
DETECCIÓN DE *Rhizoctonia solani* EN TEJIDOS DE PAPA MEDIANTE ANTICUERPOS POLICLONALES

Chrystian Carrero, Pablo García-Lugo, Agustina Rojas y Henry Pino

RESUMEN

La papa es un rubro agrícola de relativa importancia económica y social en el área andina venezolana. *Rhizoctonia solani* AG-3 es un fitopatógeno que afecta los rendimientos al causar lesiones considerables en tubérculos, estolones y tallos en el cultivo. El desarrollo de métodos de detección específicos, sencillos y sensibles es determinante para dar una respuesta oportuna al momento de tomar decisiones sobre el control de las

enfermedades. El objetivo de este trabajo fue la obtención de antígenos y el desarrollo de anticuerpos policlonaes a partir de proteínas ancladas a la membrana plasmática, que permitan detectar la presencia de *R. solani* en tubérculos de papa. Los resultados obtenidos demuestran el potencial de la inmunodetección con anticuerpos policlonaes en la identificación de material enfermo y su posible uso en el combate de la enfermedad.

DETECTION OF *Rhizoctonia solani* IN POTATO TISSUES USING POLYCLONAL ANTIBODIES

Chrystian Carrero, Pablo García-Lugo, Agustina Rojas and Henry Pino

SUMMARY

Potato is a relatively important crop for the economic and social development in the Andean region of Venezuela. *Rhizoctonia solani* AG-3 is a plant pathogen that affects yield by causing considerable damage on tubers, stolons and stems in the crop. The development of specific, simple and sensitive detection methods is crucial for a timely response when making

decisions about disease control. The objective of this study was to produce polyclonal antibodies against proteins anchored to the plasma membrane, so as to detect the presence of *R. solani* in potato tubers. The results demonstrate the potential for immunodetection with polyclonal antibodies to identify diseased material.

Introducción

Rhizoctonia solani Kühn [Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] es un fitopatógeno causante de diversas enfermedades en una gran variedad de cultivos. Ha sido objeto de múltiples estudios ecológicos, patológicos, taxonómicos y de control biológico (González-Hernández, 2002). En Venezuela, los métodos de detección e identificación son los utilizados tradicionalmente, que requiere de experiencia con el género

Rhizoctonia, para su ubicación taxonómica dentro de los grupos de anastomosis ya definidos (González *et al.*, 2006). Estudios realizados en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la zona andina venezolana, reportan la presencia de los grupos de anastomosis de *R. solani*, AG-3 y AG-2-1, siendo AG-3 el más importante por su alta frecuencia de aparición en diferentes localidades (Cedeño *et al.*, 2001). El cultivo de la papa es de gran importancia en la zona andina de Venezuela, tanto

por la extensión del área cultivada como por el número de productores que se dedican a este rubro. *R. solani* AG-3 ha sido reportado como el grupo de anastomosis más importante que afecta el cultivo de la papa en diferentes localidades del país (estados Mérida, Táchira y Trujillo). En Maine (EEUU) es la principal causa de rizoctoniosis dentro de cinco grupos de anastomosis diferentes (Bandy, 1988). De igual manera, Ceresini *et al.* (2002) reportaron la presencia de *R. solani* AG-3 en

tubérculos de papa provenientes de Canadá y EEUU (Maine, Minnesota, Nueva York, Dakota del Norte y Wisconsin).

La aplicación de métodos de detección específicos, sencillos y sensibles es determinante para dar una respuesta oportuna al momento de tomar decisiones sobre el control de las enfermedades. Estudios de detección serológica de *R. solani* han sido conducidos para mejorar las posibilidades de éxito y la velocidad de respuesta en las pruebas de diagnóstico.

Palabras clave / Antígenos / Dot Blot / Inmunodetección / Papa / *Rhizoctonia solani* AG-3 / *Solanum tuberosum* /

Recibido: 19/01/2010. Modificado: 13/12/2010. Aceptado: 17/12/2010.

Chrystian Carrero. Ingeniero Agrónomo, Universidad del Zulia, Venezuela. M.Sc. en Manejo de Bosques y Doctor en Biotecnología de Microorganismos Universidad de Los Andes (ULA), Venezuela. Profesor, ULA, Venezuela. Dirección:

Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP). Santa Rosa-La Hechicera, Mérida, Venezuela. Apdo. Postal 77. e-mail: cfcarrer@ula.ve

Pablo García. Licenciado en Biología, ULA, Venezuela. Doctor

en Ciencias Biológicas, Universidad de La Laguna, España. Profesor, ULA, Venezuela.

Agustina Rojas. Licenciada en Biología y Doctorante en Biotecnología de Microorganismos, ULA, Venezuela. Investigadora, ULA, Venezuela.

