



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES TECNOLÓGICAS



Divulgación Científica

Desarrollo de técnicas y protocolos de Microbiología Clásica y Molecular aplicados en Fitopatología

Jazmín Yerutí Mongelós Franco
Instituto de Agricultura Sostenible IAS
Córdoba – España

2017



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE
AGRICULTURA
SOSTENIBLE

IAS



Introducción

- IAS – CSIC: centro de investigación agraria fundado en 1992
- Compatibilizar la producción con la conservación de los recursos naturales y protección medioambiental
- 202 personas, 36 investigadores
- Departamentos: Agronomía, Mejora Genética Vegetal, Protección de Cultivos



Departamento de Protección de Cultivos

Líneas de investigación:

- Agroecología de malezas
- Teledetección aplicada a la agricultura de precisión
- Fitopatología de sistemas agrícolas sostenibles
- Etiología y control de enfermedades de los cultivos
 - ➡ Biotecnología y bases moleculares de las interacciones planta - microorganismo
 - ➡ Diversidad genética y patogénica de poblaciones de patógenos y su detección en planta y suelo
 - ➡ Control integrado de enfermedades de cultivos mediterráneos

Grupo de Investigación

Enfermedades de Cultivos Extensivos

- Verticilosis del olivo: *Verticillium dahliae* Kleb.
- Fusariosis del clavel y de cultivos hortícolas: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*
- Mildiu del girasol: *Plasmopara halstedii*
- Podredumbre de raíz del aguacate: *Rosellinia necatrix*
- Marchitez tardía del maíz: *Cephalosporium maydis*

Etiología

Biocontrol

Resistencia
genética

Objetivos

GENERAL

- Conocer las técnicas y protocolos utilizados en el IAS para el estudio de enfermedades de los cultivos

ESPECÍFICOS

- Aislación de hongos del suelo, caracterización morfológica y molecular, ensayos de resistencia genética

Actividades desarrolladas

1. Inoculación de semillas de girasol con *Plasmopara halstedii* para ensayos de resistencia varietal

- Mildiu del girasol: enfermedad local y sistémica
- Patógeno obligado, mantenimiento en hospederos vivos
- Colección de cepas desde 2008



Actividades desarrolladas

1. Inoculación de semillas de girasol con *Plasmopara halstedii* para ensayos de resistencia varietal



Triple lavado
de semillas



Germinación
en blotter test



Inoculación
5 horas



Siembra en
vermiculita



- Evaluación: incidencia, % plántulas con signos de enfermedad

Actividades desarrolladas

2. Extracción de ADN de micelio liofilizado de *Verticillium dahliae*



- Marchitez vascular en diversos cultivos
- Olivo, girasol, ornamentales, hortícolas
- Gran variabilidad genética y patogénica
- Estudios de caracterización morfológica y molecular
- i-genomic Plant DNA Extraction Mini Kit

