

DETECCIÓN DE *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* ASOCIADAS A LLAGAS RADICALES, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

Ángela Judith Carreño Pérez*, Bertha Lucía Castro Caicedo*, Narmer Fernando Galeano Vanegas**, Álvaro León Gaitán Bustamante***

CARREÑO P., A.J.; CASTRO C., B.L.; GALEANO V., N.F.; GAITÁN B., A.L. Detección de *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* asociadas a llagas radicales, mediante pcr en tiempo real (qPCR). Revista Cenicafé 69(1):40-54. 2018

La llaga radical causada por el hongo del suelo *Rosellinia* spp. es una enfermedad terminal en café (*Coffea* spp.), debido a que las plantas no se recuperan luego de la infección y el área de los focos no tratados aumenta con el tiempo. Se recomienda un manejo integrado para enfrentar los problemas causados por estos patógenos en las zonas cafeteras colombianas, dada la dificultad de controlar los brotes que aparecen en los lotes. El propósito de este estudio fue desarrollar métodos específicos y sensibles, basados en PCR, para detectar niveles de inóculo remanentes, con el propósito de verificar la idoneidad del suelo para nuevas plantaciones o de comprobar la recuperación de sitios previamente afectados con el fin de replantar. Pares de iniciadores para PCR cuantitativo (qPCR) se diseñaron con base en secuencias obtenidas *a priori*, de marcadores AFLP polimórficos. Se validaron por PCR convencional y PCR en tiempo real, cuatro combinaciones de iniciadores que permitieron la discriminación individual y simultánea entre las especies *R. pepo* y *R. bunodes*. Éste es el primer reporte de un diagnóstico con herramienta de PCR para identificar especies de *Rosellinia* asociadas a café en Colombia, y es el paso inicial para el desarrollo de herramientas de diagnóstico de inóculo en suelo en el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: Café, diagnóstico de enfermedades, inóculo.

DETECTION OF *Rosellinia pepo* and *Rosellinia bunodes* ASSOCIATED WITH ROOT ROTS BY REAL TIME PCR (qPCR)

Root rot caused by the soil-borne fungus *Rosellinia* spp. is a terminal disease in coffee (*Coffea* spp.) because plants do not recover from the infection and the area of untreated foci grows with time. Due to the difficulty of controlling the outbreaks that occur in plantation lots, an integrated management to face the problems caused by these pathogens in the Colombian coffee zones is recommended. This study aimed to develop specific and sensitive PCR-based methods to detect remaining inoculum levels in order to verify soil suitability for new plantations or to check the recovery of previously affected sites for replanting purposes. Primer pairs for quantitative PCR (qPCR) were designed based on sequences obtained *a priori* from polymorphic AFLP markers. Four combinations of primers that allowed the individual and simultaneous discrimination between the *R. pepo* and *R. bunodes* species were validated by conventional PCR and real-time PCR. This is the first report of a diagnosis with PCR tool to identify species of *Rosellinia* associated with coffee in Colombia and it is the initial step for the development of soil inoculum diagnostic tools for the management of the disease.

Keywords: Coffee, diseases diagnosis, inoculum.

*Investigador Científico I (hasta diciembre de 2011 y febrero de 2014, respectivamente). Disciplina de Fitopatología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

**Asistente de Investigación (hasta diciembre de 2012). Disciplina de Fitopatología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia

***Director. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

El género *Rosellinia* incluye muchas especies, entre las cuales pocas son de reconocida importancia por su efecto patogénico en hospedantes comerciales. A pesar de que estas especies causan grandes pérdidas debido a su agresividad y al amplio rango de plantas que atacan, las investigaciones sobre este patógeno son limitadas en el ámbito científico internacional (23).

Entre las enfermedades del café que a nivel mundial ocasionan la muerte de plantas se encuentran las denominadas llagas radicales, ocasionadas por especies del género *Rosellinia*, una de las enfermedades más destructivas tanto en plantas de ciclo corto como perennes (4, 7, 19, 23). Su daño principal ocurre en las raíces, consumiendo progresivamente los tejidos y ocasionando la muerte de las plantas en cualquier estado de desarrollo. Los síntomas externos de marchitamiento y muerte de las plantas son evidentes cuando el patógeno ha invadido completamente las plantas y en las raíces se observan los signos del patógeno, caracterizados por puntos y estrías negras correspondientes a masas de micelio cuando hay ataque de *R. bunodes* o micelio en forma de estrellas en el caso de *R. pepo* (4, 10, 16).

El incremento de ataques de llagas radicales, tanto en café como en cultivos asociados a éste, ha motivado la búsqueda de nuevas medidas preventivas para el manejo de focos de infección que eviten la muerte de plantas de tardío rendimiento como lo es el café. Sin embargo, por tratarse de un patógeno del suelo, su manejo y control es difícil en la mayoría de los casos, recurriendo al manejo integrado mediante la eliminación rigurosa de residuos de raíces, exposición de los focos a los rayos solares y aplicación de productos químicos y microorganismos antagonistas (8, 14). La erradicación y limpieza de sitios infectados, que es la

práctica más importante del manejo, es en muchos casos de difícil realización en cultivos perennes. Por tal motivo, se hace necesario contar con estrategias efectivas de monitoreo y diagnóstico que se basen en análisis microbiológicos de suelo, y que mejoren los métodos convencionales que, no siempre son fáciles, económicos, de rápido resultado o de amplia cobertura.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporciona una alternativa confiable para la identificación y detección de hongos patógenos (21). En comparación con la PCR convencional, la PCR cuantitativa (qPCR) ofrece mayor especificidad y sensibilidad, rapidez para proporcionar datos fiables y puede detectar múltiples organismos simultáneamente (6, 12). Agentes intercalantes como el SYBRgreen® y sondas fluorogénicas como TaqMan®, Molecular Beacons y Scorpion™, son los principales tipos de moléculas usadas para detectar amplificación por qPCR (17). A diferencia de las sondas fluorogénicas, el SYBRgreen® tiene la ventaja que no requiere el diseño de fragmentos específicos complementarios al DNA blanco, por lo cual puede ser utilizado para la visualización directa de cualquier producto de PCR en tiempo real. La tasa de emisión de fluorescencia de este colorante aumenta notablemente cuando se une al DNA de doble hélice (dsDNA). El incremento de la cantidad de DNA sintetizado en cada ciclo se refleja en un incremento proporcional de la fluorescencia emitida (5, 11, 17).