Henry Pino. Ingeniero Agrónomo, Instituto Politécnico "Santiago Mariño", Venezuela. Auxiliar de Investigación, IIAP-ULA, Venezuela.

RESUMO

A batata é um item agrícola de relativa importância econômica e social na área andina venezuelana. *Rhizoctonia solani* AG-3 é um fitopatógeno que afeta os rendimentos ao causar lesões consideráveis em tubérculos, estolões e hastes no cultivo. O desenvolvimento de métodos de detecção específicos, simples e sensíveis é determinante para dar uma resposta oportuna no momento da tomada de decisões sobre o controle das enfermi-

dades. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de antígenos e o desenvolvimento de anticorpos policlonais a partir de proteínas ancoradas na membrana plasmática, que permitam detectar a presença de *R. solani* em tubérculos de batata. Os resultados obtidos demonstram o potencial da imunodeteção com anticorpos policlonais na identificação de material enfermo e seu possível uso no combate da enfermidade.

Matthew y Brooker (1991) lograron anticuerpos policlonales y monoclonales para *R. solani* AG-8, contra proteínas secretadas al medio de cultivo. Posteriormente se desarrolló un método de detección y cuantificación a través de perlas de vidrio inmuno-magnéticas donde se fijó un anticuerpo monoclonal que enlazaba proteínas de *R. solani* presente en suelo (Thornton, 1996). También se logró la cuantificación de *R. solani* en suelo con anticuerpos monoclonales que reconocían la enzima catecoloxidasa secretada por el hongo (Otten *et al.*, 1997). Finalmente Thornton *et al.* (2004) afinaron la técnica y lograron desarrollar un método inmunocromatográfico de flujo lateral que permite detectar y cuantificar a *R. solani* AG-4 en suelos. Sin embargo, los trabajos no permiten identificar de manera intraespecífica a los grupos de anastomosis de *R. solani*, y generalmente utilizan un pool completo de proteínas para el desarrollo de los anticuerpos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método serológico que permita detectar a *R. solani* causante de rizoctoniosis en papa en Venezuela, utilizando proteínas ancladas a la membrana para la producción de los anticuerpos.

Materiales y Métodos**Aislamiento**

Tubérculos enfermos con síntomas y signos de rizoctoniosis fueron colectados en

las localidades de Mucuchíes y El Valle, estado Mérida, Venezuela. Los tubérculos fueron trasladados al Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes (IIAP-ULA), donde se lavaron con agua corriente. Los esclerosos presentes sobre los tubérculos fueron desprendidos, desinfectados durante 3min con hipoclorito de sodio al 0,5%, lavados tres veces con agua destilada estéril (ADE) y sembrados en placas con medio agua-agar, agar acidificado a pH 4 con ácido láctico, a 25°C. De las colonias emergentes se realizaron transferencias de ápices hifales para la obtención de cultivos puros.

Condición nuclear

En los cultivos obtenidos con características que correspondían al género *Rhizoctonia* se procedió a realizar la cuantificación nuclear en células somáticas distintas a la apical, siguiendo el procedimiento HCl-Giemsa de Rogers (1965).

Pruebas de anastomosis

En placas con medio agua-agar (2%) + PDA Difco (10%) se evaluó la habilidad de los aislamientos para realizar fusión hifal con cultivos-tipo (*testers*). Los *testers* suministrados por el Laboratorio de Fitopatología del IIAP-ULA fueron adquiridos en la American Type Culture Collection, EEUU, y el

Centraalbureau Voor Schimmencultures, Holanda. La afiliación a los grupos de anastomosis se estableció en base a la frecuencia de fusión hifal (Sneh *et al.*, 1991)

Preparación del micelio

Cultivos puros de *R. solani* AG-3 provenientes de Mucuchíes crecieron en total oscuridad y a 25°C durante 28 días en erlenmeyers que contenían medio líquido con dextrosa 2% y pectina 1%. El micelio fue lavado con ADE para eliminar los restos de medio de cultivo, congelado con N₂ líquido y liofilizado para su posterior tratamiento.