Actividades desarrolladas

2. Extracción de ADN de micelio liofilizado de *Verticillium dahliae*

Preparar la muestra liofilizada



Cultivo puro en papel celofán



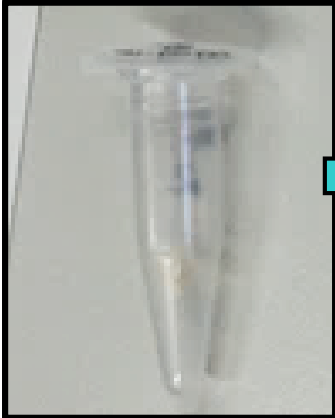
Incubación 7 días 24°C



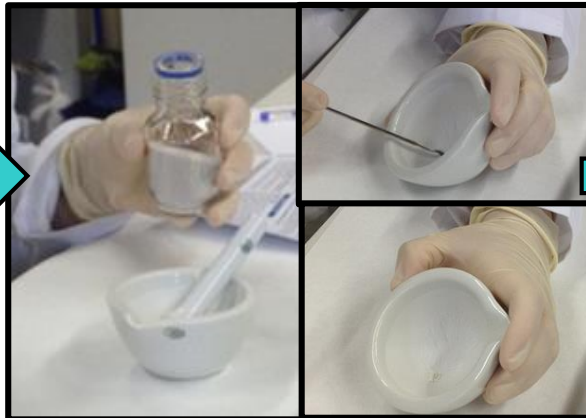
Raspado del micelio



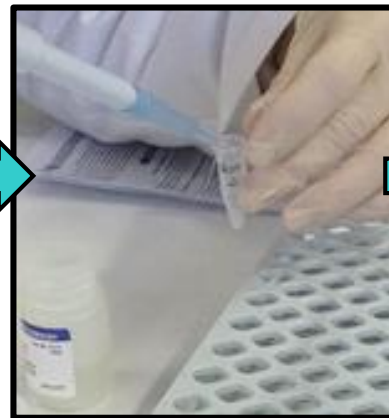
Liofilizador



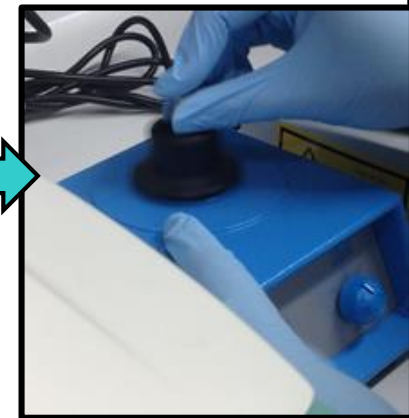
Pesar 5 mg



Moler arena de cuarzo
Transferir a tubo 1,5 ml



390 μ l buffer PG
7 μ l potenciador
20 μ l proteinasa K
5 μ l ARNasa

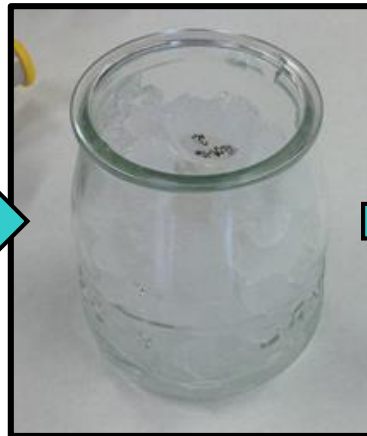


Vortex

Actividades desarrolladas

2. Extracción de ADN de micelio liofilizado de *Verticillium dahliae*

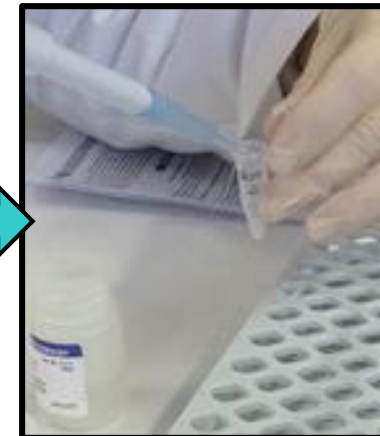
Incubación
65°C 30 min.
100 µl buffer PPT



Incubación
Hielo 5 min.