La qPCR está siendo utilizada para la identificación, detección y cuantificación de microorganismos fitopatógenos como bacterias (20, 26) y hongos en el suelo (2, 5, 11, 12, 21, 22). Específicamente en *Rosellinia*, el método de Real-Time Scorpion-PCR ha sido empleado para la detección y cuantificación de *R. necatrix*, en suelo y raíces de aguacate (9, 18, 21, 22, 25).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de diagnóstico basado en PCR de tiempo real para la identificación y detección de *R. bunodes* (*Rb*) y *R. pepo* (*Rp*) tanto en café como en plantas asociadas a este cultivo. Este es el primer reporte de un ensayo de qPCR para la identificación y detección específica de las especies de *Rosellinia* asociadas a café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Para el presente estudio se trabajó con una colección de DNA de 30 aislamientos, obtenidos de raíces de café y cultivos asociados con síntomas y signos de llagas radicales, previamente caracterizados e identificados como *R. pepo* y *R. bunodes* (Tabla 1), incluyendo como control negativo de amplificación y especificidad de los iniciadores ADN extraído de un aislamiento de *Xylaria* sp.

Diseño de marcadores SCAR para qPCR

El diseño de marcadores creados a partir de Regiones de Secuencias Caracterizadas Amplificadas (SCAR, en inglés) para la caracterización de *Rosellinia* spp., se realizó mediante la conversión de marcadores de Fragmentos Amplificados Polimórficos en Longitud (AFLP). A partir de fragmentos de DNA generados mediante las combinaciones EcoRI/MseI (E-AA/M-A, E-AC/M-CTA y E-TC/M-CTC), se seleccionaron marcadores AFLP de diferentes tamaños (entre 200-500 pares de bases) por grupos interespecíficos. Las bandas que fueron comunes en aislamientos pertenecientes a una misma especie y que estuvieran ausentes en la otra especie, fueron eluidas del gel con la ayuda de una punta de micropipeta y se colectaron en tubos eppendorf con 50 µL de Acetato de

Na 0,1M pH 6,0. Se seleccionaron cuatro bandas comunes en diferentes aislamientos, por cada marcador polimórfico.

Las bandas eluidas fueron maceradas con la ayuda de un pistilo y se sometieron a un proceso de purificación, previo a la reamplificación por PCR. El procedimiento consistió en una desnaturalización a 95°C x 5 min, seguido de un congelamiento a -80°C x 5 min, descongelamiento a temperatura ambiente y centrifugación a 13.000 rpm x 5 min. El sobrenadante fue extraído a un tubo nuevo y se adicionaron dos volúmenes de etanol frío al 100%, mezclados por inversión y almacenados a -20°C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm x 10 min, se desechó la fase acuosa y el *pellet* de DNA resultante se lavó dos veces con etanol frío al 70%. Se secó durante 1 h en el Eppendorf Vacufuge® Concentrator y se resuspendió en 20 µL de búfer AE. El DNA se amplificó por PCR inmediatamente o se almacenó a -20°C.

Las re-amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 20 µL, conteniendo 5 µL del DNA eluido del gel y purificado, 1X de búfer PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,3 ng del iniciador selectivo EcoRI, 1,5 ng del iniciador selectivo MseI y 0,5u de *Taq DNA polimerasa* (Fermentas). El programa de amplificación comprendió un ciclo inicial de denaturación a 94°C x 3 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94°C x 30 s, hibridación de iniciadores a 46°C x 45 s y extensión a 72°C x 1 min; con un ciclo final de 72°C x 10 min. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Se clonaron los productos de reamplificación que presentaron el tamaño esperado.

Tabla 1. Información de los aislamientos de *Rosellinia* spp. y *Xylaria* sp. utilizados para las pruebas de caracterización molecular.

Aislamiento	Identificación molecular	Hospedante	Localización	Identificación genbank
RMACC 57	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Macadamia integrifolia</i> Maiden & Betche	Chinchiná (Caldas)	-
RMACQ 46	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Macadamia integrifolia</i> Maiden & Betche	Buenavista (Quindío)	JF263560
RGUC 28	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Psidium guajava</i> L.	Chinchiná (Caldas)	JF263549
RGUC 45	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Psidium guajava</i> L.	Chinchiná (Caldas)	JF263548
RGUC 46	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Psidium guajava</i> L.	Chinchiná (Caldas)	JF263547
RCACC 35	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Theobroma cacao</i> L.	Palestina (Caldas)	-
RCACC 36	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Theobroma cacao</i> L.	Palestina (Caldas)	JF263559
RCACC 65	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Theobroma cacao</i> L.	Palestina (Caldas)	JF263545
RCACC 66	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Theobroma cacao</i> L.	Palestina (Caldas)	JF263558
RCACC 67	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Theobroma cacao</i> L.	Palestina (Caldas)	JF263557
RCR 14	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Pereira (Risaralda)	JF263562
RCCR 14.2	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Pereira (Risaralda)	JF263550
RCR 24	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Pereira (Risaralda)	JF263561
RCC 60	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Chinchiná (Caldas)	JF263554
RCC 64	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Palestina (Caldas)	JF263553
RCC 64.2	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Palestina (Caldas)	JF263552
RCC 67	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263540
RCAUR 17	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Hevea brasiliensis</i> Müll. Arg.	Pereira (Risaralda)	JF263556
RCAUR 18	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Hevea brasiliensis</i> Müll. Arg.	Pereira (Risaralda)	JF263555
RMACC 45	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Macadamia integrifolia</i> Maiden & Betche	Chinchiná (Caldas)	JF263546
RGUAMQ 1	<i>Rosellinia pepo</i>	<i>Inga edulis</i> (Vell) Mart	Circasia (Quindío)	-
RCQ 48	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263544
RCQ 48.2	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263537
RCQ 51	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Quimbaya (Quindío)	-
RCQ 60	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Quimbaya (Quindío)	JF263543
RCQ 65	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263542
RCQ 67	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Chinchiná (Caldas)	JF263551
RCQ 67.2	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263539
RCQ 68	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263538
RCQ 68.2	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Quimbaya (Quindío)	-
RCQ 66	<i>Rosellinia bunodes</i>	<i>Coffea arabica</i> L.	Circasia (Quindío)	JF263541