Extracción de antígenos

El micelio liofilizado (0,5g) se sometió a ruptura mecánica con perlas de vidrio en condiciones de congelación y utilizando buffer de extracción (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, y 2% Tritón X-114; pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete Roche®). El antígeno se obtuvo usando el método de partición con el detergente Tritón X-114 descrito por Ko y Thompson (1995) y modificado por Añez-Rojas *et al.* (2006), el cual permite separar diferentes biomoléculas unidas a la membrana celular de parásitos, que por su tamaño y constitución (proteínas y carbohidratos) son las de mayor importancia inmunogénica (Añez-Rojas *et al.*, 2006; Costachel *et al.*,

2005). El método permite obtener tres fracciones diferenciadas por su solubilidad en Tritón X-114: proteínas hidrofílicas (F1), proteínas integrales de membrana (F2) y proteínas unidas a la membrana con anclaje del tipo glucosilfosfatidilinositol (F3). Después del tratamiento de ruptura con el buffer de extracción, las muestras fueron colocadas en agitación y frío durante 1h, centrifugadas durante 20min a 8500rpm y el sobrenadante guardado a -20°C durante 24h. El material fue descongelado a temperatura ambiente, sometido a una primera partición a 32°C durante 12min, y centrifugado a 3000rpm. La fase acuosa (F1) fue separada de la fase de detergente y guardada a -20°C. La fase de detergente fue resuspendida en 3 volúmenes de buffer Tritón 0,06% (150mM NaCl, 10mM tris-HCl, 0,06% Tritón X-114; pH 7,4) e incubada a 0°C durante 10min. Se realizó una segunda partición a 32°C, la fase acuosa fue descartada, el lavado fue repetido dos veces. A la fase de detergente se le agregaron 3 volúmenes de buffer Tritón 0,06%, se incubó a 0°C durante 10min y se centrifugó a 10000rpm durante 20min a 0°C, obteniendo un precipitado con la fracción (F2). La fase acuosa fue colocada a 32°C para una última partición. En la fase de detergente, se obtuvo la fracción compuesta por proteínas con anclaje tipo glucosilfosfatidilinositol (F3). Las proteínas

de todas las fracciones fueron precipitadas individualmente agregando tres volúmenes de acetona fría y resuspendidas en buffer muestra (250mM Tris-base, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol; pH 6,8]. Se determinó la cantidad aproximada de proteínas contenidas en las fracciones utilizando el método de Lowry (Bollang y Edelstein, 1991).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las fracciones de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes fueron sometidas a separación electroforética en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 12% (SDS-PAGE), y teñidos con azul de Comassie® R-250 siguiendo el procedimiento de Laemmli (1970). En los hoyos se colocaron 25µg de proteínas de las fracciones para las comparaciones en geles coloreados, y 5µg para las transferencias a membrana. Se utilizaron marcadores de peso molecular sin teñir para las comparaciones en los geles y preteñidos para las transferencias a membranas.

Obtención de anticuerpos

Para obtener anticuerpos se utilizó la fracción F3 aislada de *R. solani* AG-3 proveniente de Mucuchíes. Las inmunizaciones fueron realizadas en 5 conejos, con inyección subcutánea cada 15 días con dosis secuenciales de 80, 50 y 80µg de proteína. El extracto de antígenos fue mezclado con buffer fosfato salino pH 7,3 (PBS) y adyuvante incompleto Freund® 1:1 hasta completar 1ml de suspensión. El suero con los anticuerpos desarrollados fue extraído a los 15 días después de la última inmunización.

Western blot

Después de realizar la electroforesis, las proteínas

fueron transferidas a 110V durante 1h a una membrana de polyvinylidene fluoride (PVDF-Inmobilon P®). La membrana se bloqueó con 0,5% de leche descremada en Tris Buffer Salino (TBS) con 10mM Tris-HCl y 150mM NaCl; pH 8. Los anticuerpos fueron enlazados durante 1h en agitación suave, usando una dilución 1:100 en TBS. Luego de cuatro lavados con TBS, se agregó inmunoglobulina anticonejo/peroxidasa a razón de 1:7500 en TBS durante 30min. El revelado se realizó con 4-cloro-1-naphthol y H₂O₂ (Zeder-Lutz *et al.*, 2006). Se evaluaron proteínas de cuatro aislamientos de *R. solani*: AG-3 aislada a partir de material enfermo naturalmente, y los patrones AG-3 (Anderson P-42), AG-8 (ATCC-76106) y AG-2-1 (ATCC-44658), a los cuales previamente se les realizó la extracción de proteínas según el método descrito. Se evaluó la especificidad de los anticuerpos contra *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*.

Detección en esquejes de papa

Fragmentos de tallos de 6cm de largo de plantas de papa (esquejes), fueron autoclavados a 121°C y 15lbs/pulg² durante 10min. Los esquejes se inocularon sin heridas con discos de 0,5cm de diámetro de agar-agua con micelio de los hongos *R. solani* AG-3 de Mucuchíes, AG-2-1 de El Valle y *Fusarium oxysporum*. La inoculación se hizo en placas de Petri y en condiciones de cámara húmeda (total oscuridad y a 25°C). Como testigo se utilizaron esquejes inoculados con discos de agar-agua. A las 72h se tomaron porciones de 1cm de esqueje invadido por el micelio del hongo y se trataron con buffer de extracción (0,8% NaCl, 0,02KCl, 0,115Na₂HPO₄, 0,02KH₂PO₄, 0,05% Tween 20; pH 8,3

ajustado con NaOH 1M) en frío y con agitación durante 1h. La suspensión se centrifugó a 9000g durante 10min y el sobrenadante fue mezclado con 3 volúmenes de acetona fría durante 2h. Posteriormente se centrifugó a 3500g durante 20min y las proteínas precipitadas fueron suspendidas en buffer muestra y sometidas a SDS-PAGE y Western Blot.