Centrifuga 5 min.
13.000 rpm



200 µl sobrenadante



Tubo 2 ml
650 µl buffer PB
Pipetear



700 µl buffer PWA
Centrifuga 1 min.
13.000 rpm



700 µl buffer PWA
Centrifuga 1 min.
13.000 rpm



200 µl mezcla
Centrifuga 1 min.
13.000 rpm



650 µl mezcla
Centrifuga 1 min.
13.000 rpm

Actividades desarrolladas

3. Aislamiento de *Cephalosporium maydis* a diferentes alturas de la planta

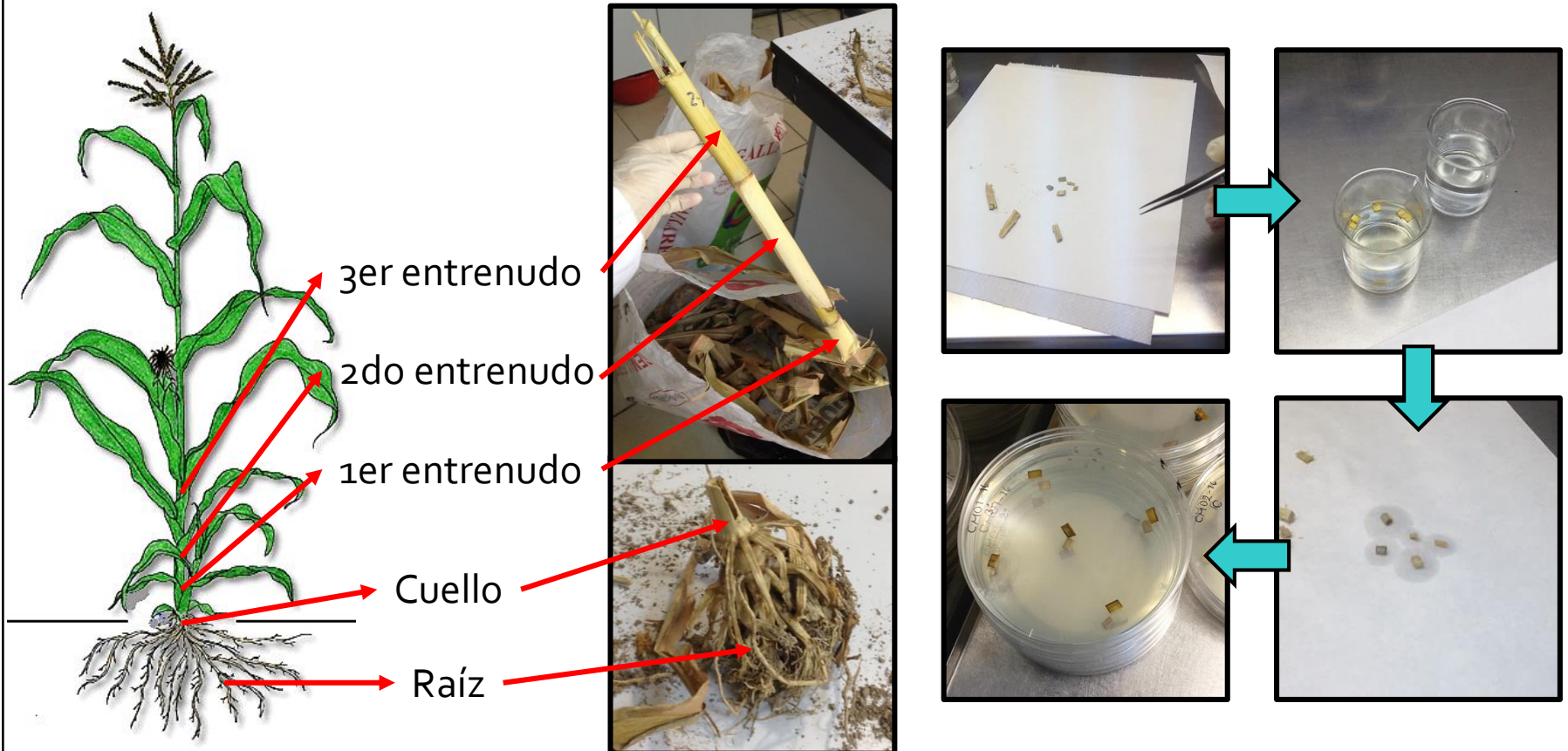


- Marchitez tardía del maíz, enfermedad vascular
- *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*
- Estudio previo a ensayos de caracterización

