

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico
de Doctor en Ciencias Biológicas

Diversidad morfo-genética de *Cercospora* en soja. Detección precoz de la infección por *C. kikuchii*

Bioq. María Gabriela de los Milagros Latorre Rapela

Director de Tesis: Dra. María Cristina E. Lurá

Co-director de Tesis: Dr. Iván S. Marcipar

Lugar de realización: Cátedra de Microbiología General

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2012-

A mi familia...

Deseo expresar mi profundo agradecimiento:

A la Universidad Nacional del Litoral por haberme dado la oportunidad como docente de dicha casa de estudios, de crecer en mi formación científica, por el otorgamiento de la beca y el financiamiento de los proyectos que permitieron la realización de mis estudios doctorales.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haber subsidiado parte del Proyecto PICTO 2003, lo cual fue de gran ayuda para seguir adelante con mi trabajo de tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haberme permitido hacer uso de sus laboratorios y de todo el material e instrumental que en ellos se encuentran, gracias a lo cual pude llevar a cabo cada uno de los objetivos planteados en esta tesis.

Al personal de la oficina de posgrado de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, muy especialmente a Adriana, Gachi, Anita y Luciana por todo su apoyo durante estos seis años, por estar siempre dispuestas a responder mis consultas, por su buena predisposición y por el cariño que siempre me brindaron.

A los miembros del Jurado, por haber aceptado formar parte del mismo y por el interés y tiempo dedicado a la lectura de este trabajo.

Muy especialmente a mi Directora, la Dra. María Cristina Lurá, por confiar en mí, por permitirme abrazar un sueño, por acompañarme incansablemente durante todos estos años, por su generosidad al brindarme sus conocimientos y su experiencia científica, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante la escritura de esta tesis, por su presencia incondicional y desinteresada.

Muy especialmente al Dr. Iván Marcipar por haber aceptado ser mi Co-director aún sin conocerme, por poner a mi disposición su laboratorio y todo su equipamiento, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo, por guiarme y enseñarme a trabajar en un tema desconocido, hasta ese momento, para mí. Por haber estado presente, incondicionalmente, siempre que lo necesité.

A los integrantes del Programa RiiA por sus valiosos aportes en la recolección y envío de las muestras sin las cuales este trabajo no hubiese sido posible.

A los docentes de la Cátedra de Fitopatología, especialmente a la Ing. Agr. Roxana Maumary por sus importantes aportes en el conocimiento de las enfermedades de la soja, por su colaboración en el modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*, y por su buena predisposición.

A la Ing. Agr. Margarita Sillón por haber sido quien me enseñó a reconocer por primera vez la micromorfología del hongo *Cercospora* y cedió amablemente las primeras plantas de soja con sintomatología del tizón de la hoja.

A los docentes del Departamento de Matemáticas: M.Sc. Elena Carrera, Lic. Stella Vaira y Lic. Mauro Colombini por sus valiosos aportes en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la caracterización molecular de los aislamientos fúngicos y por su buena predisposición siempre.

A la Dra. Raquel Chan por haber guiado mis primeros pasos en el camino de la biología molecular y haber puesto a mi disposición sus conocimientos y su laboratorio.

Al Dr. Agustín Arce por haber brindado su tiempo y sus conocimientos en el análisis estadístico de algunos de los resultados obtenidos en la caracterización molecular de los aislamientos fúngicos.

A mis queridos compañeros de la Cátedra de Microbiología General: Marice, Fernanda, Marina, José, Ayelén, Martín, Ludmila, Moni, Romina y Erica porque siempre me apoyaron, contuvieron, me alentaron, me escucharon, me aconsejaron, se alegraron de mis logros, cuando fue necesario me reemplazaron en mi actividad docente. Demostraron ser un verdadero grupo de trabajo, con un fuerte compromiso hacia el otro, a pesar de nuestras diferencias. Sus aportes, pocos o muchos, fueron oportunos, útiles y necesarios para que yo continúe avanzando por este camino.

Al Titular de la cátedra de Parasitología y Micología Bioquímico Pedro Sarsotti, por haberme brindado todo su apoyo a lo largo de estos años.

Al Dr. Guillermo García por aclarar mis dudas siempre que lo necesité.

A los docentes, becarios, cientibecarios y pasantes del Laboratorio de Tecnología Inmunológica: Cristina, Carolina, Nazarena, Iván, Gabriel, Ariel, Cecilia, Verónica, Alejandro, Lucila, Melina, Antonella y Natalia por haberme hecho sentir una integrante más del grupo de trabajo, por la ayuda desinteresada brindada en todo momento, por las risas compartidas entre ensayos de ELISA y geles de poliacrilamida, por el cariño demostrado siempre y por tantos momentos agradables que me hicieron pasar.

Al Bioquímico Mauricio Santos, quien fuera mi cientibecario, por su destacada colaboración.

A la Dra. Valeria Iacona y M.Sc. Ana María González por haberme enseñado, guiado, aconsejado, por haber sido partícipes de mi formación tanto en docencia como en investigación y por haber tenido el placer de compartir muchos años de trabajo juntas.

A todo el personal de la FBCB, quienes cumplen en silencio tareas muy valiosas y necesarias, día tras día, para que como docente e investigadora, pueda llevar adelante mi trabajo.

Al grupo Misionero “San Francisco Javier” porque sus oraciones me dieron la fuerza necesaria para seguir adelante.

A mi familia que me acompañó y apoyó durante todos estos años, soportando muchas veces mi mal humor.

A mis amigas de toda la vida y las que me regalaron mis hijos, con quienes compartí y comparto felices momentos.

A Dios y a la Virgen de los Milagros.

María Gabriela

Los resultados de esta Tesis doctoral fueron difundidos a través de los siguientes trabajos científicos:

Lurá, M.C.; Di Conza, J.A.; González, A.M.; Latorre Rapela, M.G.; Turino, L.; Ibañez, M.M. e Iacona, V. (2007) *Detección de variabilidad genética en aislamientos de Cercospora kikuchii contaminantes de un mismo sembradío de soja*. Rev. Argent. Microbiol. 39: 11-14.

González, A.M.; Turino, L.; Latorre Rapela, M.G. y Lurá, M.C. (2008) *Cercospora kikuchii aislada en la provincia de Santa Fe (Argentina): variabilidad genética y producción de cercosporina in vitro*. Rev. Iberoam. Micol. 25: 237-241

Lurá, M.C.; González, A.M.; Herzog, L.; Latorre Rapela, M.G.; Machuca, L.; Mancipar, I.; Maumary, R.; Pioli, R. (2009) *Cercospora kikuchii aislada de soja. Variaciones morfológicas y genéticas. Medidas de prevención y detección precoz de la infección. INTA- Estación Experimental Agropecuaria Rafaela- Información Técnica de cultivos de verano. Campaña 2009* 115:124-127.

Lurá, M.C.; Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C., Maumary, R.; Soldano, A.; Mattio, M.; González, A.M. (2011) *Genetic Diversity of Cercospora kikuchii Isolates From Soybean Cultured in Argentina as Revealed by Molecular Markers and Cercosporin Production*. Mycopathologia 171: 361-371.

Capítulo de libro

Latorre Rapela, M.G.; Colombini, M.A.; González, A.M.; Vaira, S.M.; Maumary, R.; Mattio, M.C.; Carrera, E. y Lurá, M.C. (2011) *Phenotypic and genotypic variability in Cercospora kikuchii isolates from Santa Fe province, Argentina*. En: *Soybean – Genetics and Novel Techniques for Yield Enhancement* (Ed.: Krezhova D.) INTECH. Croacia, p.97-112. ISBN 978-953-307-721-5

Congresos

Lurá, M.C.; Di Conza, J.A.; González, A.M.; Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C.; Turino, L.; Ibañez, M.M.; Mattio, M.C.; Benzzo, M.; Iacona, V. *Variabilidad genética en cepas de Cercospora kikuchii*. 3º Congreso de Soja del Mercosur. Rosario, Argentina, del 27 al 30 de Junio de 2006, p. 311.

González, A.M.; Turino, L.; Astegiano, E; Maumary, R. Latorre, M.G.; Culzoni, M.J.; Porto, A.; Iacona, V.; Lurá, M.C. *Cercospora kikuchii: producción de cercosporina in vitro. Su relación con los genotipos*. 3º Congreso de Soja del Mercosur. Rosario, Argentina, del 27 al 30 de Junio de 2006, p. 318.

Turino, L.; Lurá, M.C.; Latorre Rapela, M.G.; González, AM. *Cercospora kikuchii aislada en la provincia de Santa Fe (Argentina): variabilidad genética y producción de cercosporina in vitro*. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina, 10 al 12 de Octubre de 2007, p. 145.

Vaccari, M.C.; Latorre Rapela, M.G.; Lurá, M.C. *Cercospora kikuchii. Detección de su variación genética a través de marcadores moleculares*. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina, 10 al 12 de Octubre de 2007, p. 149.

Latorre Rapela, M.G.; González, A.M.; Lurá, M.C. *Caracterización fenotípica y molecular de Cercospora kikuchii aislada de soja en la provincia de Santa Fe*. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina, 10 al 12 de Octubre de 2007, p. 149.

Lurá, M.; Vaccari, M.; Latorre Rapela, M.; Mattio, M. & Di Conza, J. *Estudio de la variación genética de Cercospora kikuchii mediante la aplicación de marcadores moleculares*. 5º Congresso Brasileiro de Micología. Recife, Pernambuco, Brasil, 12 a 16 de Noviembre de 2007, p. 201.

Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C.; Di Conza, J.A. y Lurá, M.C. *Estudio comparativos de variabilidad genética en Cercospora kikuchii mediante el uso de marcadores moleculares*. XI Congreso Argentino de Micología. XXI Jornadas Argentinas de Micología. Santa Fe, Argentina, 27 al 29 de Mayo de 2008.

Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C.; Maumary, R.; Lurá, M.C. *Distribución de aislamientos de Cercospora kikuchii según su genotipo en la provincia de Santa Fe*. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Organizada por la Asociación Argentina de Microbiología Filial Rosario. Rosario, Argentina, 9 al 11 de Octubre de 2008, p. 333.

Peretti, L.; Machuca, L.; Latorre Rapela, M.G.; González, A.M. y Lurá, M.C. *Efecto de compuestos fungicidas sobre aislamientos regionales de Cercospora kikuchii*. X Jornadas de Cs. Naturales del Litoral. II Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Santa Fe, Argentina, 18 al 21 de Octubre de 2009, p. 23.

Latorre Rapela, M.G.; Santos, M.I.; Maumary, R.; Marcipar, I.; Lurá, M.C. *Desarrollo de un ensayo enzimoinmunoenzimático para el diagnóstico de Cercospora en soja*. X Congreso Nacional de Micología. Sevilla, España, 22 al 24 de Septiembre de 2010, p. 163.

Peretti, L.; Machuca, L.; Latorre Rapela, M.G.; González, A.M. y Lurá, M.C. *Comportamiento de diferentes genoviedades de Cercospora kikuchii frente a compuestos con actividad antifúngica*". X Congreso Nacional de Micología. Sevilla, España. 22 al 24 de Septiembre de 2010, p.164.

Peretti, L.; Machuca, L.; Latorre Rapela, M.G.; Maumary, R.; Pioli, R.; González, A.M.; Herzog, L.; Lurá, M.C. *Compuestos fungicidas. Su actividad frente a aislamientos regionales de Cercospora kikuchii*. XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC). I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina, 17 al 20 de Octubre de 2010, Rev. Argent. Microbiol. vol 42, supl. 1

Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C.; Santos, M.; Maumary, R.; Lurá, M.C. *Especies de Cercospora patógenas de soja aisladas en la provincia de Santa Fe: identificación y diferenciación*. XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Mico-

logía y Parasitología Clínica (SADEBAC). I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina, 17 al 20 de Octubre de 2010, Rev. Argent. Microbiol. vol 42, supl. 1.

Santos, M.; Latorre Rapela, M.G.; Maumary, R.; Marcipar, I.; Lurá, M.C. *Detección de Cercospora kikuchii por una técnica molecular en plantas de soja inoculadas experimentalmente*. XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC). I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, 17 al 20 de Octubre de 2010, Rev. Argent. Microbiol. vol 42, supl. 1.

Latorre Rapela, M.G.; Soldano, A.; Colombini, M.; Vaccari, M.; González, A.M.; Carrera, E.; Lurá, M.C. *Variabilidad genética de Cercospora patógenas de soja: Evaluación del período 2005-2009*. XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC). I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina, 17 al 20 de Octubre de 2010, Rev. Argent. Microbiol. vol 42, supl. 1.

Vaira, S.M., Colombini, M.A., Latorre Rapela M.G., Lurá, M.C. *Agrupación de cepas de hongos con análisis cluster: PAM, FANNY y AGNES*. 55ª Reunión Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometría (RBRAS). 15ª Reunión Anual da Região Argentina de Sociedade Internacional de Biometría (RARG). Florianópolis. Santa Catarina, Brasil. Dezembro de 2010.

Santos, Mauricio I; Latorre Rapela, María G.; Turino, Ludmila; Soldano, Anabel; Marcipar, Iván; Lurá, María C. *Detección de especies de Cercospora en etapas tempranas de la infección en plantas de soja*. XII Congreso Argentino de Micología. Posadas, Misiones, 15 al 17 de Junio de 2011, p. 327.

Maumary, R.L.; Goette, J.; Latorre Rapela, M.G. y Santos, M. *Caracterización de distintas cepas de Cercospora kikuchii, aisladas de la región centro-norte de Santa Fe*. 2º Congreso Argentino de Fitopatología. Mar del Plata, Argentina, 1 al 3 de Junio de 2011, p. 216.

Maumary, R.L.; Latorre Rapela, M.G.; Lurá, M.C.; Goette, J.; Fernández, L.N. *Caracterización de la interacción Glycine max (L) Merr. Cercospora kikuchii: Aspectos epidemiológicos y patogénesis de distintos aislamientos de la región centro-norte de Santa Fe*. Mercosoja 2011. Rosario, Argentina, 14 al 16 de Septiembre 2011, p. 1-4.

Maumary, R.L.; Latorre Rapela, M.G.; Lurá, M.C.; Goette, J.; Fernández, L.N. *Caracterización de la interacción Glycine max (L) Merr. Cercospora kikuchii: Aspectos epidemiológicos y patogénesis de distintos aislamientos de la región centro-norte de Santa Fe*. VIII Jornada de Cultivos Extensivos. Facultad de Ciencias Agrarias. UNL. Esperanza. Noviembre de 2011.

ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN	1
SUMMARY	5
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. La soja	9
1.1.1. Exigencias en clima	10
1.1.2. Exigencias en suelo	11
1.1.3. Etapas del desarrollo	11
1.1.3.1. Estados vegetativos	11
1.1.3.2. Estados reproductivos	12
1.1.4. La importancia de la soja en el complejo oleaginoso	13
1.1.5. Origen y difusión en el mundo	14
1.1.6. Importancia de la soja en Argentina	15
1.1.7. El cultivo de soja en la provincia de Santa Fe	17
1.2. Enfermedades de la soja	18
1.2.1. Enfermedades de fin de ciclo	19
1.3. Género <i>Cercospora</i>	22
1.3.1. Clasificación taxonómica de <i>Cercospora</i>	24
1.3.2. Cercosporina y su rol en la patogénesis	24
1.3.2.1. La cercosporina	24
1.3.2.2. Mecanismo de acción	24
1.3.2.3. Rol de la cercosporina en las enfermedades causadas por <i>Cercospora</i>	25
1.3.2.4. Resistencia del hongo	25
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos generales	29
2.2. Objetivos específicos	29
CAPÍTULO III. AISLAMIENTO, CULTIVO, CONSERVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS HONGOS	30
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. Bases para la caracterización fenotípica de <i>Cercospora</i>	31
1.1.1. <i>Cercospora kikuchii</i> (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner	31
1.1.2. <i>Cercospora sojina</i> Hara	31
1.2. Red de información de interés agronómico. Programa RiiA	31
2. OBJETIVOS	33

3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Aislamiento, cultivo y conservación de los hongos	33
3.2. Caracterización fenotípica	37
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>CERCOSPORA</i>	74
1. INTRODUCCIÓN	75
1.1. Estructura genética de poblaciones de hongos fitopatógenos	75
1.2. Métodos para detectar variabilidad genética en hongos	75
1.2.1. Marcadores genéticos	76
1.2.1.1. Tipos de marcadores genéticos	76
1.2.1.1.1. Marcadores morfológicos	76
1.2.1.1.2. Marcadores bioquímicos	77
1.2.1.1.3. Marcadores moleculares	77
1.2.1.1.3.1. Marcadores moleculares basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	77
1.2.1.1.3.1.1. ISSRs “Inter Simple Sequence Repeats”	78
1.2.1.1.3.1.2. RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA”	78
1.2.1.1.3.2. Marcadores moleculares basados en la digestión con endonucleasas (enzimas de restricción)	78
1.2.1.1.3.2.1. RFLP “Restriction Fragment-Length Polymorphisms”	78
1.3. Espaciadores de transcripción interna: ITS “Internally transcribed spacers”	79
1.4. Secuenciación de ADN	79
1.5. Métodos de análisis filogenéticos	79
1.5.1. Análisis de agrupamientos (“clustering”)	79
1.5.2. Medidas de asociación y distancia	80
1.5.3. Representación gráfica de una clasificación jerárquica: el dendrograma	81
1.5.4. “Bootstrap”	82
2. OBJETIVOS	82
3. MATERIALES Y MÉTODOS	82
3.1. Aislamientos fúngicos	82
3.2. Extracción del ADN total del hongo	83
3.3. Amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR)	83
3.3.1. Relaciones filogenéticas y árboles obtenidos con la técnica ISSR-PCR	84
3.3.2. Distribución espacial y temporal de los aislamientos genéticamente relacionados .	85
3.4. Caracterización de las cepas mediante RAPD-PCR	85
3.4.1. Relaciones filogenéticas y árboles obtenidos	86
3.5. Amplificación por PCR de las regiones intergénicas (ITS) DE ADNr. Purificación de los fragmentos amplificados	88
3.5.1. Digestión de los fragmentos amplificados y purificados mediante endonucleasas de restricción	88

3.5.2. Secuenciación. Comparación de las secuencias obtenidas	89
4. RESULTADOS	89
4.1. Amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR)	89
4.1.1. Relaciones filogenéticas y árboles obtenidos al amplificar los ISSR	90
4.1.2. Distribución espacial y temporal de los aislamientos relacionados genéticamente	100
4.2. Caracterización de las cepas mediante RAPD-PCR	102
4.3. Amplificación por PCR de las regiones intergénicas (ITS) de ADNr. Purificación de los fragmentos amplificados	113
4.3.1. Digestión de los fragmentos amplificados y purificados mediante endonucleasas de restricción	113
4.3.2. Secuenciación. Análisis de las secuencias obtenidas	114
5. DISCUSIÓN	122