Detección en tubérculos de papa

Treinta y dos muestras de tubérculos con síntomas de rizoconiosis y asintomáticos recolectadas en el páramo de Mucuchíes y en el Valle del estado Mérida fueron tratadas para la detección de *R. solani*. Se tomaron 0,5g del peridermo de las muestras, y se trataron durante 1h con buffer de extracción, en frío y con agitación (Thornton, 1999). La suspensión se centrifugó a 9000g durante 15min, se trató con 3 volúmenes de acetona fría durante 2h, se centrifugó a 3500g durante 20min; las proteínas precipitadas fueron suspendidas en buffer muestra y se sometieron a SDS-PAGE y Western blot.

Dot blot

Las muestras colectadas para las pruebas de detección de *R. solani* en tubérculos de papa fueron sometidas a pruebas inmunológicas utilizando un equipo Dot blot (Bio-Rad®). Para ello la membrana de Inmobilon P fue hidratada 5min con alcohol metílico y buffer de transferencia respectivamente (Zeder-Lutz, 2006), y las muestras (5µl) fueron colocadas mediante succión. Posteriormente se procedió al bloqueo de la membrana durante 1h con leche descremada al 5% en PBS, durante 45min se enlazaron los anticuerpos diluidos a razón de 1:100 en PBS, y la membrana fue lavada 3 veces durante 5min con PBS. El anticuerpo secundario fue dilui-

do a razón de 1:7500 en PBS, dejándolo reaccionar durante 30min y se lavó tres veces con PBS. Finalmente se reveló con 4-cloronaftol y H₂O₂ (Zeder-Lutz, 2006).

Resultados

Aislamiento

Se recolectaron 21 muestras de papa contaminada naturalmente. De los esclerocios presentes sobre los tubérculos se obtuvieron 67 cultivos puros con características similares al género *Rhizoctonia*, de los que 53 provenían de Mucuchíes y 14 de El Valle. Entre las características morfológicas destacables se observaron: hifas con pigmentación marrón, ramificación cerca del septo distal, constricción hifal y formación de un septo a corta distancia del punto de ramificación de la hifa, diámetro de las hifas superior a 5µm, presencia de septo doliporo y formación de esclerocios en aislamientos con más de dos semanas de edad.

Condición nuclear

Las pruebas permitieron separar los cultivos en binucleados (*Ceratobasidium*) y multinucleados (*R. solani*). Sólo dos aislamientos obtenidos de muestras provenientes de Mucuchíes fueron binucleados, y el resto (65) presentó varios núcleos por célula al ser teñidos con la técnica de Giemsa. Los aislamientos correspondientes a *R. solani* promediaron 9 núcleos (5-11) por célula somática.

Pruebas de anastomosis

Las pruebas de anastomosis evidenciaron que de los 65 aislamientos de *R. solani*, 16 (24,62%) pertenecían al grupo de anastomosis AG-2-1 y 49 (75,38%) al AG-3. Dos de aislamientos (4%) de las muestras colectadas en la población de Mucuchíes fueron AG-2-1 y 51 (96%) AG-

3. Todos los aislamientos obtenidos de muestras provenientes de El Valle fueron AG-2-1. El porcentaje promedio de fusión hifal para los aislados de AG-2-1 fue de 48% (27-67%) y para AG-3 de 55% (32-61%). Para las pruebas de extracción y purificación del antígeno fue utilizado el aislado de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes con mayor frecuencia de fusión hifal (62%).

Extracción de los antígenos

La extracción de 0,1g de micelio en peso seco (liofilizado) permitió obtener 12,8mg de proteínas. Después del proceso de separación se obtuvieron tres fracciones, identificadas como proteínas hidrofílicas (F1), con rendimiento aproximado de 6mg, proteínas integrales de membrana (F2) con 0,92mg y proteínas con anclaje a la membrana (F3) con 0,44mg.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

En la Figura 1 se muestra el patrón de corrida para las fracciones F1, F2 y F3 extraídas del micelio de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes. Para el caso de las F3 (carril 4), que representaban las proteínas de interés inmunológico en este trabajo, se observan bandas principalmente entre los 30 y 75kDa.