El procedimiento de clonación se realizó en medio de cultivo LB, en estado líquido y sólido. Se tomaron 2 µL de cada mezcla por marcador y se ligaron en el vector pGEM®-T Easy Vector System I (Promega). La transformación se realizó empleando células competentes One Shot® Mach1™-T1^R de *Escherichia coli* (Invitrogen), que fueron cultivadas en medio LB agar con ampicilina durante 16 h. Posteriormente, por cada fragmento clonado se repicaron diez colonias blancas, las cuales fueron cultivadas en medio LB agar con ampicilina. Simultáneamente, se realizó una PCR de colonia para confirmar la presencia del fragmento de interés, utilizando los iniciadores universales SP6 y T7. Las reacciones de amplificación contenían 1X de búfer PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM de cada iniciador y 0,5u de *Taq DNA polimerasa* (Fermentas). El programa de amplificación consistió de una denaturación inicial a 94°C x 3 min, seguida de un ciclo a 94°C x 30 s, 57°C x 30 s y 72°C x 2 min; 35 ciclos a 94°C x 30 s, 52°C x 30 s, 72°C x 2 min, y un ciclo de extensión final a 72°C x 10 min.

Los productos de PCR de cada colonia se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. El DNA plasmídico de las colonias seleccionadas se purificó utilizando el Kit QIAprep Miniprep (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los plásmidos purificados se enviaron a Macrogen (Korea) para su secuenciación en ambas direcciones, usando los iniciadores universales T7/SP6. Las secuencias resultantes para cada marcador fueron evaluadas por parámetros de calidad (valor mínimo de Phred igual a 30) y por tamaño esperado.

Las secuencias consenso de DNA de las bandas AFLP cortadas se usaron para el diseño de iniciadores SCAR, empleando los programas Batchprimer3¹ y Primer3 Plus². Los iniciadores diseñados fueron sometidos a un análisis empleando el programa Amplify 3³.

PCR convencional

Con el fin de determinar la capacidad de los marcadores SCAR para diferenciar cada una de las especies de *Rosellinia*, se evaluaron 22 combinaciones de iniciadores mediante amplificaciones PCR. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 µL, los cuales contenían: 20 ng de ADN, 1X de búfer PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador y 0,5 u de *Taq DNA polimerasa* (Fermentas). La amplificación consistió de un ciclo inicial a 94°C x 4 min, seguido de 35 ciclos a 94°C x 45 s, 55°C x 30 s, 72°C x 60 s, y un ciclo final a 72°C x 10 min. El tamaño de los amplicones se evaluó por electroforesis, en geles de agarosa al 1,5%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta. Las combinaciones de iniciadores SCAR que mostraron amplificaciones específicas se seleccionaron para realizar la genotipificación de *Rosellinia* spp. mediante qPCR.

Real-Time PCR (qPCR)

Para realizar las pruebas de estandarización mediante qPCR se utilizó DNA de cinco asilamientos de la población de estudio de *Rosellinia* spp. (dos de *R. pepo*, dos de *R. bunodes* y uno de *Xylaria* sp., como control negativo de amplificación). Se evaluaron 12 combinaciones de iniciadores, previamente

¹ <http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>

² <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

³ <http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>

seleccionados por PCR convencional, con el fin de seleccionar marcadores SCAR que permitieran discriminar entre especies de *Rosellinia* spp. asociadas a café. Los marcadores SCAR más eficientes se evaluaron con DNA de 29 aislamientos de *Rosellinia* spp., 19 aislamientos de *R. pepo* y diez de *R. bunodes*, para determinar la eficiencia de discriminación de cada marcador.

El fluorocromo usado en las pruebas fue el QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). Las reacciones se realizaron en un volumen de 20 μ L, el cual contenía 20 ng de ADN, 1X qPCR master mix y 1 μ M de cada iniciador. La amplificación se realizó en un termociclador BIORAD C1000™ Thermal Cycler con un módulo de cabezote CFX96 Real-time System. El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial a 95°C x 10 min, seguida de 39 ciclos con denaturación a 94°C x 30 s, anillamiento a 60°C x 30 s y extensión a 72°C x 30 s; al finalizar la extensión, en cada ciclo se realizó una lectura de fluorescencia del SYBR Green. La curva de Melting se efectuó con un rango de temperatura desde 55°C hasta 95°C, realizando lecturas cada 0,2°C y manteniendo la lectura 1s.

Las reacciones se corrieron en duplicado o triplicado. El análisis de las muestras se realizó con base en la curva de Melting y los valores Ct. Para verificar la contaminación cruzada, se incluyeron controles de agua ultrapura en todos los montajes de las reacciones de qPCR. Los materiales empleados se descontaminaron con el producto “DNA Away” (Molecular BioProducts), y se emplearon puntas con filtro para minimizar la contaminación.

Detección de *Rosellinia* spp. en suelo infestado artificialmente

El inóculo de *R. pepo* y *R. bunodes* se preparó según la metodología reportada por Paulitz y

Schroeder (15), con algunas modificaciones. Se adicionaron 250 g de arroz parbolizado y 250 mL de agua, en bolsas selladas y el material se dispuso en autoclave dos veces por 90 min, en dos días consecutivos. Las bolsas se sembraron con cuatro discos de un cultivo de *Rosellinia* spp. de dos semanas, crecido en medio AEM (Agar Extracto de Malta). Las bolsas fueron homogeneizadas una vez por semana e incubadas a temperatura ambiente, por cuatro semanas. Los granos colonizados se emplearon como inóculo de *Rosellinia* spp.