CAPÍTULO V. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN PRECOZ

1. INTRODUCCIÓN	128
1.1. El diagnóstico de las enfermedades de las plantas	128
1.2. Métodos de inoculación artificial bajo condiciones controladas	132
2. OBJETIVOS	132
3. MATERIALES Y MÉTODOS	133
3.1. Obtención de la proteína recombinante y de los anticuerpos policlonales	133
3.1.1. Cepas bacterianas y vectores plasmídicos	133
3.1.2. Obtención de la secuencia codificante para la porción antigénica de la proteína CFP (“Cercosporin Facilitator Protein”)	134
3.1.2.1. Extracción del ADN genómico y amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>cfp</i>	136
3.1.2.2. Purificación del ADN a partir de la banda específica de la secuencia <i>cfp</i>	136
3.1.2.3. Ligación	137
3.1.2.4. Preparación del cultivo de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	137
3.1.2.5. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico	137
3.1.2.6. Minipreparación de ADN plasmídico. Protocolo modificado de lisis alcalina/precipitación con polietilenglicol (PEG)	138
3.1.3. Clonado de la secuencia codificante y expresión de la proteína recombinante	138
3.1.3.1. Purificación de los fragmentos de ADN codificante amplificados	138
3.1.3.2. Ligación y transformación	139
3.1.3.3. Expresión de la proteína recombinante	139
3.1.3.4. Purificación de la proteína recombinante en columna de pseudoafinidad a níquel	140
3.1.3.5. Dosaje de proteínas totales	140
3.1.4. Obtención del anticuerpo policlonal	140
3.1.4.1. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales de ratón	140

3.1.4.2. Titulación de los sueros obtenidos de los ratones	141
3.1.4.3. Protocolo de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales de conejo	141
3.1.4.4. Titulación del suero obtenido del conejo	142
3.2. Optimización de técnicas de ELISA	142
3.2.1. Obtención del extracto proteico a partir del micelio fúngico	142
3.2.2. Obtención del extracto proteico a partir de trozos de tejido vegetal	143
3.2.3. Optimización del ELISA indirecto	143
3.2.3.1. ELISA indirecto con el sobrenadante de la extracción	143
3.2.3.2. ELISA indirecto con el sedimento de la extracción	144
3.2.4. Optimización del ELISA de inhibición	144
3.2.4.1. Determinación del título de anticuerpos policlonales de conejo	144
3.2.4.2. Determinación de las concentraciones de la proteína soluble detectable mediante ELISA de inhibición	145
3.2.4.3. Determinación de la línea de corte	145
3.2.4.4. Desarrollo de la técnica de ELISA de inhibición	146
3.3. Optimización de la técnica de Dot blot para la detección precoz de <i>C. kikuchii</i> en tejidos vegetales	146
3.3.1. Obtención del extracto proteico	146
3.3.2. Preparación del suero adsorbido	147
3.3.3. Desarrollo de la técnica	147
3.4. Optimización de una técnica de PCR para la detección precoz de especies de <i>Cercospora</i>, en tejidos vegetales	148
3.4.1. Extracción del ADN total del hongo y de la planta	148
3.4.2. Amplificación del fragmento del gen <i>cfp</i> . Diseño de los oligonucleótidos. Condiciones de la PCR	148
3.5. Optimización del modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de <i>Cercospora</i>	150
3.5.1. Crecimiento de plantas de soja bajo condiciones controladas	150
3.5.2. Hongos utilizados para la inoculación de las plantas	150
3.5.3. Preparación del inóculo	150
3.5.4. Inoculación de las plantas	151
3.5.5. Confirmación de la infección y análisis de la sintomatología	151
3.6. Evaluación de la técnica de Dot blot y PCR para la detección precoz de especies de <i>Cercospora</i>	152
4. RESULTADOS	152
4.1. Obtención de la secuencia codificante para la porción antigénica de la proteína CFP	152
4.2. Obtención y purificación de la proteína recombinante	155
4.3. Obtención del anticuerpo policlonal.....	156
4.3.1. Evaluación de los anticuerpos obtenidos en ratón	156
4.3.2. Evaluación de los anticuerpos obtenidos en conejo	157
4.4. ELISA indirecto	157

4.4.1. ELISA indirecto con el sobrenadante de la extracción	157
4.4.2. ELISA indirecto con el sedimento de la extracción	157
4.5. ELISA de inhibición	158
4.5.1. Determinación del título de anticuerpos policlonales de conejo	158
4.5.2. Determinación de las concentraciones de la proteína soluble detectable mediante ELISA de inhibición	159
4.5.3. Determinación de la línea de corte	160
4.5.4. Desarrollo de la técnica	161
4.6. Técnica de Dot blot	161
4.7. Detección de especies de <i>Cercospora</i> por PCR	164
4.8. Modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de <i>Cercospora</i> ..	165
4.8.1. Evaluación de la precocidad de la infección en el modelo por detección de la lesión	168
4.9. Evaluación de la técnica de Dot blot para la detección precoz de la infección	170
4.10. Evaluación de la técnica de PCR para la detección precoz de la infección	172
5. DISCUSIÓN	173
CONCLUSIONES	179
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
ANEXO	201

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AC	Agar conejarina
a.C.	Antes de Cristo
ADNr	Ácido desoxiribonucleico ribosomal
Ag	Antígeno
AGNES	“Agglomerative nesting hierarchical Clustering Algorithm”
AJV8	Agar jugo de ocho vegetales
Am	Ampicilina
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
Anti-IgG	Anti-inmunoglobulina G
APD	Agar papa dextrosa
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés, Bovine serum albumin)
°C	Grado Celsius
CK	<i>Cercospora kikuchii</i>
<i>cfp</i>	“ <i>cercosporin facilitator protein</i> ”
CFP	“Cercosporin Facilitator Protein”
CLARA	“Clustering Large Applications”
CS	<i>Cercospora soja</i>
DIANA	“Divisive Analysis”
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EE2	Proteína recombinante correspondiente al inserto <i>EcoRI-EcoRI</i>
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EE.UU.	Estados Unidos
EFC	Enfermedades de fin de ciclo
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (por sus siglas en inglés, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
ETS	Espaciador transcripto externo
FANNY	“Fuzzy Analysis”
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (por sus siglas en inglés, “Food and Agriculture Organization”)
FBCB	Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
FCV	Facultad de Ciencias Veterinarias
F_{IS}	Coefficiente de endogamia entre individuos de una población local
F_{IT}	Coefficiente de endogamia entre individuos en relación a la población total
g	Gramo

CG	Guanina Citosina
GTE	Glucosa, Tris, EDTA
h	Hora
ha	Hectárea
IGS	Espaciador intergénico (por sus siglas en inglés, “ intergenic spacer”)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (por sus siglas en inglés, Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)
ITS	Espaciador transcrito interno (por sus siglas en inglés, “Internal Transcribed Spacers”)
k	Cantidad de conglomerados
KDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Luria-Bertani
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro
M	Molar
min	Minuto
mL	Mililitro
MLC	Medio de cultivo para <i>Colletotrichum</i>
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Marcador de peso molecular
MOPS	Ácido 3(N-morfolino)propanosulfónico
MP-PCR	“Microsatellite-primed PCR”
N	Normal
ng	Nanogramo
NBRC	“NITE Biological Resource Center”
NITE	“National Institute of Technology and Evaluation”
NTA-Ni ²⁺	Ácido nitrilotriacético- níquel
NTS	Espaciador no transcrito
OPA	“Oligo Pool Assay”
PAM	“Partitioning Around Medoids”
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (por sus siglas en inglés, “Phosphate Buffered Saline”)
PBS-T	PBS suplementado con tween 20 al 0,05%.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, “Polymerase Chain Reaction”)
PEG	Polietilenglicol

PF	“Primer forward”
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
pmol	Picomol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (por su sigla en inglés phenylmethanesulfonyl fluoride)
PR	“Primer reverse”
r	“Membership exponent”
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico (por su sigla en inglés, “Random Amplified Polymorphic DNA”)
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (por su sigla en inglés, “Restriction Fragment-Length Polymorphisms”)
RiiA	Red de Información de Interés Agronómico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
S.A.	Sociedad Anónima
SD	Desviación estándar (por su sigla en inglés, “Standard deviation”)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante (por su sigla en inglés, “SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
Sinavimo	Sistema nacional de vigilancia y monitoreo
S.R.L.	Sociedad de Responsabilidad Limitada
SS4	Proteína recombinante correspondiente al inserto <i>SacI-SacI</i>
t	Tonelada
T	Timidina
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TMB	Tetrametilbencidina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (por su sigla en inglés, Tetramethylethylenediamine)
TRX	Tiorredoxina
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNL	Universidad Nacional del Litoral
UPGMA	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”
USDA	“United States Department of Agriculture”
UV	Ultravioleta
V	Voltio
VC	Estado vegetativo cotiledonar
VE	Estado vegetativo de emergencia

v/v	Volumen-volumen
W	Vatio
w/v	Peso/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (por su sigla en inglés, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)

RESUMEN

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. Argentina es el tercer exportador de la misma y el principal proveedor internacional de su aceite y derivados de la harina.

En la provincia de Santa Fe, el cultivo de la soja representa una de las principales fuentes de ingreso. El clima cálido y húmedo favorece su labranza y es justamente este tipo de clima, propio de la región, el que contribuye a la aparición de enfermedades que provocan significativas mermas de calidad y rendimientos.

Entre los agentes causales de enfermedades infecciosas, las especies del género *Cercospora* constituyen un problema importante. El tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla cuyo agente causal es *C. kikuchii* y la mancha ojo de rana (MOR) producida por *C. sojina*, son bastante comunes, reducen el valor nutricional de la planta y provocan severo deterioro de las cosechas.

C. kikuchii es uno de los hongos prevalentes en la zona central de la provincia de Santa Fe. En este punto es importante destacar que los resultados de los estudios de la genética poblacional de este patógeno, efectuados en otros países, sugieren que ha aumentado su severidad y patogenicidad. En cuanto a *C. sojina*, contaminante habitual de la soja cultivada en otras regiones del país, hasta hace unos pocos años no se la consideraba epidemiológicamente importante para la zona de Santa Fe; sin embargo en los últimos 4 años ha incrementado su aparición, debido a las condiciones climatológicas imperantes en la actualidad.