Al comparar en SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie el patrón de distribución de las proteínas

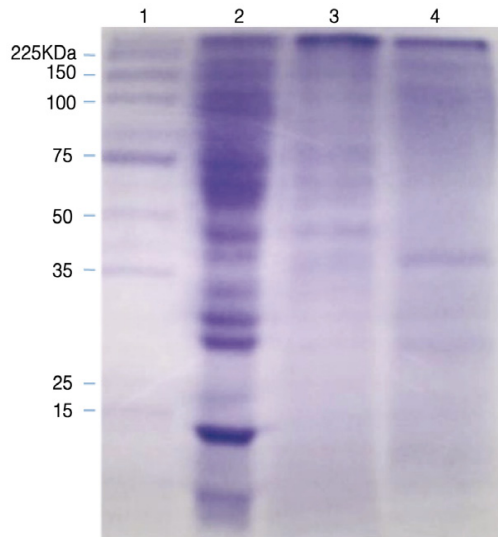


Figura 1. Patrón de migración de las fracciones extraídas de micelio liofilizado de *R. solani* AG-3 aislado en Mucuchíes: Marcadores de peso molecular (1), proteínas citoplasmáticas F1 (2), proteínas integrales de membrana F2 (3) y proteínas con anclaje a la membrana F3 (4). Gel de poliacrilamida 12%, teñido con azul de Coomassie.

en las fracciones F1, F2 y F3 de los grupos de anastomosis *R. solani* AG-3 de Mucuchíes, AG-2-1 El Valle y AG-8 (ATCC-76106), se aprecia que las proteínas presentes en la fracción F3 para los diferentes grupos de anastomosis, se encontraron distribuidas entre los 30 y 75kDa (Figura 2).

Western blot

Las pruebas de Western blot permitieron comprobar la es-

pecificidad de los anticuerpos para la detección de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes. Al enlazar los anticuerpos a las proteínas de la fracción F3 de *R. solani* de AG-3 de Mucuchíes y a las de las F3 de los patrones ATCC de *R. solani*: AG-3, AG-8 y AG-2-1 (Figura 3) se observó que los anticuerpos no fueron específicos para la detección del grupo AG-3. Las proteínas que mostraron mayor antigenicidad y que permitieron la detección para todos los grupos de anastomosis evaluados por Western blot, se observaron entre los 30 y 65kDa. El tiempo para la reacción del revelado fue inmediato,

lo que sugiere alta sensibilidad del método de detección.

En la Figura 4 se comprueba la especificidad en el reconocimiento de *R. solani* contra otros hongos. Los anticuerpos no reaccionaron con los extractos de proteínas de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* (carriles 2, 3 y 5, respectivamente), mientras que se observa reacción al ser enlazados con proteínas de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes (carril 4).

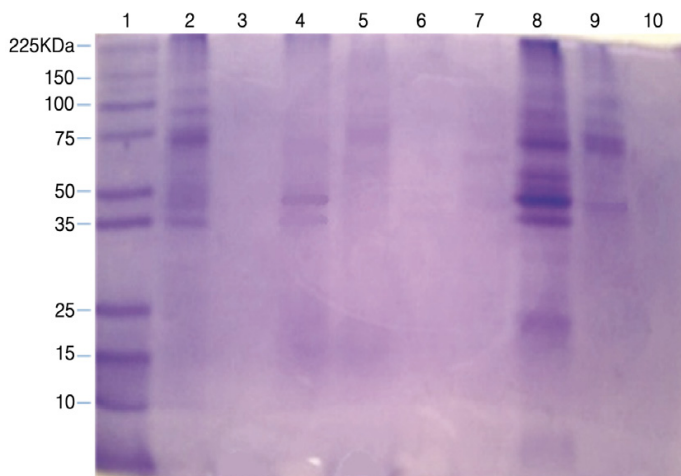


Figura 2. Comparación del patrón de las fracciones de diferentes AG,s de *R. solani*. Marcadores de peso molecular (1), *R. solani* AG-3 de Mucuchíes: F1 (2), F2 (3) y F3 (4); *R. solani* AG-2-1 El Valle: F1 (5), F2 (6) y F3 (7) y *R. solani* AG-8 (ATCC-76106): F1 (8), F2 (9) y F3 (10). Gel de poliacrilamida 12 % teñido con azul de Coomassie.

Detección en esquejes de papa

A los 3 días desde la inoculación los hongos habían invadido los esquejes casi en su totalidad, y presentaban consistencia flácida y acuosa. Después de realizar el corte de las muestras y la extracción de las proteínas, se observó mediante Western blot (Figura 5) que el método de extracción y detección de los antígenos era posible sobre tejido fresco y que los esquejes sin inóculo (control negativo) y los infectados con *F. oxysporum* no mostraron ninguna reactividad. Por el contrario, las muestras inoculadas con micelio de *R. solani* AG-2-1 El Valle y *R. solani* AG-3 Mucuchíes resultaron positivas.