Para realizar las pruebas de detección del patógeno en suelo, el inóculo se mezcló con suelo seco en diferentes cantidades de granos de arroz colonizado por gramo de suelo (0,025 g, 0,050 g, 0,100 g, 0,200 g, 0,300 g, 0,400 g, 0,600 g). La mezcla se homogeneizó y empleó para la extracción de DNA inmediatamente. Para cada muestra, la extracción de DNA se realizó en triplicado usando el *Ultra Clean Soil DNA extraction Kit* (MoBio Laboratorios), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Un microlitro del DNA extraído fue usado para evaluar la especificidad de los iniciadores en la detección e identificación del patógeno en el suelo, mediante la amplificación por qPCR. Las reacciones incluyeron testigos con DNA de suelo sin infestar y el análisis de los datos para determinar la concentración a la cual puede empezarse a detectar el patógeno se realizó como se describió anteriormente.

RESULTADOS

Diseño de marcadores SCAR para la identificación y detección de *Rosellinia* spp. asociadas a llagas radicales

A partir de 28 marcadores AFLP interespecíficos, generados con las combinaciones E-AA/M-A,

E-AC/M-CTA y E-TC/M-CTC, se diseñaron marcadores SCAR para *R. bunodes* y *R. pepo*. La denominación de los marcadores consta primero de la combinación de iniciadores a la que pertenece y después del número de la banda polimórfica en dicha combinación.

Se logró la reamplificación de 12 marcadores específicos para *R. pepo* y 15 marcadores para *R. bunodes*, de los cuales solamente 18 fueron clonados (ocho para *Rp* y diez para *Rb*). Por cada marcador clonado se seleccionaron diez colonias transformadas, a las cuales se les realizó PCR de colonia para verificar la presencia del inserto. Según el tamaño esperado para cada fragmento y teniendo en cuenta que la longitud del mismo sería superior al esperado, puesto que los sitios de unión de los iniciadores T7/SP6 se encuentran distanciados del sitio

de clonación, por marcador se seleccionaron cinco colonias que contenían el fragmento de interés, lo cual permitió obtener un total de 98 clones secuenciados (Tabla 2).

La edición de secuencias se realizó empleando el software CodonCode Aligner. Como resultado del proceso de limpieza de las 196 secuencias obtenidas, se descartaron 11 secuencias del análisis debido a que presentaron valores Phred inferiores a 30. Las 187 secuencias restantes se analizaron y ensamblaron para verificar la homología de secuencia entre clones de un mismo marcador. A partir de la formación de *contigs*, se descartaron las secuencias que formaron *singletons*, al igual que secuencias de clones que presentaron formación de dos o más *contigs* dentro de un mismo marcador. El análisis de los *contigs* formados determinó que los marcadores difieren en secuencia uno

Tabla 2. Tamaño de fragmentos amplificados y número de clones secuenciados para cada marcador AFLP.

Número	ID marcador	Longitud (pb)	No. clones secuenciados
1	AAA_1	500	5
2	AAA_3	450	6
3	ACCTA_1.1	400	5
4	ACCTA_1.2	400	7
5	ACCTA_2	350	5
6	ACCTA_3	350	5
7	ACCTA_4	350	5
8	ACCTA_5	500	5
9	ACCTA_6	450	6
10	ACCTA_7	400	5
11	ACCTA_8	350	6
12	ACCTA_9	350	5
13	TCCTC_1	500	5
14	TCCTC_5	650	5
15	TCCTC_6	650	6
16	TCCTC_7	550	6
17	TCCTC_8	400	6
18	TCCTC_9	400	5

del otro. Solamente los marcadores ACCTA 1.1 y ACCTA 3, específicos para *R. pepo*, se agruparon dentro de un mismo *contig*.

Finalmente se seleccionaron los *contigs* de seis marcadores AFLP para *R. pepo* y nueve para *R. bunodes*, para el diseño de marcadores SCAR. Las secuencias consenso se cargaron en el programa *Batchprimer3*, cambiando las opciones de tamaño de producto con un mínimo de 80, óptimo de 110 y máximo de 150, y Tm mínima de 55, óptima de 60 y máxima de 63. Los iniciadores generados, *Forward and Reverse*, se sometieron a un análisis empleando el programa *Amplify* para descartar las combinaciones de iniciadores que generaban dímeros y productos inespecíficos. Se seleccionaron 11 combinaciones de iniciadores promisorias como marcadores SCAR, cuatro diseñadas para *R. pepo* y siete para *R. bunodes*. Adicionalmente, con el programa *Primer3 Plus* se diseñaron iniciadores para qPCR, los cuales fueron igualmente evaluados para la formación de dímeros y productos inespecíficos. Este programa generó 13 combinaciones de posibles marcadores SCAR, cinco para *R. pepo* y ocho para *R. bunodes*. En total, se generaron 24 combinaciones de iniciadores, promisorias como marcadores SCAR para la genotipificación de *Rosellinia* spp. en café y cultivos asociados a éste.

Especificidad de marcadores SCAR

La PCR se optimizó evaluando diferentes temperaturas de anillamiento, 50°C, 52°C, 55°C, 57°C y 60°C. La temperatura óptima de anillamiento fue de 55°C, debido a que a temperaturas superiores o inferiores se observaron productos de amplificación inespecíficos.

La especificidad de las 24 combinaciones de marcadores SCAR se evaluó mediante PCR convencional, con DNA de *R. pepo*

y *R. bunodes*. Se confirmó la amplificación de un solo fragmento de DNA del tamaño esperado para todos los aislamientos de *Rosellinia* spp. y no se detectó amplificación para *Xylaria* sp., con 12 marcadores. Diez combinaciones amplificaron positivamente solo para *R. bunodes* y dos para *R. pepo* (Tabla 3). Las demás combinaciones evaluadas se descartaron del estudio puesto que no permitieron diferenciar entre especies ni presentaron especificidad.

Genotipificación de *R. bunodes* y *R. pepo* mediante qPCR

La estandarización de la técnica se realizó evaluando diferentes temperaturas de anillamiento desde 53°C hasta 63°C, usando un gradiente de temperatura. La temperatura óptima de anillamiento fue 60°C, reduciendo el número de combinaciones de iniciadores promisorias para la genotipificación de *Rosellinia* spp.