Las especies de *Cercospora* producen una toxina de color rojo denominada cercosporina, específica del género en estudio, que es la responsable de la patogenicidad y provoca la enfermedad. En el año 1991, un grupo de investigadores detectó y caracterizó molecularmente al gen *cfp* (*cercosporin facilitator protein*), que codifica la proteína CFP (“Cercosporin Facilitator Protein”), que regula la producción de la toxina y la exporta hacia el exterior del hongo.

En los últimos años los fitopatólogos, han centrado su interés en la identificación y el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de los agentes patógenos de plantas, a fin de implementar medidas de control que sean eficaces y duraderas. A pesar de la importancia y la amplia distribución de las enfermedades que afectan a la soja, en Argentina y particularmente en la provincia de Santa Fe, no se conocen hasta la fecha, las características poblacionales de los patógenos anteriormente mencionados.

Este trabajo de tesis pretende contribuir al conocimiento de las especies de *Cercospora* que ocasionaron patología en las plantas de soja, cultivadas en diferentes regiones de la provincia de Santa Fe durante las campañas 2005/2006, 2006/2007, 2007/2008 y 2008/2009.

Para ello se plantearon como objetivos aislarlas y caracterizarlas fenotípicamente, para luego caracterizarlas molecularmente mediante la amplificación de ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”), RAPD-PCR (“Random Amplified Polymorphic DNA”) y la amplificación, por PCR, de regiones

intergénicas (ITS) del ADNr (“Internally Transcribed Spacers”), las que se analizaron mediante RFLP-PCR (“Restriction Fragment-Length Polymorphisms”) y se secuenciaron.

Se procesaron los peciolo y folíolos de plantas con signos y síntomas visibles del tizón de la hoja y MOR. Se obtuvieron 52 aislamientos de los cuales, 42 provinieron de soja con tizón de la hoja y el resto de plantas enfermas con MOR. Cada aislamiento fue rotulado con las iniciales, en mayúscula, de la especie correspondiente (CK: *Cercospora kikuchii*; CS: *Cercospora sojina*) y un número correlativo. Se trabajó, además con las cepas de referencia *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 y *Cercospora sojina* NBRC 6715.

Para la caracterización fenotípica se utilizaron 3 medios de cultivo diferentes y se efectuaron observaciones macro y microscópicas.

Los aislamientos exhibieron colonias con diferentes tamaños y tonalidades en todos los medios de cultivo, no detectándose mayores diferencias entre ambas especies. Al efectuar el examen directo al microscopio las estructuras de fructificación observadas fueron compatibles con *C. kikuchii* y *C. sojina* según correspondiera.

La amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR) del genoma de cada aislamiento se llevó a cabo con los oligonucleótidos: (CAC)₅, (GTG)₅ y (GACA)₄. Los perfiles de bandas obtenidos, se fotografiaron y analizaron a fin de determinar la similitud entre los hongos.

Los 3 oligonucleótidos generaron dendrogramas en los que se pudieron establecer 3 grandes “clusters”, A, B y C, separados a una distancia genética de 0,85, 0,85 y 0,90 respectivamente, que permitieron reunir a los aislamientos regionales y a las cepas de referencia en grupos poco relacionados.

Los grupos formados por los aislamientos genéticamente relacionados, en base al dendrograma obtenido con (GTG)₅, se volcaron sobre un plano de la provincia de Santa Fe, de manera de visualizar su distribución espacial y temporal, detectándose una escasa asociación entre el origen geográfico de los hongos y la diversidad genética.

Las reacciones de RAPD se llevaron a cabo utilizando veinte oligonucleótidos de la serie OPA y se realizó un análisis de correspondencia (Biplot). Los datos de presencia/ausencia de bandas se volcaron en matrices de datos que se analizaron mediante algoritmos de “clustering”. El dendrograma mostró grandes distancias genéticas entre los diferentes hongos, detectándose un mayor grado de diversidad entre los aislamientos, lo que permitió corroborar la variabilidad fenotípica observada en los medios de cultivo.

De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, se puede concluir que las poblaciones argentinas de *C. kikuchii* y *C. sojina* son fenotípica, genotípica y geográficamente variables, constituyendo un grupo muy heterogéneo.

Para la amplificación de la región ITS del ADNr se utilizaron los oligonucleótidos ITS 4 e ITS 5. Los productos de PCR por un lado, se digirieron con 6 endonucleasas de restricción y por otro, se derivaron para su secuenciación. Las secuencias, se analizaron, alinearon y compararon con las disponibles en la base de datos GenBank.

Las zonas espaciadoras ITS1 e ITS2 son las más variables y son de utilidad para organismos que se encuentran próximos en la filogenia, permitiendo diferenciar especies si se combina con la técnica de RFLP. Sin embargo, en este trabajo de tesis el alto grado de similitud del fragmento ITS y de los patrones RFLP observados entre las especies *C. kikuchii* y *C. sojina* aisladas, indicarían una alta homología en la secuencia de la región ITS estudiada.

Los resultados obtenidos de la secuenciación, solo permitieron confirmar que los hongos analizados, pertenecían al género *Cercospora*, no encontrándose diferencias entre las dos especies en estudio, ya que el rango de los porcentajes de identidad entre ellas y con las depositadas en el GenBank fue de 99-100%.

El diagnóstico de las enfermedades de forma rápida y precisa evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos como plaguicidas, genera medidas de control efectivas, optimización de los recursos, reducción de los efectos negativos en el medio ambiente y a la vez origina información respecto de la interacción patógeno - hospedante. El último de los objetivos propuestos en esta tesis fue el de desarrollar métodos de detección precoz de especies de *Cercospora* en plantas de soja.

Para cumplimentarlo se pusieron a punto diferentes técnicas para la detección del hongo en la planta y también se desarrolló un modelo experimental de infección de plantas de soja, por *Cercospora*. Esta última metodología permitió reproducir los síntomas de la enfermedad al aplicar el patógeno en tejidos de plantas sanas, determinar el tiempo de aparición de las lesiones observadas a simple vista y evaluar las técnicas optimizadas previamente "in vitro".

Para ello, en primer término, se seleccionó la CFP, se la obtuvo en forma recombinante y se inoculó en animales a fin de obtener anticuerpos policlonales específicos contra dicha proteína.

Con el anticuerpo obtenido se optimizó un ELISA indirecto para demostrar la presencia de la proteína nativa en los extractos de las plantas infectadas. Debido a que este ensayo no presentó sensibilidad y reproducibilidad, se propusieron dos nuevas estrategias: por un lado se trabajó con un ELISA de inhibición para evaluar la unión de los anticuerpos específicos anti-CFP a los tejidos vegetales no solubles y por otro, se utilizó la técnica de Dot blot sobre membrana de nitrocelulosa, utilizando el extracto soluble antes evaluado en el ensayo de ELISA.

En el ELISA de inhibición, los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición. Si bien fueron satisfactorios, se detectó reactividad cruzada con otros géneros fúngicos.

Para la técnica de Dot Blot se estableció una línea de corte, que se calculó mediante una curva ROC ("Receiver Operating Characteristic curves"), la que fue menor o igual a 2 para los negativos y mayor o igual a 4 para los positivos. Según el criterio adoptado, los extractos de las cepas de referencia *C. kikuchii* NBCR 6711 y *C. sojina* NBCR 6715 presentaron valores de "score" superior a 4 mientras que los extractos de *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. y *Alternaria* sp., utilizados como controles negativos, presentaron un valor igual a 2. Esta técnica permitió detectar la CFP en las plantas a los 4 días de inoculadas.

Otra estrategia de detección del hongo, fue la amplificación por PCR de un fragmento del gen *cfp* de 290 pb, para lo cual se diseñaron nuevos oligonucleótidos (CFP1 y CFP2). Este ensayo permitió detectar la proteína en etapas tempranas (4h) de la infección por *Cercospora*, resultando una técnica rápida, sensible y específica.

Se concluye que los resultados obtenidos constituyen un aporte importante al conocimiento y a la detección temprana de dos de los hongos fitopatógenos más frecuentes que afectan uno de los cultivos más importantes para Argentina y, en particular, para la provincia de Santa Fe.

SUMMARY

Soybean (*Glycine max* L. Merr.) is one of the most important crops worldwide, Argentina being the world's third largest exporter and the main international supplier of its oil and flour derivatives.

In Santa Fe province, soybean represents one of the greatest sources of revenue. The hot and wet climate of the region favors its culture, although it is precisely those weather conditions that contribute to the disease onset, leading to significant reductions in both quality and yield.

Among the infectious disease-causing agents, fungi of the genus *Cercospora* have become a significant problem. Leaf blight and purple seed stain, both of them produced by *C. kikuchii*, and frogeye leaf spot (MOR), produced by *C. sojina*, are quite common, reducing the plant nutritional value and causing serious harvest damages.

C. kikuchii is one of the prevailing fungi in the central zone of Santa Fe province, to the point that some studies on this pathogen population genetics carried out in other countries suggest an increase in its severity and pathogenicity. As regards *C. sojina*, a habitual contaminant of soybean grown in other regions of this country, it has been detected to increase in Santa Fe region in the last 4 years, which could be attributed to the weather conditions affecting the zone nowadays. However, it had not been considered epidemiologically important until a few years ago.

Cercospora species produce a red toxin specific of the genus under study, called cercosporine, which is responsible for the pathogenicity and causes the disease. In 1991, a group of researchers detected and characterized the *cfp* (*cercosporin facilitator protein*) gen, which codifies the CFP ("Cercosporin Facilitator Protein") protein, in charge of regulating the toxin production and exporting it to the external part of the fungus.

In the last years, phytopathologists have focused their attention on the identification and knowledge of the genetic structure of plant pathogen agents, in order to implement long-lasting and efficient control measures. It is worth noting that, despite the importance and wide spread of diseases affecting soybean in Argentina, and in Santa Fe province in particular, population features of the above mentioned pathogens are not known up to now.