Detección en tubérculos de papa

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos con algunas de las muestras evaluadas. Se detectó una marcada reactividad con la banda de 34kDa. En el carril 3, se colocó una muestra de papa sana obtenida en hidroponía, y en el carril 10 se aprecia menor sensibilidad cuando se procesa material obtenido de chancro en el tallo producido por *R. solani*.

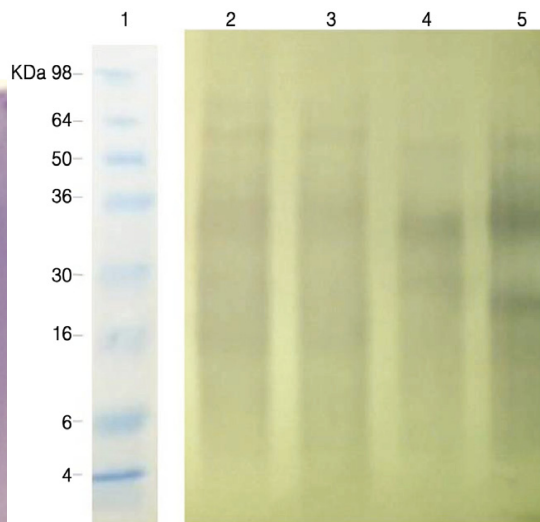


Figura 3. Western blot. Reacción inmunológica de la fracción F3 de *R. solani* de diferentes grupos de anastomosis. AG-3 de Mucuchíes (2), patrones ATCC: AG-3 (3), AG-8 (4); AG-2-1 El Valle (5). Marcadores de masa molecular (1).

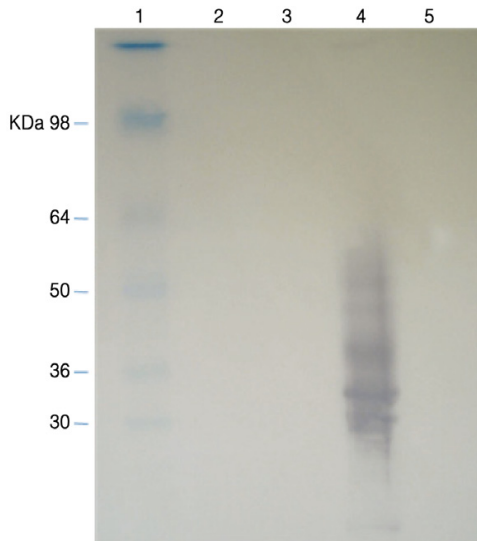


Figura 4. Western blot. Especificidad de los anticuerpos a moléculas extraídas de *R. solani*. Marcadores de peso molecular (1), *Fusarium Oxysporum* (2), *Colletotrichum gloeosporioides* (3), *R. solani* AG-3 de Mucuchíes (4) y *Botrytis cinerea* (5).

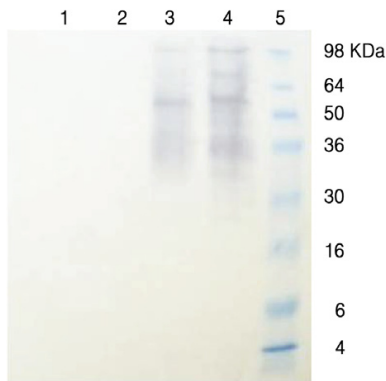


Figura 5. Detección de *R. solani* en pruebas sobre esquejes con Western blot. Esquejes testigos, moléculas de tejido de papa (1), esquejes inoculados con *Fusarium oxysporum* (2), esquejes inoculados con *R. solani* AG-2-1 El Valle (3), esquejes inoculados con *R. solani* AG-3 de Mucuchíes. de *R. solani* AG-3 (4). Marcadores de masa molecular (5).

Dot blot

La estandarización de las pruebas con Dot blot permitió mejorar el diagnóstico, disminuir los costos y posibilitar la evaluación de un mayor número de muestras. Uno de los problemas observados es que si la prueba da positiva, no es posible saber con certeza si el organismo presente es *R. solani* AG-3 o *R. solani* AG-2-1, ya que los anticuerpos se enlazan a ambos grupos de anastomosis. En la Figura 7 se pueden

apreciar resultados de Dot blot, en 1A se encuentra la muestra de papa sana (control negativo) y los controles positivos en 2A y 3A (F3 de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes y *R. solani* AG-2-1 El Valle, respectivamente). El resto son representantes de las extracciones obtenidas en el muestreo para la detección en los tubérculos, donde las numeradas como 1 (4A), 5 (1B), 12 (6B) y 18 (6C) dieron negativas

para la prueba de Dot blot y para las pruebas de aislamientos, estas provenían de tubérculos asintomáticos. Los resultados obtenidos en Dot blot coincidieron 100% con los de Western blot.