Se presentaron cuatro combinaciones con amplificaciones específicas, que permitieron discriminar exitosamente entre *R. pepo* y *R. bunodes*. Se genotipificaron exitosamente dos combinaciones para *R. pepo* y dos para *R. bunodes* (Tabla 4). La denominación de los iniciadores se redujo a las iniciales del programa de diseño, seguido del número del *contig* de la secuencia, consenso a partir de la cual fueron diseñados y, por último, el tamaño del producto que generan.

La especificidad de las cuatro combinaciones de marcadores SCAR óptimas para la genotipificación de *Rosellinia* spp. se evaluó usando DNA de 29 aislamientos de *Rosellinia* spp. y un aislamiento de *Xylaria* sp. Las curvas de Melting mostraron un solo pico en todos los casos, evidenciando la especificidad de la reacción y permitiendo la diferenciación entre aislamientos de *R. pepo* y *R. bunodes*.

Tabla 3. Marcadores SCAR promisorios para la genotipificación de *Rosellinia* spp. mediante PCR convencional.

No.	ID Primer	Marcador SCAR ID	Secuencia iniciadores FORWARD Y REVERSE (5' – 3')	Tamaño producto
1	BP Cont_3F TC/CTC_7	<i>R. bunodes</i>	AAGCTAAAAGGCCAGGGTTC	106
	BP Cont_3R TC/CTC_7		CTCGACTTGTGCGATGCAGAC	
	BP Cont_3 F2 TC/CTC_7		GTTGATATCCTAGACGCTCTTCCAAC	
	BP Cont_3 R2 TC/CTC_7		TAACTCAGTCGCATGAGAAGAAATAG	
3	BP Cont_7 F2 TC/CTC_6	<i>R. bunodes</i>	AGAGTTGGAATTAGAGGCAGAGAAA	110
	BP Cont_7 R2 TC/CTC_6		CTTTATTCTTCTTTTTCGGCTTACC	
4	BP Cont_8 F AC/CTA_7	<i>R. bunodes</i>	GGGTAGCACCGGAAAGATGGTA	111
	BP Cont_8 R AC/CTA_7		AGCCTCGGAGCTTTCTTCTT	
5	BP Cont_14 F2 AC/CTA_5	<i>R. bunodes</i>	GGCTATGCGTAGGATATGAAATAGAA	96
	BP Cont_14 R2 AC/CTA_5		GGGTTCGACGTGATAACTAGATAAA	
6	PP Cont_7 F2 TC/CTC_6	<i>R. bunodes</i>	GGAGCAGGACCGAAAAAATC	89
	PP Cont_7 R2 TC/CTC_6		AAATGCCGCTCTCCTCATC	
7	PP Cont_8 F AC/CTA_7	<i>R. bunodes</i>	GGGTAGCACGGAAAGATGG	86
	PP Cont_8 R AC/CTA_7		GCTTATTTACAGCGTTTCTTGG	
8	PP Cont_9 F AC/CTA_2	<i>R. pepo</i>	CCACACTAATGCAGCCAATC	104
	PP Cont_9 R AC/CTA_2		GGCTAACGGGAAAGTGAAAG	
9	PP Cont_12 F2 TC/CTC_1	<i>R. pepo</i>	TCTCATCGCCATACTCTTGG	121
	PP Cont_12 R2 TC/CTC_1		CACTTTGATCTTGGCCTGAC	
10	PP Cont_14 F2 AC/CTA_5	<i>R. bunodes</i>	GAGAAAGCGTAGTGGTCGATG	119
	PP Cont_14 R2 AC/CTA_5		GTCGAATGTGGATTGGGTG	
11	PP Cont_15 F TC/CTC_8	<i>R. bunodes</i>	CGAGCAACCATGAACACC	70
	PP Cont_15 R TC/CTC_8		CACCCAACGGATAAACCCAC	
	PP Cont_15 F2 TC/CTC_8		CGAGCAACCATGAACACC	
	PP Cont_15 R2 TC/CTC_8		AAGCTGACATCCACCCCAAC	
12				81

Tabla 4. Marcadores SCAR óptimos para la genotipificación de *R. bunodes* y *R. pepo* mediante qPCR.

No.	ID Primer Scar	Marcador SCAR ID	Secuencia iniciadores FORWARD Y REVERSE (5' – 3')	T° Melting
1	PP Contig9_104 F	<i>R. pepo</i>	CCACACTAATGCAGCCAATC	76,6
	PP Contig9_104 R		GGCTAACGGGAAAGTGAAAG	
2	PP Contig12_121 F2		TCTCATCGCCATACTCTTGG	78,8
	PP Contig12_121 R2		CACTTTGATCTTGGCCTGAC	
3	PP Contig15_70 F	<i>R. bunodes</i>	CGAGCAACCATGAACACC	76
	PP Contig15_70 R		CACCCAACGGATAAACCAC	
4	PP Contig15_81 F2		CGAGCAACCATGAACACC	77,4
	PP Contig15_81 R2		AAGCTGACATCCACCCAAC	

Las combinaciones PP Contig9_104 y PP Contig12_121 resultaron en picos únicos para *R. pepo*, con Tm de 76,6 y 78,8°C, respectivamente (Figura 1). Ambas combinaciones arrojaron porcentajes de discriminación del 100%, lo cual evidencia la especificidad de los iniciadores en la genotipificación de la especie. Los valores Ct oscilaron entre 24 y 32 ciclos.

Las combinaciones PP Contig 15_70 y PP Contig15_81 arrojaron picos únicos

de amplificación para *R. bunodes*, con Tm de 77,4 y 76,0°C, respectivamente (Figura 2). La combinación PP Contig15_70 permitió un porcentaje de discriminación del 100%, mientras que la combinación PP Contig15_81 presentó un porcentaje de discriminación del 70%. No obstante, a pesar de que esta última combinación no permitió la amplificación de todas las muestras positivas, fue exitosa para diferenciar claramente entre especies. Los valores Ct oscilaron entre 30 y 37 ciclos.