This thesis attempts to contribute to the knowledge of the *Cercospora* species which produced pathology in soybean plants grown in different regions of Santa Fe province during 2005/2006, 2006/2007, 2007/2008 and 2008/2009 campaigns.

Accordingly, the objectives of this work were the isolation and phenotypical characterization of the species, followed by a molecular characterization by means of ISSR ("Inter Simple Sequence Repeats"), RAPD-PCR ("Random Amplified Polymorphic DNA"), and PCR amplification of intergenic regions (ITS -"Internally Transcribed Spacers") of DNAr, which were analyzed by RFLP-PCR ("Restriction Fragment-Length Polymorphisms") and finally sequenced.

Petioles and leaflets of plants with visible signs and symptoms of leaf blight and MOR were processed, which led to 52 isolates, 42 of which came from soybean affected by leaf blight, and the

rest from plants affected by MOR. Each isolate was labeled with the initials of the corresponding species, in capital letters (CK: *Cercospora kikuchii*; CS: *Cercospora sojina*), and a correlative number. Two reference strains (*Cercospora kikuchii* NBRC 6711 and *Cercospora sojina* NBRC 6715) were also used.

For the phenotypical characterization, 3 different culture media were used, making macro- and microscopic observations.

In every culture media, isolates exhibited colonies of different sizes and shades, there being no significant differences between both species. When performing the direct microscopic examination, the observed fructification structures were compatible with *C. kikuchii* and *C. sojina*, as appropriate.

The amplification of genomic regions between microsatellites (ISSR-PCR) in each isolate was carried out with the oligonucleotides (CAC)₅, (GTG)₅ and (GACA)₄, photographing and analyzing the band profiles obtained so as to determine the similarity between fungi.

The three oligonucleotides generated dendograms where 3 great clusters (A, B and C), separated by a genetic distance of 0.85, 0.85 and 0.90 respectively, could be determined. This allowed the regional isolates and reference strains to be gathered in slightly-related groups.

Groups formed by the genetically related isolates on the basis of the dendogram obtained with (GTG)₅ were located on a Santa Fe province map so as to visualize their spatial and temporal distribution, little association being found between the fungi geographical origin and genetic diversity.

RAPD reactions were carried out using twenty OPA series oligonucleotides, being followed by a Biplot analysis. Data on band presence/absence were entered in data matrices which were analyzed through “clustering” algorithms. The dendogram showed great genetic distances between the various fungi, a higher degree of diversity between isolates being detected, which allowed corroborating the phenotypic variability observed in culture media.

From the results here obtained, it can be concluded that Argentinian populations of *C. kikuchii* and *C. sojina* are phenotypically, genotypically and geographically variable, thus constituting a very heterogeneous group.

As regards amplification of the ITS region of DNAr, oligonucleotides ITS 4 and ITS 5 were used for the experience. PCR products were digested with 6 restriction endonucleases and they were derived for their sequentiation. Sequences were analyzed, aligned and compared with those available in the GenBank database.

Since ITS1 and ITS2 spacer regions are known to be the most variable ones, the combined application with RFLP technique could be very useful to differentiate species for organisms close in the phylogeny. In this thesis, however, the high degree of similarity between the corresponding ITS fragments and the RFLP patterns of *C. kikuchii* and *C. sojina* isolates would indicate a high homology in the ITS sequence under study.

Sequentionation results, on the other hand, only allowed confirming that the analyzed fungi belonged to the genus *Cercospora*, no differences being found between the two species under study since the identity percentage range between them and with those stored in the GenBank was 99-100%.

It is well known that early and accurately diagnosing diseases prevents the excessive or improper use of chemicals such as pesticides, generates effective control measures and resource optimization, reduces the negative impact on the environment, as well as provides information about pathogen-host interaction. The last of the objectives proposed in this thesis was precisely that of developing early detection methods of *Cercospora* species in soybean plants.

In order to achieve this objective, different techniques for detecting the fungi in the plant were started up, together with the development of an experimental model to infect soy plants with *Cercospora*. This last methodology allowed reproduce the symptoms of the disease by applying the pathogen to healthy plant tissues, determine the time of occurrence of the injuries seen with the naked eye and evaluate the techniques which had been previously optimized “in vitro”.

For this, the CFP was firstly selected, then obtained as a recombinant and finally inoculated in animals so as to obtain polyclonal antibodies specific against such protein.

With the obtained antibody, a direct ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was optimized to corroborate the presence of the native protein in the extracts of infected plants. Since this assay did not show sensitivity or reproducibility, two new strategies were proposed: on the one hand, an inhibition ELISA was used to evaluate the binding of anti-CFP specific antibodies to non-soluble plant tissues and, on the other, the Dot Blot technique was applied on nitrocellulose membrane using the soluble extract previously evaluated in ELISA test.

Results obtained from inhibition ELISA -expressed as % inhibition-, although satisfactory, detected cross-reactivity with other fungal genera.

A cut-off was determined for the Dot Blot technique, calculated by an ROC (“Receiver Operating Characteristic”) curve, which turned out to be lower than or equal to 2 for the negative values, and higher than or equal to 4 for the positive ones. According to the adopted criterion, extracts from reference strains *C. kikuchii* NBCR 6711 and *C. sojina* NBCR 6715 showed score values higher than 4, whereas extracts from *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. and *Alternaria* sp., used as negative controls, gave a value of 2. This technique allowed the detection of CFP in plants 4 days after inoculation.

Another strategy of fungus detection was PCR amplification of a 290 bp fragment of *cfp* gen, for which new oligonucleotides (CFP1 and CFP2) were designed. This test allowed the protein to be detected at the early stage (4h) of *Cercospora* infection, thus resulting in a rapid, sensitive and specific technique.

It is concluded that results will significantly contribute to the knowledge and early detection of two of the most frequent phytopathogenic fungi affecting one of the main crops in Argentina and Santa Fe province, in particular.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La leyenda de la Soja

*La leyenda cuenta del nacimiento de un niño rey.
Y los Dioses festejaron cada cual enviando un regalo
al recién nacido: fuerza, coraje, larga vida, perseverancia,
disciplina, sabiduría, comprensión...*

*Finalmente, la Diosa Kannon miró largamente al niño,
retiró su collar y, con cada una de sus nueve manos,
extendió sobre la cuna nueve perlas doradas.*

*“El cielo, el niño ya posee, tantos son sus dones.
Resta, por lo tanto, conquistar la tierra”.
...Y las perlas doradas se transformaron en semillas, que,
una vez sembradas, se multiplicaron y,
una vez cosechadas, alimentaron millones.*

(Leyenda Oriental Anónima)

1.1. LA SOJA

La soja, también conocida como “Judía de Manchuria” o “Guisante de China”, recibe el nombre científico de *Glycine max* (L). Merrill. Todas las variedades cultivadas proceden de una misma especie llamada *Glycine ussuriensis* (Regel y Masck), que crece espontáneamente en China y en otros países del este asiático (Krimperfort, 2007).

Según el acuerdo alcanzado en la Conferencia Internacional sobre Leguminosas que tuvo lugar en Kew (Reino Unido) en 1978, estas plantas pertenecen a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae* que se destacan por su alto contenido proteico y por su calidad nutritiva. Ocupan una posición intermedia entre las legumbres y los granos oleaginosos, contienen más proteínas que la mayoría de las legumbres y menos grasa que la mayor parte de las oleaginosas (Toledo, 2009). La subfamilia, a su vez, está integrada por cinco tribus. El género *Glycine* (soja) pertenece a la tribu *Phaseoleae* (Krimperfort, 2007).

La planta de soja (Figura I.1) es de porte erecto, con o sin ramificaciones, de altura variable entre 50 y 130 cm, con un sistema radicular de 40 a 100 cm, débilmente pivotante y con abundante superficie foliar.

Las hojas son de color verde, alternas, compuestas, trilobuladas, con los folíolos oval-lanceolados, excepto las basales, que son simples. Al madurar se desprenden, de manera que la planta queda sin hojas.

Sus flores son pequeñas y se agrupan en racimos axilares. Las inflorescencias fecundan sobre el tallo y producen entre 25 a 40 vainas que miden de 2,5 a 9,5 cm y contienen generalmente de 2 a 5 semillas de color amarillo claro, verde, marrón oscuro o negro con un hilio bien marcado (Krimperfort, 2007).