Discusión

La tendencia de distribución en campo de los aislados de *R. solani* AG-3 y AG-2-1 es similar a la obtenida por Cedeño *et al.* (2001), encontrándose los representantes del grupo AG-3 en la localidad de Mucuchíes

y los de AG-2-1 en El Valle y Mucuchíes. Sin embargo, AG-2-1 registró menor porcentaje de incidencia (3,77%) que AG-3 (96,23%) en Mucuchíes. Aún cuando no se midió severidad, el estudio demuestra la importancia que tiene AG-3 sobre AG-2-1 al presentarse en el 65,38% de los casos estudiados.

El método de extracción y separación de fracciones proteicas utilizado en este trabajo, para la extracción de proteínas unidas a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI), permitió a Añez-Rojas *et al.* (2006) el desarrollo de anticuerpos específicos para diferenciar *Trypanosoma rangeli* y *T. cruzi*.

Al comparar los grupos de anastomosis en los geles SDS-PAGE, se aprecian diferencias en el patrón de distribución de las bandas. Sin embargo, los

den a proteínas que no revisiten importancia en el desarrollo de los anticuerpos. De igual manera se puede concluir que los anticuerpos no son específicos en la detección dentro de los grupos de anastomosis, y que los mismos reaccionan por igual a los representantes de los grupos de *R. solani* estudiados (AG-3, AG-2-1 y AG-8); sin embargo, al comparar la reactividad con otras especies (*Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*), se concluye

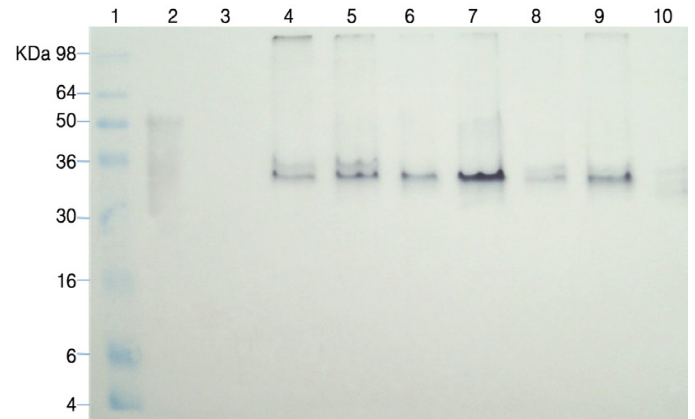


Figura 6. Western blot. Detección de *R. solani* en tubérculos de papa contaminados naturalmente. Marcadores de peso molecular (1), F3 de Ag-3 de Mucuchíes (control +) (2), Tubérculo sano (control -) (3), muestras de campo de tubérculo sintomático del cultivar R-12 en Macanao (4), TAV Única en Mucuchíes (5), TAV Granola en Mitibibú (6), TAV Granola en El Teján (7). TAV Andinita en El Valle (8), TAV Granola en Mistique (9) y cáncer de tallo en el cultivar R-12 en Macanao (10). TAV: tubérculo asintomático de la variedad.

Western blot no permiten identificar a los grupos de *R. solani* evaluados. Esto es un indicador de que las diferencias apreciadas en los geles respon-

den a proteínas que no revisiten importancia en el desarrollo de los anticuerpos. De igual manera se puede concluir que los anticuerpos no son específicos en la detección dentro de los grupos de anastomosis, y que los mismos reaccionan por igual a los representantes de los grupos de *R. solani* estudiados (AG-3, AG-2-1 y AG-8); sin embargo, al comparar la reactividad con otras especies (*Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*), se concluye

que la inmunodetección es específica para *R. solani*. La detección de cantidades mínimas (500ng) del antígeno y el corto tiempo para observar los resultados en el revelado del Western blot y el Dot blot, permiten intuir sobre la alta sensibilidad del método. Resultados similares consiguieron Thornton *et al.* (2004) al realizar pruebas de inmunodetección con anticuerpos monoclonales para la identificación de *R. solani* AG-4, cuyos anticuerpos también reaccionaron con los grupos AG 1, 2-1, 2-3, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y AG-BI.