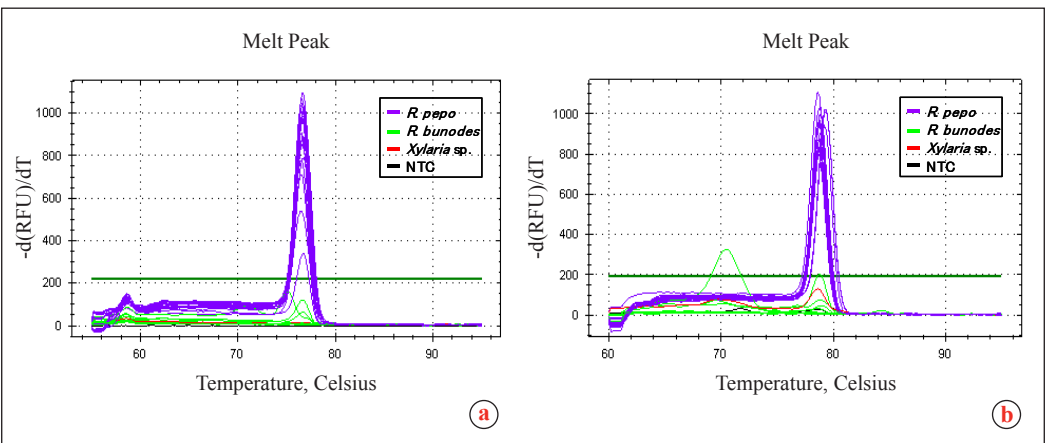


Figura 1. Genotipificación de *Rosellinia pepo* mediante qPCR: **a.** Comportamiento de la curva de Melting usando la combinación de marcadores SCAR PP Contig9_104; **b.** Comportamiento de la curva de Melting usando la combinación PP Contig12_121.

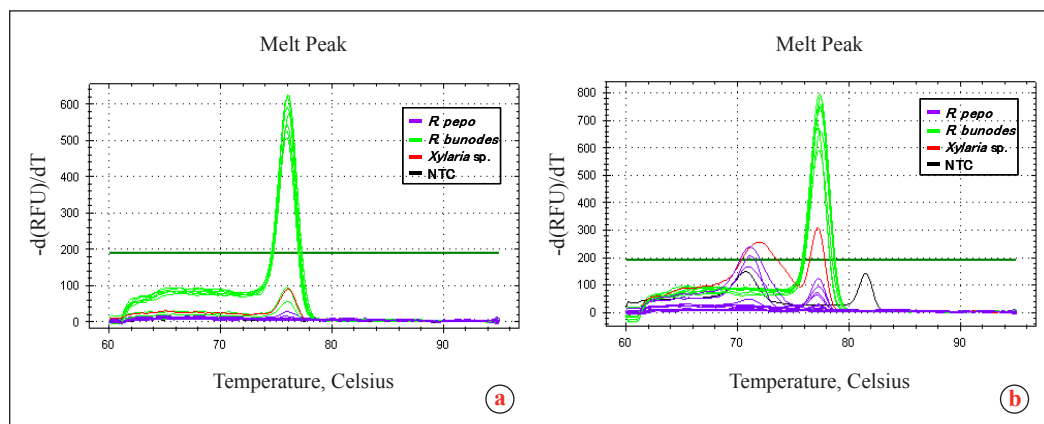


Figura 2. Genotipificación de *Rosellinia bunodes* mediante qPCR: **a.** Comportamiento de la curva de Melting usando la combinación de marcadores SCAR PP Contig15_70; **b.** Comportamiento de la curva de Melting usando la combinación PP Contig15_81.

En todos los casos, el análisis de las curvas de Melting mostró una gran diferencia entre la fluorescencia emitida por muestras positivas y la emitida por muestras negativas. No se observó amplificación del DNA de alguno de los controles negativos, con tres de las combinaciones evaluadas. La combinación PP Contig15_81 mostró un leve aumento en la fluorescencia para el aislamiento de *Xylaria* sp., pero la T_m difirió con respecto a las muestras positivas, permitiendo diferenciar claramente muestras positivas de controles negativos.

Detección de *R. bunodes* y *R. pepo* en suelo infestado artificialmente

El kit empleado para la obtención de DNA de suelo permitió la extracción de un DNA adecuado para las amplificaciones en aproximadamente 2 h. El ensayo realizado permitió detectar *R. bunodes* y *R. pepo* en suelo infestado artificialmente, mediante SCAR-qPCR. Con base en los valores C_t del experimento anterior, se probaron diferentes concentraciones de inóculo para cada especie

de *Rosellinia*. Dado que *R. bunodes* presentó detecciones más tardías, C_t entre 30 y 37, las concentraciones más bajas se probaron para esta especie y las más altas para *R. pepo*. El límite de detección fue de 100 mg.g^{-1} de suelo.

Los marcadores evaluados, además de permitir la detección individual de *Rosellinia* spp., permitieron desarrollar un ensayo de detección simultánea. PCR Múltiplex, empleando las combinaciones PP Contig 12_121 y PP Contig15_70, permitió detectar e identificar claramente las especies de *Rosellinia* inoculadas en el suelo (Figura 3). La emisión de fluorescencia estuvo relacionada con la concentración del hongo inoculada, a mayor concentración menor C_t . Los valores C_t para *R. bunodes* estuvieron entre el rango de 34 (400 mg) a 37 (100 mg), y para *R. pepo* entre 25 (600 mg) y 28 (400 mg). El DNA no fue amplificado o detectado en alguno de los controles que contenían DNA extraído de suelo infestado naturalmente, ni de los controles que contenían agua en lugar de DNA.