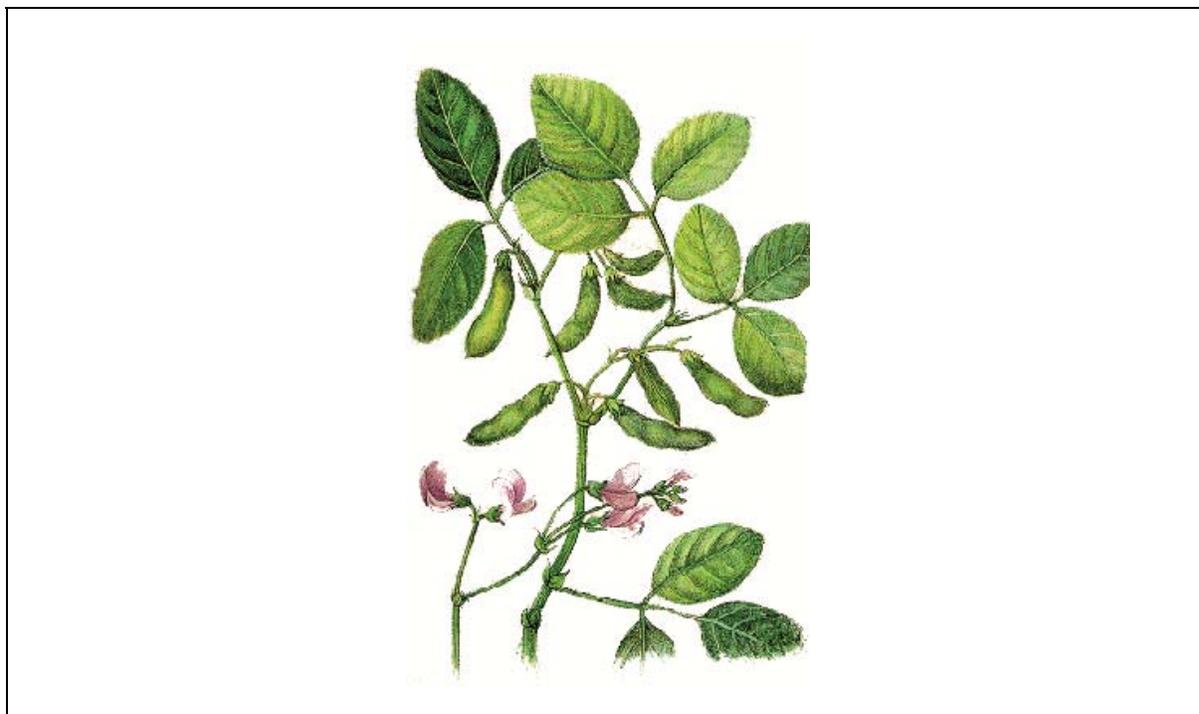


Figura I.1. Planta de soja

Fuente: http://www.diodora.com/documentos/nutricion_soja.htm

1.1.1. EXIGENCIAS EN CLIMA

Es una planta anual. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de la soja están comprendidas entre los 20°C y 30°C, siendo ideales, las cercanas a 30°C (estación primavera-verano). Para la siembra las temperaturas óptimas varían entre los 15°C y los 18°C. En presencia de temperaturas próximas o inferiores a 10°C, el crecimiento vegetativo es mínimo o casi nulo, deteniéndose por debajo de los 4°C; no obstante, es capaz de resistir heladas de -2°C a -4°C. Temperaturas superiores a los 40°C provocan un efecto no deseado sobre la velocidad de crecimiento, causando daños en la floración, la cual se produce a 25°C (Krimperfort, 2007).

El efecto principal de las horas de luz del día, es la inducción de la floración. El fotoperíodo influye y regula la mayor parte de los eventos reproductivos, condicionando el inicio y el final de las diferentes fases así como la tasa con que progresan los cambios dentro de la planta (Kantolic y Satorre, 2004).

Durante su cultivo, necesita al menos 300 mm de agua, que obtiene a partir del riego o bien en forma de lluvia en aquellas zonas templadas y húmedas donde las precipitaciones son suficientes. La necesidad de agua es especialmente importante para la floración y la formación de vainas (Krimperfort, 2007).

1.1.2. EXIGENCIAS EN SUELO

La soja crece en casi todos los tipos de suelo, excepto en los que son muy arenosos, con escasa retención de agua, o arcillosos con tendencia a encharcarse. Es poco exigente con respecto a los nutrientes del mismo, por lo que a menudo se la emplea como alternativa para aquellos terrenos poco fertilizados y que no son aptos para otros cultivos; no obstante, crece y se desarrolla mejor en suelos fértiles y en muchos casos, responde a la fertilización directa (Sinavimo, 2010). Crece en suelos neutros o ligeramente ácidos. Con un pH de 6 hasta la neutralidad se consiguen buenos rendimientos (Krimperfort, 2007).

1.1.3. ETAPAS DEL DESARROLLO

Existen varias clasificaciones para identificar los distintos estados de desarrollo de la soja. La más difundida es la escala propuesta por Fehr y col. (1971), donde se describen sus estadios fenológicos, distinguiéndose dos etapas principales: una que detalla los estados vegetativos y la otra que se refiere a los estados reproductivos (Figura I.2).

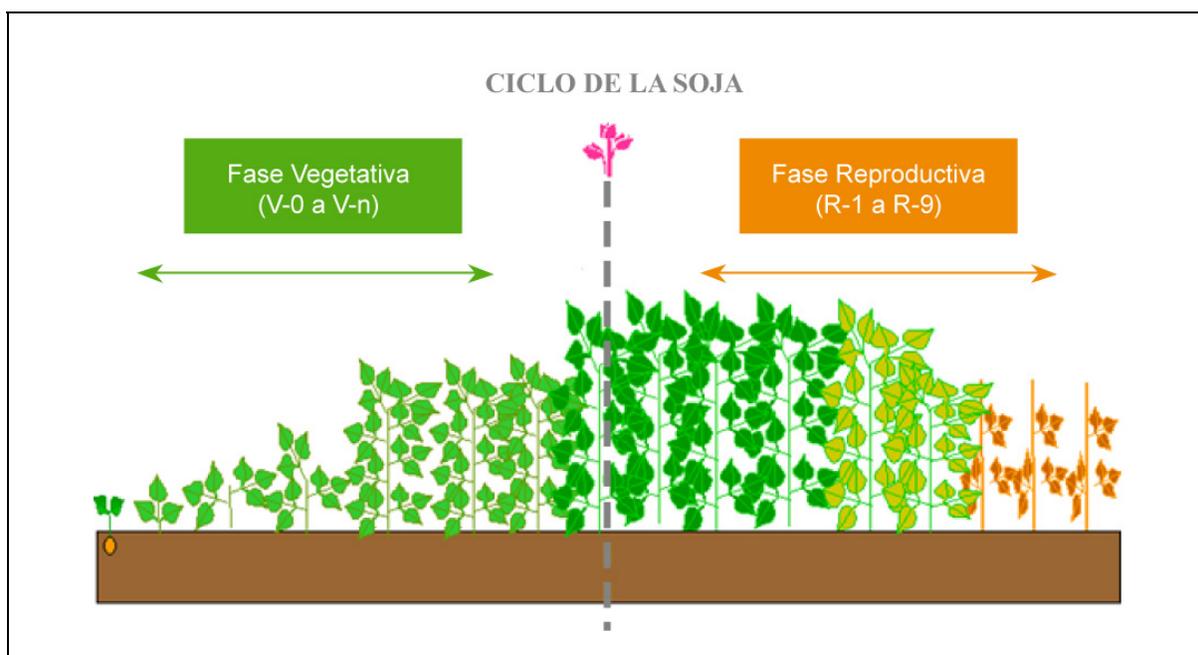


Figura I.2. Etapas de desarrollo de la soja

Fuente: http://www.agronort.com/novedades/Taspa_soja/diap06.html

1.1.3.1. Estados vegetativos

Los estados vegetativos son indicados con la letra “ve” (V) seguida de un número que refiere a la cantidad de nudos desarrollados sobre el tallo principal, con excepción de los dos primeros, el estado de emergencia (VE) y el cotiledonar (VC) (Figura I.3.a y I.3.b, respectivamente).

Los cotiledones y las hojas unifoliadas se encuentran de a pares en el primer y segundo nudo respectivamente y en posición opuesta (Fig I.3.b). De aquí en adelante las hojas son trifoliadas, en posición alternada y solo una por nudo (Fig I.3.c y I.3.d) (Sinavimo, 2010).

1.1.3.2. Estados reproductivos

Los estados reproductivos están basados en la floración, desarrollo de vainas, semillas y madurez de la planta. Para la descripción de cada uno de estos estadios se los designa con la letra “erre” (R) seguida de un número que indica el estado de la planta desde el inicio de la floración hasta la plenitud de madurez (Figura I.4) (Sinavimo, 2010).

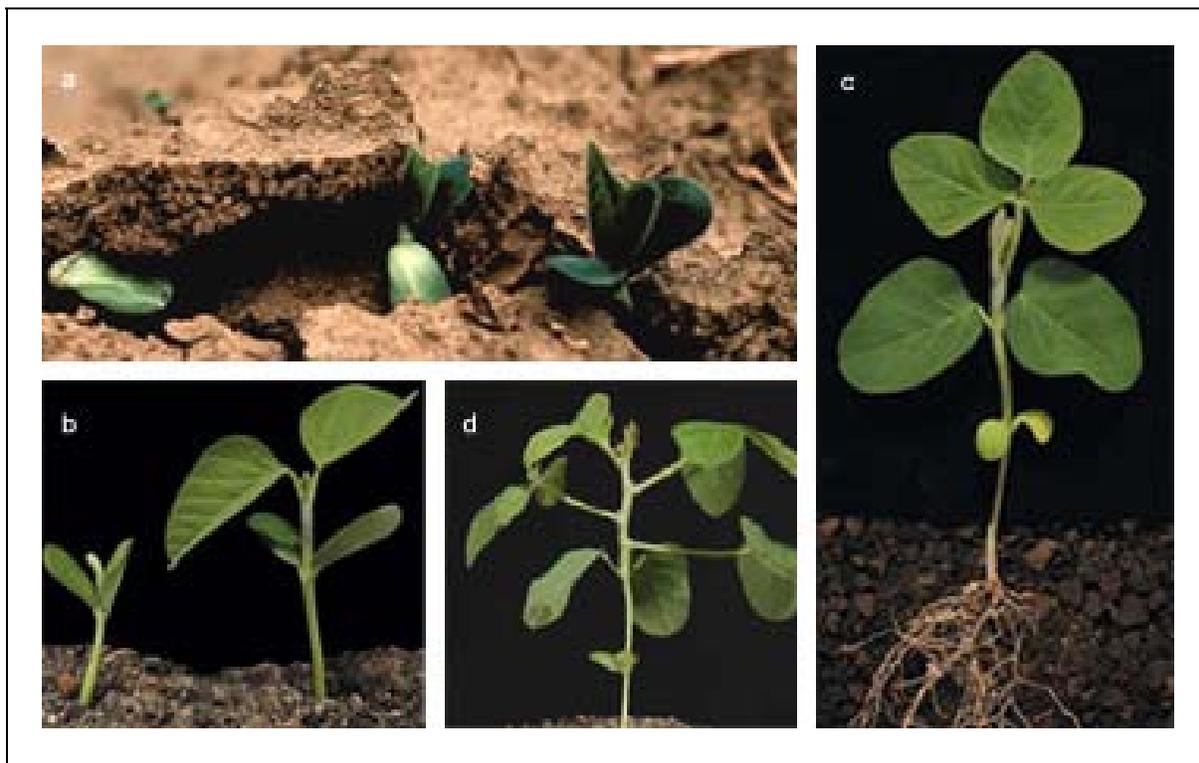


Figura I.3. Estados vegetativos de la soja

a: Estado de emergencia (VE). **b:** Estado cotiledonar (VC). **c:** 1° nudo (V1). **d:** n° de nudos (Vn)

Fuente: <http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/6250849/Crecimiento-de-la-soja.html>

El período crítico del cultivo comienza cuando ha finalizado la floración y cualquier situación de “stress” como el déficit hídrico, la escasez de nutrientes, la defoliación por orugas, enfermedades foliares, el ataque de chinches y el granizo, entre otras, afectará el número final de vainas y de granos, provocando la reducción del rendimiento.