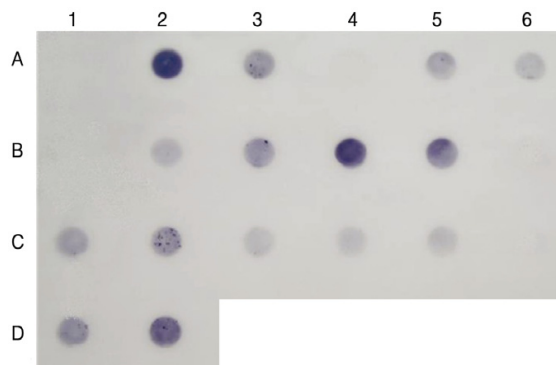


Figura 7. Dot blot. Evaluación rápida de muestras contaminadas naturalmente. Tubérculo sano (1A), F3 de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes (2A), F3 de *R. solani* Ag-2-1 El Valle (3A), y muestras número 1 (4A), 2 (5A), 4 (6A), 5 (1B), 6 (2B), 7 (3B), 9 (4B), 11 (5B), 12 (6B), 13 (1C), 14 (2C), 15 (3C), 16 (4C), 17 (5C), 18 (6C), 20 (1D), y 21 (2D).

La evaluación de los anticuerpos en la detección de *R. solani* AG-3 de Mucuchíes en esquejes de papa permitió comprobar la eficiencia del método en condiciones controladas. Fue un paso importante para establecer el procedimiento de detección en tubérculos contaminados naturalmente y las pruebas de diagnóstico rápido (Dot blot).

De las bandas precipitadas en los diferentes Western blot en condiciones controladas, sólo la de 34kDa se observa en las pruebas de detección en tubérculos contaminados naturalmente, lo que permite definir como la banda (proteína) más importante al momento de realizar los estudios inmunológicos con *R. solani*. La resolución de la prueba disminuye al utilizar material enfermo del tallo con síntomas de cancro. La prueba rápida de detección (Dot blot) permite realizar el diagnóstico de manera rápida, y económica; la misma arrojó similares resultados que el Western blot y puede ser llevada a cabo en condiciones mínimas de equipamiento. Otra ventaja del diagnóstico con el Dot blot es el mayor número de muestras que puede ser procesado en cada prueba.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial

que tiene el desarrollo de estudios inmunológicos y la aplicabilidad de las pruebas para la detección de patógenos de plantas en Venezuela, especialmente para aquellos organismos de crecimiento limitado en medios de cultivo o cuando se requieren respuestas rápidas para la toma de decisiones en las medidas de control.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por Nestor Áñez y el equipo de trabajo del Laboratorio de parasitología "J.F. Torrealba", ULA, Venezuela.

REFERENCIAS

Áñez-Rojas N, García-Lugo P, Crisante G, Rojas A, Áñez N (2006) Isolation, Purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 97: 140-145.

Bandy BP, Leach S, Tavantzis SM (1988) Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. *Plant Dis.* 72: 596-598.

Bollang DM, Edelstein SJ (1991) *Proteins Methods*. Wiley. Nueva York, EEUU. 230 pp.

Cedeño L, Carrero C, Quintero Q, Araujo Y, Pino H, García R (2001) Identificación y

virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* 26: 296-300.

Ceresini P, Shew D, Vilgalys R, Rosewich GL, Cubeta MA (2002) Detecting migrants in populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3 potato in North Carolina using multilocus genotype probabilities. *Phytopathology* 93: 610-615.

Costachel C, Coddeville B, Latgé J, Fontaine T (2005) Glycosylphosphatidylinositol-anchored fungal polysaccharide in *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 10: 835-842.

González D, Cubeta MA, Vilgalys R (2006) Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and β -tubulin sequence from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 459-470.

González-Hernández D (2002) Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 200-205.

Ko Y, Thompson G (1995) Purification of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins by modified triton x-114 partitioning and preparative gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 224: 166-172.

Matthew JS, Brooker JD (1991) The isolation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies to anastomosis group 8 of *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathol.* 40: 67-77.

Otten W, Gilligan CA, Thornton CR (1997) Quantifica-

tion of fungal antigens in soil with a monoclonal antibody-based ELISA: analysis and reduction of soil-specific bias. *Phytopathology* 87: 730-736.

Rogers JD (1965) The conidial state of *Coniochaeta lignaria*: morphology and cytology. *Mycologia* 57: 368-378.

Sneh B, Burpee L, Ogoshi A (1991) *Identification of Rhizoctonia solani*. American Phytopathological Society. St. Paul, MN, EEUU. 133 pp.

Thornton CR (1996) Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* in soil by monoclonal antibody-based immuno-magnetic bead assay. *Soil Biol. Biochem.* 28: 527-532.

Thornton CR, O'Neill TM, Hilton G, Gilligan CA (1999) Detection and recovery of *Rhizoctonia solani* in naturally infested glasshouse soils using a combined baiting, double monoclonal antibody ELISA. *Plant Pathol.* 48: 627-634.

Thornton CR, Groenhof AC, Forrest R, 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.

Zeder-Lutz G, Cherouati N, Reinhardt C, Pattus F, Wagner R (2006) Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 50: 118-127.