Actividades desarrolladas

3. Aislamiento de *Cephalosporium maydis* a diferentes alturas de la planta

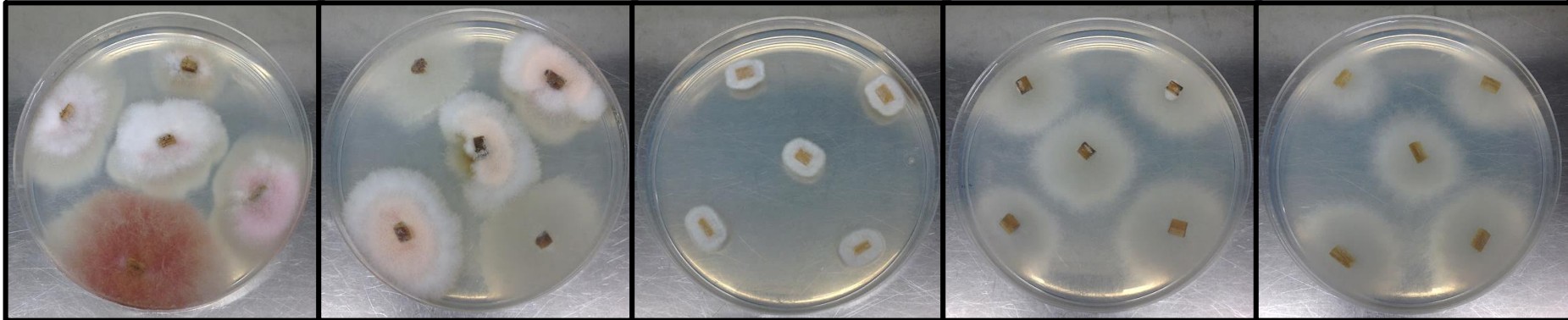
- Aislamiento a 5 alturas de la planta:



Actividades desarrolladas

3. Aislamiento de *Cephalosporium maydis* a diferentes alturas de la planta

- Resultados



Raíz

Cuello

1er entrenudo

2do entrenudo

3er entrenudo

- A mayor altura de la planta, aislado más limpio
- 11er Congreso Internacional en Biotecnología Vegetal y Agricultura. Cayo Guillermo, Cuba. Mayo 2017

Actividades desarrolladas

4. Crecimiento y esporulación de 4 aislados de *Cephalosporium maydis* en diferentes medios de cultivo

Papa Dextrosa Agar	Corn Meal Agar	Agua Remojo Maíz
Solo	Solo	Solo
PDA + ácido láctico 85% 10 µl/l	CMA + ácido láctico 85% 10 µl/l	ARM + ácido láctico 85% 10 µl/l
PDA + tetraciclina 20 mg/l	CMA + tetraciclina 20 mg/l	-
PDA + tetraciclina 30 mg/l	CMA + tetraciclina 30 mg/l	-
PDA + tetraciclina 40 mg/l	CMA + tetraciclina 40 mg/l	-

Actividades desarrolladas

4. Crecimiento y esporulación de 4 aislados de *Cephalosporium maydis* en diferentes medios de cultivo

- Diseño completamente al azar con arreglo factorial
- 48 tratamientos: 4 aislados x 12 medios de cultivo
- 5 repeticiones x tratamiento: 240 UE (placas de Petri)
- Variables evaluadas:
 - ➔ Velocidad de crecimiento cm/día
 - ➔ Esporulación n° conidios/ml
- Análisis de Varianza, Regresión Lineal Simple