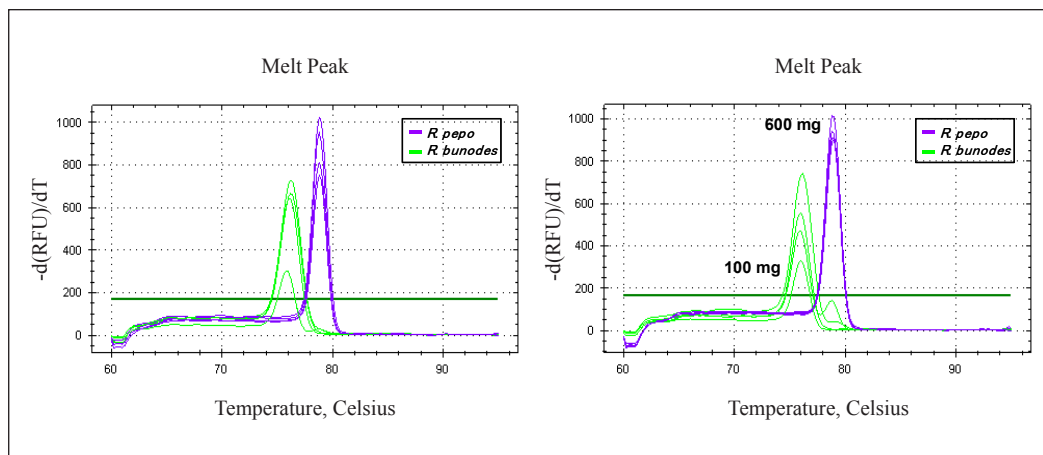


Figura 3. Detección en suelo infestado artificialmente de *R. bunodes* y *R. pepo* mediante qPCR, usando las combinaciones SCAR PP Contig 12_121 (Tm 78,8) y PP Contig15_70 (Tm 76,0).

Los resultados confirman la especificidad y utilidad de los marcadores SCAR diseñados para la genotipificación de *R. bunodes* y *R. pepo*, tanto en café como en cultivos asociados. Sin embargo, estos marcadores no permiten la detección de DNA del patógeno en suelos recolectados en lotes con presencia de la enfermedad.

DISCUSIÓN

Diversos reportes destacan el uso de marcadores SCAR como herramienta útil para la detección de patógenos (1, 3). El presente estudio reporta el uso de marcadores SCAR para la detección específica de *R. bunodes* y *R. pepo*, asociados a llagas radicales. La especificidad de dichos marcadores se evaluó en DNA de 30 aislamientos de *Rosellinia* recolectados en diferentes localidades de la región cafetera, tanto en café como en cultivos asociados a éste. El número de aislamientos evaluados estuvo limitado debido a la complejidad de la obtención del patógeno en el laboratorio, a su lento crecimiento en medio y a problemas de contaminación.

La conversión de marcadores polimórficos AFLP a marcadores SCAR, arrojó cuatro combinaciones de marcadores SCAR que permiten discriminar entre especies de *Rosellinia* mediante el uso de la técnica qPCR usando SYBR® Green. Los ensayos realizados demuestran repetidamente que los marcadores diseñados son altamente específicos para la detección de *R. bunodes* y *R. pepo*. La presencia de falsos positivos para las muestras evaluadas puede excluirse, puesto que todas las muestras positivas se recolectaron de campos en los cuales el patógeno había sido plenamente aislado e identificado y todas las muestras mostraron síntomas y signos específicos de llagas radicales.

Uno de los principales inconvenientes al trabajar con agentes intercalantes, es su baja especificidad debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de iniciadores, muy frecuentes en la PCR (5, 17). Sin embargo, en este estudio el uso de SYBR® Green no afectó la calidad de los resultados obtenidos. Se demostró la eficiencia de los

marcadores SCAR en la detección especie-específica y al emplear condiciones de reacción óptimas se disminuyó el riesgo de formación de dímeros.

De igual forma, la especificidad de dichos marcadores se corroboró al evaluar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del DNA de la molécula está desnaturalizado). La curva de Melting de un producto es dependiente de su contenido GC, longitud y secuencia, lo cual permite su utilización en la identificación de los productos de PCR. El análisis de los picos Melting ofrece un método de diferenciación de productos completamente integrado con PCR. Similar al tamaño por electroforesis en gel, el análisis de los picos Melting puede ser usado para identificar productos amplificados (17). Dicho análisis determinó que cuatro combinaciones de marcadores SCAR arrojaron picos únicos de amplificación. Las combinaciones PP Contig9_104 y PP Contig12_121 resultaron en picos únicos para *R. pepo* (T_m de 76,6 y 78,8°C, respectivamente), y las combinaciones PP Contig 15_70 y PP Contig15_81 arrojaron picos únicos de amplificación para *R. bunodes* (T_m de 77,4 y 76,0°C, respectivamente). Sin embargo, es necesario analizar detalladamente la especificidad de los mismos, ampliando el rango y número de especies de *Rosellinia* evaluadas.

La sensibilidad de la técnica fue evaluada empleando diferentes concentraciones de inóculo por gramo de suelo. Las concentraciones de inóculo evaluadas para cada especie de *Rosellinia*, variaron según los valores C_t obtenidos en la detección del DNA del patógeno extraído de raíces con síntomas de llaga radical. Se probaron concentraciones altas en *R. pepo* (200, 300, 400 y 600 mg por gramo de suelo) y bajas en *R. bunodes* (25, 50, 100, 200 y 400 mg.g⁻¹ de suelo),

puesto que su detección fue más tardía (C_t promedio 34). Sin embargo, puede concluirse que el límite de detección de la técnica desarrollada en este estudio es de 100 mg de hongo por gramo de suelo. Es importante resaltar que tanto *R. bunodes* como *R. pepo* solo pudieron ser detectadas en suelos infestados artificialmente, pero no en suelos naturales, recolectados en lotes con presencia de la enfermedad.

