



Desarrollo de un método pre-analítico para la detección del perfil toxigénico *in planta* en la gramínea tóxica *Festuca argentina*.

Zabaleta, Gabriela ^{1, 2}; El Mujtar, Verónica A. ³; Mc Cargo, Patricia D. ^{4, 5}; Iannone, Leopoldo J. ^{4, 5}; Martínez, Agustín ¹

¹GSA, INTA EEA Bariloche; ²CONICET; ³InMiBo-CONICET-UBA; ⁴Laboratorio de Micología, DBBE, FCEN, UBA. ⁵IFAB, INTA-CONICET, EEA Bariloche



Introducción

El consumo de la gramínea *Festuca argentina* asociada a endofitos fúngicos *Epichloë* causa un síndrome tremorgénico en el ganado llamado **Mal de Huevo**. En la interacción, el hongo sintetiza **indol-diterpenos (IDTs)**. Mediante técnicas moleculares se puede predecir el potencial toxigénico del endófito asociado a la pastura. Sin embargo, un requerimiento es que se realice a partir de muestras de ADN fúngico con concentraciones conocidas, para esto se debe aislar al hongo y realizar la extracción de ADN. Recientemente, hemos detectado que el endófito de *F. argentina* es aislable solo en 2 de 8 poblaciones analizadas (detección microscópica positiva del endófito).

Por lo cual, el objetivo del trabajo es describir un método que permita cuantificar la concentración de ADN fúngico presente en muestras *in planta*, con el fin de detectar el perfil toxigénico del pastizal.

Resultados

1. Cuantificación del ADN fúngico

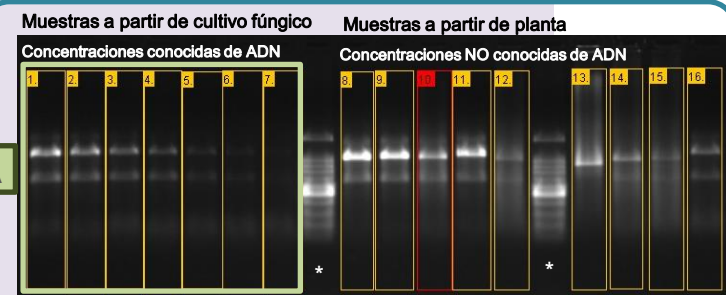


Figura A. Revelado en gel de agarosa. * marcador de peso molecular. Calle destacada en rojo es la que se muestra en la figura C a modo de ejemplo.

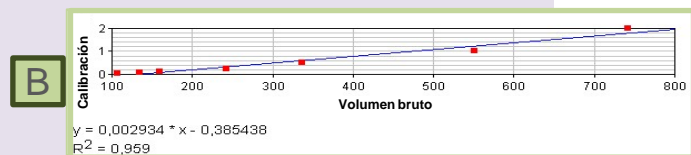


Figura B. Modelado lineal de brillo de banda a partir de las muestras de concentración de ADN conocidas.

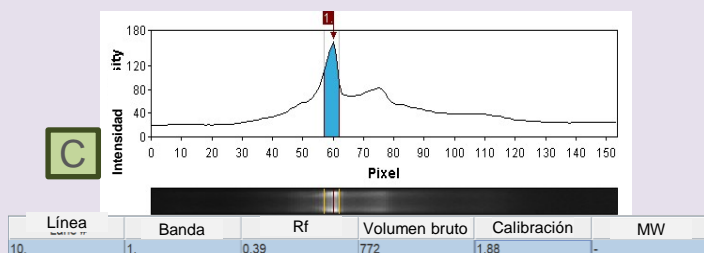


Figura C. Análisis de banda #10 con sus respectivos resultados.

La amplificación de *calM* permitió discriminar entre plantas E+ y E-, detectando la presencia de endófitos solo en las plantas infectadas.

El modelo basado en el brillo de banda de amplificación a partir de ADN de muestras *in planta* resultaron en un rango de concentraciones de [0,4- 2,7] ng/uL de ADN fúngico.