Luego de R8, se necesitan cinco a diez días de tiempo seco (baja humedad relativa ambiente), para que las semillas reduzcan su humedad por debajo del 15% (Toledo, 2012).



Figura I.4. Estados reproductivos de la soja

a: Inicio de floración (R1). **b:** Plenitud de floración (R2). **c:** Inicio de formación de vainas (R3). **d:** Plenitud de formación de vainas (R4). **e:** Inicio de llenado de granos (R5). **f:** Plenitud de llenado de granos (R6). **g:** Inicio de maduración (R7). **h:** Plenitud de madurez (R8)

Fuente: <http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/6250849/Crecimiento-de-la-soja.html>

1.1.4. LA IMPORTANCIA DE LA SOJA EN EL COMPLEJO OLEAGINOSO

La soja es importante fundamentalmente para la alimentación, a través de su aceite y de su harina, encontrándose entre las ocho materias primas más relevantes del mundo. A nivel mundial se producen unos 20 millones de t de aceite de soja que es el más utilizado culinariamente (Sanz Pérez, 2007b).

La harina de soja se obtiene por molienda de las semillas. Tiene una composición aminoacídica que puede compararse con la proteína de referencia de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Se presenta en el mercado mundial bajo dos formas: bruta (con sus enzimas activas) y desactivada (cuyas enzimas se han destruido tratando a las semillas térmicamente). En la antigüedad, la harina bruta se utilizaba en el Reino Unido en la elaboración del pan comercial corriente, a cuya harina se le adicionaba soja en una concentración del 1-2%. En la actualidad y debido a la lipooxidasas que contiene se incorpora, a veces, como blanqueador de la harina de panificación. La harina desactivada se emplea en la formulación de algunos tipos de pasteles, tartas y galletas (Sanz Pérez, 2007b).

La semilla de soja es una legumbre de alto valor nutritivo. Contiene aproximadamente 10% de agua, 4 - 5% de minerales (principalmente potasio y fósforo) y una amplia variedad de componentes orgánicos, entre los que se destaca un elevado porcentaje de proteínas (35%) de alta calidad, que

aporta los 8 aminoácidos esenciales con excepción de la metionina. Tiene además, un 20% de grasas, que en su mayor parte son triglicéridos de ácidos grasos poliinsaturados, alrededor del 2 - 5% de fosfolípidos, principalmente en forma de lecitina, y pequeñas cantidades de otros lípidos en forma de esteroides (estigmasterol y sitosterol). Se encuentran también vitaminas del grupo B (tiamina, niacina y ácido pantoténico), E (tocoferoles) y A (carotenoides) (Herrera Castellón y Jiménez Fernández, 2007).

Otro de los componentes de la semilla son los derivados fenólicos, principalmente flavonoides y antocianinos. En el grupo de los flavonoides se destacan las isoflavonas genistina y daidzina (precursores de la genisteína y daidzeína, respectivamente), así como la glicitina. La genisteína y daidzeína son conocidas como fitoestrógenos, pues ejercen en el organismo efectos similares a los estrógenos de origen animal, habiéndose encontrado otros efectos beneficiosos para la salud, tales como su acción antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica y anticancerígena (Herrera Castellón y Jiménez Fernández, 2007).

La soja contiene hidratos de carbono solubles e insolubles. La fracción soluble está formada por oligosacáridos que confieren el sabor característico. También aporta una gran cantidad de minerales como potasio, calcio, magnesio, fósforo y hierro, así como pequeñas cantidades de otros iones (sodio, zinc, cobre, yodo y flúor) de gran importancia funcional para el hombre y los animales (Herrera Castellón y Jiménez Fernández, 2007).

Los beneficios que produce para el cuidado de la salud, hacen que la soja sea un alimento muy consumido por diferentes culturas, lo que genera una elevada demanda para los países productores, entre los que se encuentra la Argentina.

Además de ser un buen alimento para el hombre, es un pienso excelente para el ganado, ya que contiene, como se dijo previamente, todos los nutrientes necesarios para la vida: proteínas, grasas (lípidos), hidratos de carbono, vitaminas y minerales. Después de extraído el aceite de la semilla queda como residuo una porción sólida, la torta de soja, que se utiliza como pienso (Sanz Pérez, 2007b).

1.1.5. ORIGEN Y DIFUSIÓN EN EL MUNDO

Como ya se comentó, la soja es nativa del este asiático. Diferentes autores sugieren que es originaria de las zonas centro y norte de China. La primera cita referente a esta leguminosa se encuentra en el libro de las odas (siglo VI a.C.), donde se narra que la misma, procede de plantas silvestres de una misma especie, que se cultivaron por primera vez durante el reinado Chang (1783 a.C.). Los antiguos chinos la consideraban un alimento sagrado y atribuían su descubrimiento al emperador Sheng - Nung, forjador de la agricultura y la medicina (Sanz Pérez, 2007a).

Existen varias leyendas sobre el origen de este grano. Los chinos relatan que luego de una guerra entre dioses, nacen los cinco granos sagrados: soja, cebada, arroz, mijo y avena. Estos cinco granos han sido y son el alimento primordial del pueblo oriental y chino en particular. Desde China se difundió a Corea y Japón en distintas épocas, como así también, a Indonesia y Polinesia. A través de las Islas Molucas llegó a Indostán, Ceylán, Palestina y África del Norte (Sinavimo, 2010).

Las primeras plantaciones europeas de soja, meramente testimoniales, se realizaron hacia el 1700, en el “Jardin des Plantes” de París (Francia) y en el “Botanical Garden” de Londres (Reino Unido) (Sanz Pérez, 2007a).

El 11 de marzo de 1911, la Sociedad Nacional de Aclimatación de Francia, organizó unas jornadas para explicar, divulgar y demostrar sus excelentes propiedades nutritivas, pero no tuvieron la resonancia que se esperaba y pasaron desapercibidas. No obstante, desde el tercer decenio del siglo XIX la soja ya se cultivaba en ciertas regiones de la Rusia asiática (Sanz Pérez, 2007a).

En los EE.UU., el cultivo se inició en 1908 en las riberas del río Mississippi, pero se extendió y alcanzó gran importancia, en los Estados del medio oeste, después de la Primera Guerra Mundial, a fin de mejorar las tierras agotadas por el cultivo intensivo de maíz. Las raíces de esta leguminosa contienen nódulos que son verdaderos acúmulos de bacterias nitrificantes, que enriquecen el suelo en nitrógeno, uno de los elementos minerales más necesarios para el desarrollo de los cereales (Sanz Pérez, 2007a).

En 1925, la dirección del Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA), después de comprender el valor de la soja como restaurador de los suelos empobrecidos en nitrógeno, como alimento para el hombre y como pienso para los animales, dictó normas estableciendo las características comerciales que debía reunir esta legumbre (Sanz Pérez, 2007a).

En 1936, se fundó en el estado de Illinois una Estación Agrícola Experimental que disponía de campos para ensayos agrarios, y de laboratorios muy bien equipados para el análisis de suelos, de cosechas y de productos alimenticios derivados de la soja. Finalmente, esta Estación Experimental, solo se limitó a estudiar los aspectos agronómicos. Casi al mismo tiempo se fundó el Consejo Americano de la Soja (“American Soy Council”) dedicado a la promoción y comercio de esta legumbre (Sanz Pérez, 2007a).

En Brasil, fue introducida en 1882, pero su cultivo se difundió en el siglo XX. Su producción comenzó a comercializarse en 1940 y a partir de 1970, se intensificó e incrementó (Sinavimo, 2010).

1.1.6. IMPORTANCIA DE LA SOJA EN ARGENTINA

En Argentina las primeras plantaciones de soja se realizaron en 1862, pero no tuvieron repercusión. Recién, entre 1910 y 1920 se comenzaron a realizar estudios en Escuelas Agrícolas y ensayos en diferentes Estaciones Experimentales. En 1925, el Ministro de Agricultura de la Nación, Tomás Le Bretón, introdujo semillas de soja provenientes de Europa. Años más tarde, se llevaron a cabo ensayos con grupos de distintas variedades de esta planta. Los resultados fueron satisfactorios pero no obtuvieron la difusión requerida entre los productores (Illanes, 2003).

Un emprendimiento importante que dio comienzo a la investigación cada vez más intensa sobre este cultivo fue la fundación, en 1956, de la filial Agrosoja S.R.L. dependiente de la empresa privada Brant Laboratorios S.A., la que al mismo tiempo, realizó un convenio de investigación agrícola con la Dirección General de Investigaciones Agrícolas, organismo oficial específico (Sinavimo, 2010).