Actividades desarrolladas

4. Crecimiento y esporulación de 4 aislados de *Cephalosporium maydis* en diferentes medios de cultivo

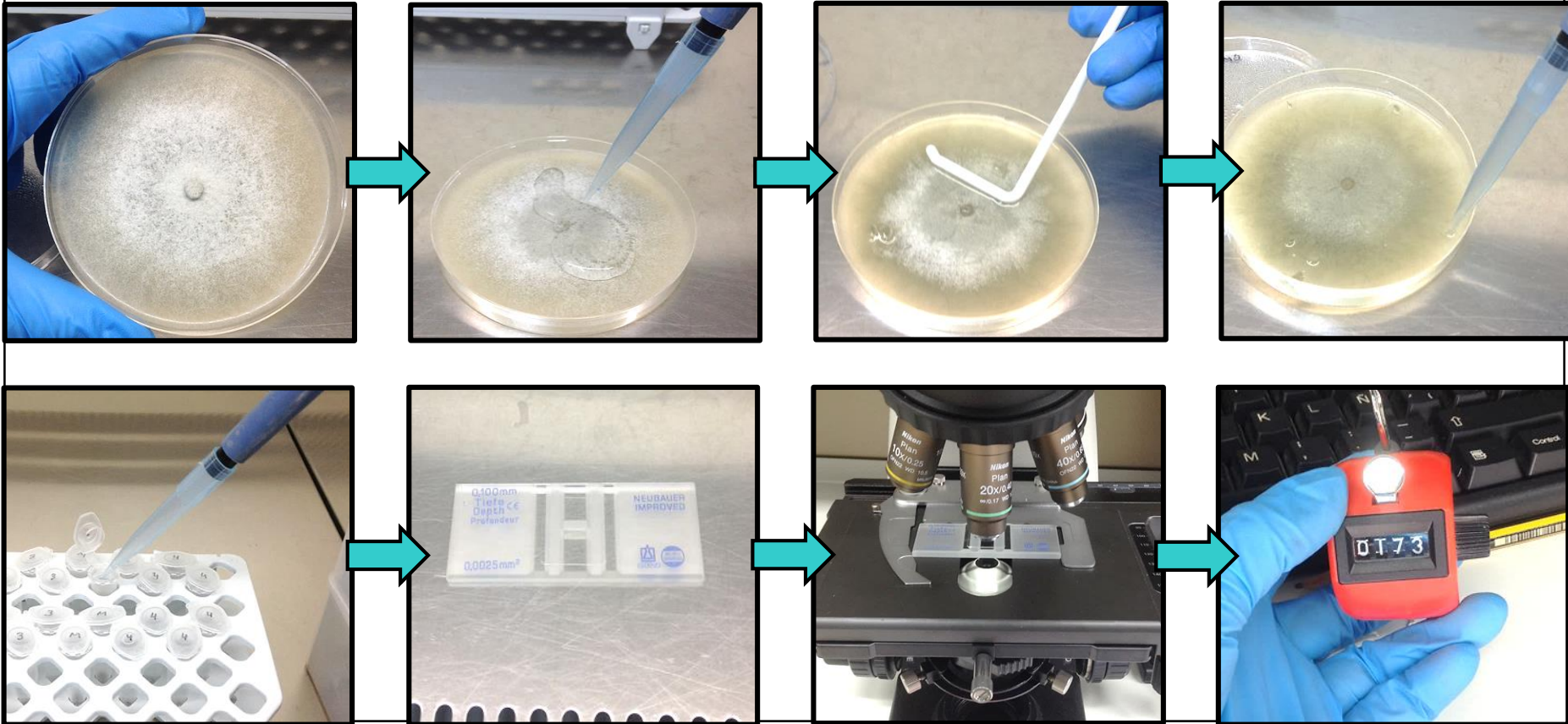
- Crecimiento



Actividades desarrolladas

4. Crecimiento y esporulación de 4 aislados de *Cephalosporium maydis* en diferentes medios de cultivo

- Esporulación



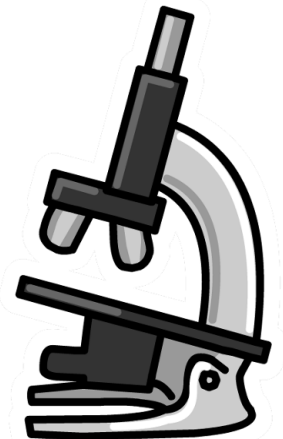
Actividades desarrolladas

4. Crecimiento y esporulación de 4 aislados de *Cephalosporium maydis* en diferentes medios de cultivo

- Crecimiento: 3 veces por semana, hasta el llenado de la placa
- Esporulación: una vez finalizado el crecimiento, placas en luz 4 días
- Resultados: diferencias entre aislados, entre medios de cultivo y en la interacción
- 15th *Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Córdoba, España. Junio 2017

Conclusiones

- Nuevas técnicas aplicables a trabajos de investigación
- Mejora de la eficiencia de los protocolos ya conocidos
- Se cumplieron todos los objetivos propuestos



Agradecimientos

- CEMIT – DGICT – UNA
- CONACyT
- PROCIENCIA

¡MUCHAS GRACIAS!