Metodología

Muestras de ADN con las que se trabajó:

- fúngico puro extraído mediante kit comercial de colonia endofítica cultivada de una población de *F. argentina* (E+ aislable).
- *in planta* extraído mediante el método Doyle & Doyle a partir de dos poblaciones de *F. argentina* (E+ aislable), cuatro poblaciones de *F. argentina* (E+ no aislable) y una población de *F. pallescens* (E-: sin endofito).

Para diseñar el patrón de concentraciones de ADN fúngico se colocaron en la reacción de amplificación concentraciones conocidas de ADN fúngico puro. Para la amplificación se utilizó el gen *housekeeping calM*. Las imágenes del gel de agarosa fueron procesadas con el programa GelAnalyzer 19.1, donde se cuantificó el ADN fúngico en las muestras *in planta* mediante un modelado lineal del brillo de banda. Finalmente se amplificaron los genes de síntesis de IDTs según protocolo.

2. Amplificación de los genes de síntesis de IDTs

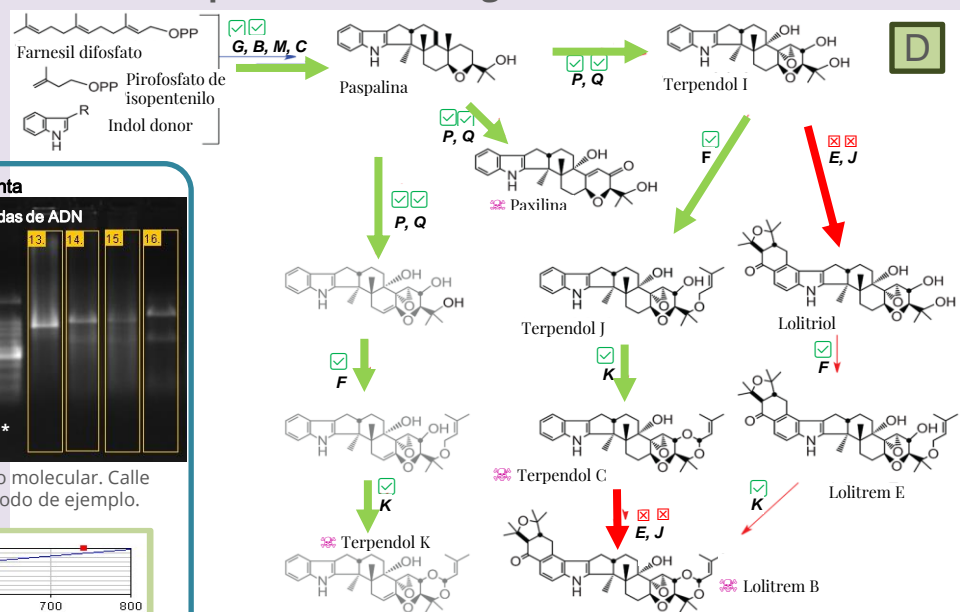


Figura D. Imagen modificada de Schardl *et al.* 2013. Ruta de biosíntesis de IDTs, ✓ presencia del gen que interviene en el paso de biosíntesis, ✗ ausencia de amplificación del gen. ✨ compuesto tremorgénico (Reddy *et al.* 2019).

El perfil genético fue idéntico en todas las poblaciones de *F. argentina*, tendrían la batería de genes para la síntesis de IDTs a excepción de la vía lolitriol - lolitrem B.

Conclusión

El método preanalítico sugerido es eficaz para detectar la presencia de endófitos *Epichloë* en pastizales naturales de *F. argentina*, cuantificar el ADN fúngico *in planta* y caracterizar toxigénicamente poblaciones de *F. argentina* a partir de dicho ADN.

Agradecimientos

Financiamiento: INTA PNSA PD114, INTA PNSA PD113, FONCyT PICT 2021-01484. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Referencias

- Schardl, C. L., ..., Pan, J. (2012). Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal ecology*, 5(3), 331-344.
Reddy, P., ..., Rochfort, S. (2019). Tremorgenic mycotoxins: Structure diversity and biological activity. *Toxins*, 11(5), 302.