A pesar de que el método evaluado permitió detectar *R. bunodes* y *R. pepo* en suelos inoculados artificialmente, es posible que la incapacidad de detección en suelos naturales esté ligada a la calidad del DNA extraído. Diversos factores pueden afectar la detección de un microorganismo en suelo usando qPCR. Entre los factores más importantes se resalta la capacidad de unión del DNA a la superficie de las partículas del suelo, lo cual puede influir en la eficiencia de la extracción de DNA (11, 13). Adicionalmente, el efecto de la co-extracción de inhibidores de PCR también es importante en la eficiencia de la amplificación al trabajar con muestras de suelo. La presencia de sustancias húmicas, las cuales son fuertes inhibidores de PCR, posiblemente por que interactúan con la DNA polimerasa o interfieren en la unión de los iniciadores al DNA molde, puede reducir considerablemente el límite de detección (11, 24). En el caso de detección de *R. necatrix* se reporta el uso de iniciadores convencionales y *Scorpion* para la detección en suelo mediante *Scorpion*-PCR anidada (21, 22). Se requieren esfuerzos para el desarrollo de un método de detección cuantitativo con el fin de facilitar estudios para determinar el nivel de inóculo de *Rosellinia* spp. necesario para el desarrollo de la enfermedad.

La meta final de este estudio es ofrecer un análisis rápido, específico y sensible de detección y cuantificación en suelo de

R. bunodes y *R. pepo*. Las herramientas moleculares desarrolladas en este estudio constituyen un importante avance en el conocimiento de la biología del patógeno, su interacción con el hospedante y otros patógenos de café, y su supervivencia en suelo. Este es el primer paso para el desarrollo de un método de diagnóstico del patógeno en raíces y suelo, cuya utilidad en forma temprana, así como en la evaluación de la respuesta de germoplasma de café, que eventualmente pueda mostrar tolerancia o resistencia a dicho patógeno.

LITERATURA CITADA

1. AHONSI, M.O.; LING, Y.; KAGEYAMA, K. Development of SCAR markers and PCR assays for single or simultaneous species-specific detection of *Phytophthora nicotianae* and *Pythium helicoides* in ebb-and-flow irrigated kalanchoe. *Journal of microbiological methods* 83:260-265. 2010.
2. BRIERLEY, J.L.; STEWART, J.A.; LEES, A.K. Quantifying potato pathogen DNA in soil. *Applied soil ecology* 41:234-238. 2009.
3. CORDIER, C.; EDEL H., V.; MARTIN L., F.; BLAL, B.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *Journal of microbiological methods* 68(1):60-68. 2007.
4. FERNÁNDEZ, B.O.; LÓPEZ, D.S. Las llagas radiculares Negra (*Rosellinia bunodes*) y Estrellada (*Rosellinia pepo*) del cafeto: Patogenicidad e influencia de la clase de inóculo en la infección. *Cenicafé* 15(3):126-144. 1964.
5. FILION, M.; ST A., M.; JABAJI H., S.H. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of microbiological methods* 53(1):67-76. 2003.
6. GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: What relevance to plant studies?. *Journal of experimental botany* 55(402):1445-1454. 2004.
7. GOVINDARAJAN, T.S. A review on the incidence of root diseases on coffee and their management. *Journal of coffee research* 18(1):16-28. 1988.
8. GUTIÉRREZ G., R.A.; CASTRO C., B.L.; RIVILLAS O., C.A. Manejo de focos de llagas radicales en cafetales. Chinchiná: Cenicafé, 2004. 8 p. (Avances Técnicos No. 327)
9. HUANG, J.; WU, J.; LI, C.; XIAO, C.; WANG, G. Detection of *Phytophthora nicotianae* in soil with real-time quantitative PCR. *Journal of phytopathology* 158:15-21. 2010.
10. IBARRA, N.L., CASTRO C., B.L., PONCE, C.A. Estudio del proceso infectivo de *Rosellinia bunodes* Berk y Br. Sacc. en café. *Fitopatología colombiana* 23(1/2):59-64. 1999.
11. LI, M.; SENDA, M.; KOMATSU, T.; SUGA, H.; KAGEYAMA, K. Development of real-time PCR technique for the estimation of population density of *Pythium intermedium* in forest soils. *Microbiological research* 165(8):695-705. 2010.
12. MALVICK, D.K.; IMPULLITTI, A.E. Detection and quantification of *Phialophora gregata* in soybean and soil samples with a quantitative, real-time PCR assay. *Plant disease* 91(6):736-742. 2007.
13. MARTIN L., F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J.C.; SOULAS, G.; CATROUX G. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and environmental microbiology* 67(5):2354-2359. 2001.
14. MERCHÁN, V.M. La *Rosellinia* del cacao. *Revista agronomía* 2(1):27-29. 1988.
15. PAULITZ, T.C.; SCHROEDER, K.L. A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. *Plant disease* 89(7):767-772. 2005.
16. REALPE O., C.E.; VILLEGAS G., C.; RIAÑO H., N.M. Aislamiento y caracterización morfológica de *Rosellinia pepo* pat. en plantas de macadamia. *Facultad nacional de agronomía Medellín* 59(2):3509- 3526. 2006.
17. RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 245(2):154-160. 1997.
18. RUANO, R.; SCHENA, L.; IPPOLITO, A.; LÓPEZ, H.J. Comparison of conventional and molecular methods for the detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in south Spain. *Plant pathology* 56(2):251-256. 2007.

19. SACCAS, A.M. Les *Rosellinia* des caféiers en Oubangui-Chari. L'agronomie tropicale 11(5):551-595. 1956.
20. SCHAAD, N.W.,; BERTHIER S., Y.; SECHLER, A.; KNORR, D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real time fluorescence detection system. Plant disease 83(12):1095-1100. 1999.
21. SCHENA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. European journal of plant pathology 108(4):355-366. 2002.
22. SCHENA, L.; IPPOLITO, A. Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soil by real time Scorpion-PCR. Journal of plant pathology 85(1):15-25. 2003.
23. TEN H., G.M.; KRAUSS, U. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*. Crop protection 25(2):89-107. 2006.
24. TSAI, Y.L.; OLSON, B.H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology 58(2):754-757. 1992.
25. GENT P., M.P.E. VAN; KRIJGER, M.; BONANTS, P.J.M. Improved real-time PCR assay for detection of the quarantine potato pathogen, *Synchytrium endobioticum*, in zonal centrifuge extracts from soil and in plant. European journal of plant pathology 126:129-133. 2010.
26. WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C.; BOONHAM, N.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Applied and environmental microbiology 66(7):2853-2858. 2000.