

RESUMEN

Marchitez del girasol por *Verticillium dahliae*: detección y cuantificación de inóculo en suelo, invasión en genotipos comerciales y variabilidad del patógeno en Argentina

El abigarrado de la hoja y marchitez del girasol causados por *Verticillium dahliae* constituyen una seria limitante para el cultivo de girasol a nivel mundial. Argentina es uno de los principales productores de girasol en el mundo y el abigarrado de la hoja y marchitez por *V. dahliae* es la enfermedad más importante del girasol en este país. En esta tesis:

Se desarrolló un método de detección y cuantificación de *V. dahliae* en suelos del sur de la provincia de Buenos Aires (Argentina) por PCR anidada cuantitativa. Se optimizaron protocolos de: 1- extracción de ADN desde suelo, 2- uso de los iniciadores reportados por la bibliografía para detectar cepas locales de *V. dahliae* aisladas de girasol, 3- detección y cuantificación de ADN de *V. dahliae* en suelo. Se analizó además la sensibilidad de detección de ADN de *V. dahliae* mediante la técnica de PCR anidada. Fue posible detectar ADN de *V. dahliae* presente en el suelo a través de reacciones de PCR anidadas que combinan mayor rapidez, confiabilidad y sensibilidad respecto de la determinación de inóculo en suelo por siembra en medio de cultivo. Reacciones de PCR en suelos con cantidades conocidas de inóculo (cuantificados por métodos de recuento en medio de cultivo) permiten establecer la relación entre inóculo de *V. dahliae* e intensidad de reacciones de PCR. Al no contar con fragmentos de ADN competidor, el ADN de *V. dahliae* agregado a la muestra permite: 1) verificar que no se producen interferencias durante la reacción, porque aún en ausencia de inóculo en la muestra el ADN agregado debe rendir la banda específica de *V. dahliae*; 2) detectar interferencias en los resultados, pues comprueba que el inóculo agregado es detectado en las condiciones de interferencia que cada suelo posee para la cuantificación de inóculo inicial y aplicar herramientas que minimicen ese problema (p.e. dilución de muestra); 3) estimar la cantidad original de inóculo de cada suelo analizando diferencias de densidad de bandas de los productos de PCR del suelo original y el suelo enmendado.

Se caracterizó la invasión de *V. dahliae* en híbridos de girasol mediante la técnica DAS-ELISA. Se describen las etapas de puesta a punto de la técnica DAS-ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para detectar y cuantificar la invasión de *V. dahliae*. Se compara esta técnica de medición de invasión con la de observación a ojo desnudo de médulas de girasol de plantas senescentes y se analiza un conjunto de híbridos de girasol en diferentes ambientes aplicando la

técnica DAS-ELISA para describir resistencias y tolerancias frente al marchitamiento por *V. dahliae*. La estimación de la invasión de *V. dahliae* en tallos de girasol según ELISA brinda mayor ajuste con intensidad de enfermedad que la densidad de microesclerocios en el tallo estimada a ojo desnudo. El comportamiento de híbridos de girasol frente al marchitamiento causado por *V. dahliae* puede ser caracterizado por la evaluación de invasión a través de la técnica DAS-ELISA.

iii) Se estudió la patogenicidad de aislamientos de *V. dahliae* de diferentes localidades del área productora de la Argentina usando líneas diferenciales endocriadas y se presenta una distribución preliminar de las variantes del patógeno en el área productora argentina. Fueron reconocidas dos nuevas variantes de patogenicidad de *V. dahliae* (razas) causando abigarrado de la hoja y marchitez del girasol en Argentina. Las líneas endocriadas ADV29 y ADV53 permitieron diferenciar dos patrones de patogenicidad en aislamientos de comprobada patogenicidad, un grupo de aislamientos que afectó a ambas líneas, postulado como raza *V. dahliae* VArg3, y otro grupo que no causó enfermedad en los mismos genotipos, descripto como raza *V. dahliae* VArg4. Las razas VArg3 y VArg4 aún no han podido distinguirse entre sí con genotipos diferenciales de girasol que muestren patrones de patogenicidad cruzados, pero los actuales patrones de patogenicidad de estas razas podrían ser considerados marcadores fenotípicos útiles para identificarlas. Se esbozó un mapa preliminar de la distribución de las cuatro razas de *V. dahliae* actualmente reportadas como patógenas del girasol en la provincia de Buenos Aires, Argentina.