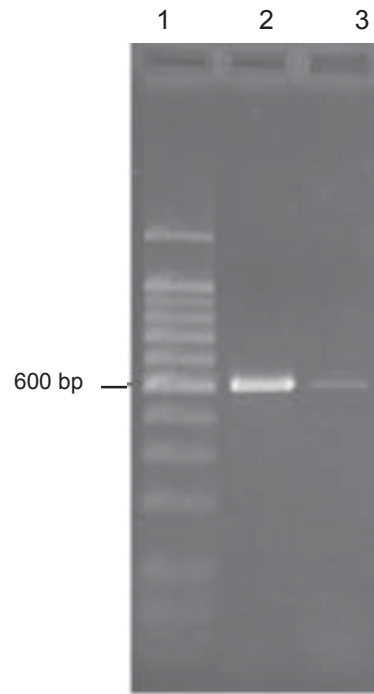


Figura 2. **Evaluación de la condición del amplificado de ADN de *R. solani*.** 1.- Marcadores de peso molecular, 2.- AG-3 Mucuchies y 3.- AG-2-1 El Valle. Gel de agarosa 2 %.