Como consecuencia del esfuerzo dedicado a la investigación, conocimiento y promoción del cultivo, la Argentina pudo exportar granos de soja por primera vez en 1962, con destino a Hamburgo. Durante estas primeras etapas de difusión del cultivo de soja, se destacó la industria aceitera argentina (Sinavimo, 2010).

En el año 1961 comenzaron los primeros ensayos de rendimiento, prácticas de manejo y cosecha mecánica de la soja en la Estación Experimental Agropecuaria Salta (Sinavimo, 2010).

La década del 70 marcó el despegue del cultivo en el país, debido a que comenzaron a superarse de manera ininterrumpida los rendimientos de campañas sucesivas, así como también la superficie sembrada. Como consecuencia de este fenómeno se produjo el auge exportador del complejo de la soja (Sinavimo, 2010).

Entre los años 1977/1997 se presentó una etapa de creciente y sostenido desarrollo, favorecido por el aumento de la superficie cultivada, la incorporación paulatina de tecnologías apropiadas (cultivares adaptados a cada ambiente particular, manejo cultural, mayor conocimiento de la fisiología del cultivo y manejo de plagas) que se obtuvieron como consecuencia de una constante investigación y transferencia de resultados por parte del sector científico. La producción pasó de 59.000 t en la campaña 1970/71 a 30 millones de t en la campaña 2001/2002. En el mismo período la superficie de siembra evolucionó de 37.700 ha a 11.600.000 ha, con un rendimiento promedio de 2600 kg/ha (Vallone y col., 2007).

Contribuyeron, además, a la expansión de este cultivo: a) en 1971, la soja pasó a formar parte del grupo de especies fiscalizadas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, lo que permitió el desarrollo de numerosos ensayos de campo tendientes a mejorar la calidad industrial del grano, la resistencia a enfermedades y la productividad y el manejo del cultivo en general; b) en 1972, el Poder Ejecutivo la declaró de interés nacional; c) en 1996, la aprobación de la producción comercial de soja transgénica resistente a herbicidas y el desarrollo de nuevas técnicas de manejo de los cultivos, tal como la siembra directa, ayudaron a definir el establecimiento de esta labranza (Sinavimo, 2010).

Estos acontecimientos fueron el motor de la expansión de la frontera agrícola, la que puede llamarse como la “agriculturización” del campo argentino (Sinavimo, 2010).

En la actualidad, la soja se cultiva en una amplia zona de la Argentina (Figura I.5), desde los 23° hasta los 38° de latitud sur, estando concentrada, en un 95%, en el norte de la región pampeana (provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires, La Pampa y San Luis). El 5% restante, se encuentra en la región norte del país (provincias de Tucumán, Salta, Santiago del Estero, Catamarca, Jujuy, Chaco, Formosa y Misiones) (Vallone y col., 2007).

Es el principal sembradío del país, colocando a la Argentina, en el tercer lugar mundial entre los exportadores de la misma y como el principal proveedor internacional de su aceite y derivados de la harina. La cosecha argentina 2009/2010 fue de 53 millones de t lo que casi duplicó la cosecha 2008/2009 de 32 millones de t (Bull Spread, 2010). Además en la campaña 2009/2010 se alcanzó una superficie histórica del grano, que llegó a 18,5 millones de ha (Reuters, 2010).

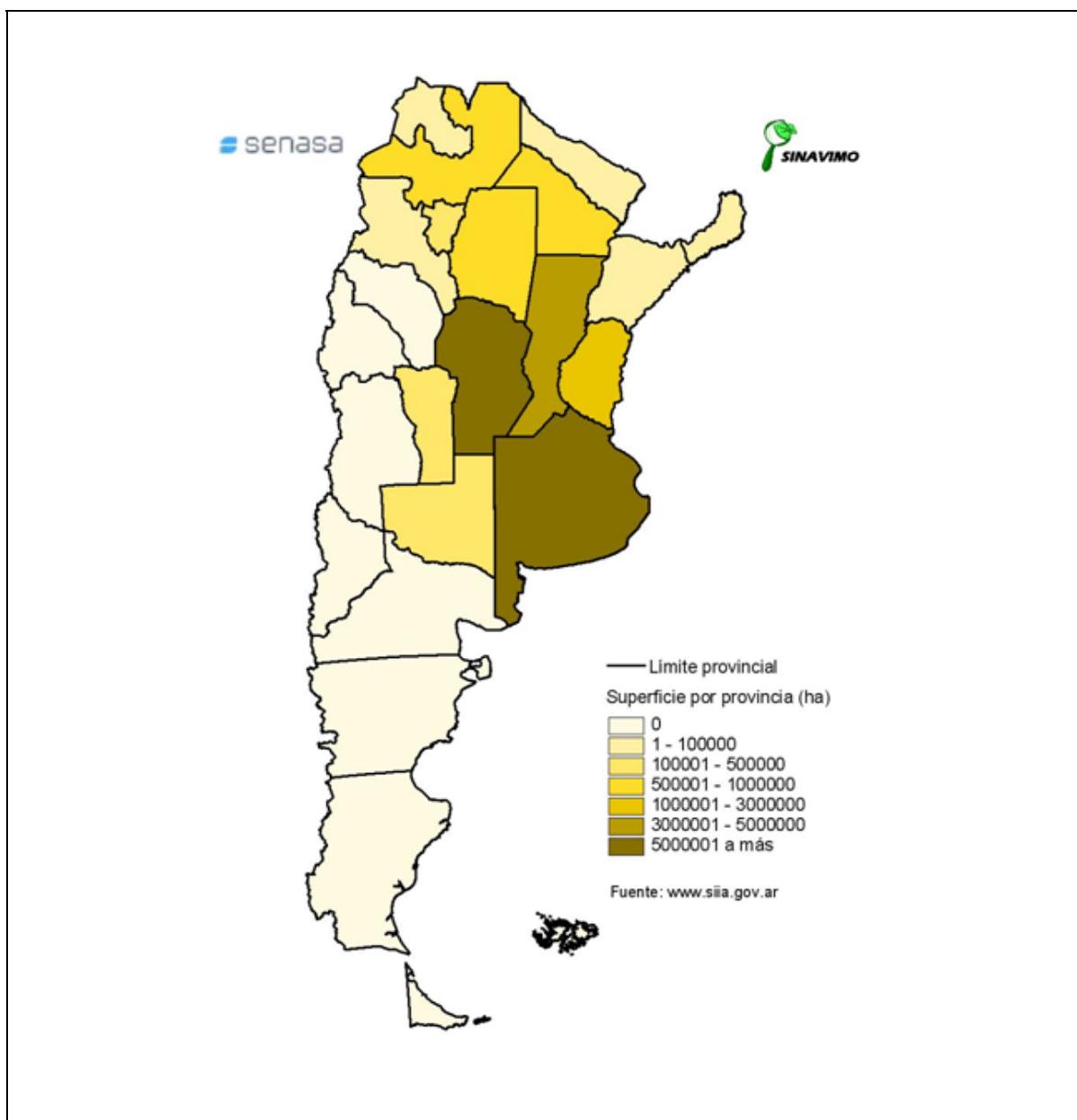


Figura I.5. Zonas productoras de soja en Argentina (2010)

Fuente: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/soja>

1.1.7. EL CULTIVO DE SOJA EN LA PROVINCIA DE SANTA FE

Santa Fe es una de las principales provincias que contribuye, año tras año, con el marcado progreso agrícola de Argentina. Su participación relativa como productora de soja, para la campaña 2008/09, fue del 26% (Figura I.6), siendo la superficie sembrada de 3.440.864 ha (Tabla I.1) (Sinavimo, 2010).

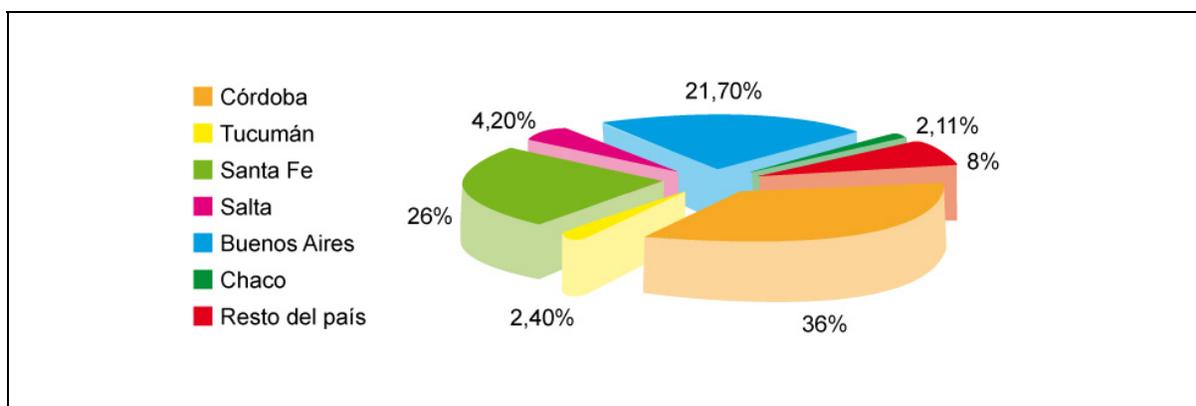


Figura I.6. Participación porcentual de las principales provincias productoras de soja. Campaña 2008/2009

Fuente: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/soja>

Tabla I.1. Superficie sembrada con soja según la provincia. Campaña 08/09

Superficie (ha) sembrada con soja. Campaña 08/09	
Buenos Aires	5.443.537
Córdoba	5.196.748
Santa Fe	3.440.864
Entre Ríos	1.241.400
Chaco	703.070
Tucumán	628.660
Salta	575.300
La Pampa	300.000
Santiago del Estero	293.220
San Luis	125.000
Catamarca	50.000
Corrientes	20.000
Jujuy	8.250
Formosa	6.100
Misiones	656
Total Nacional	18.012.805

Fuente: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/soja>

1.2. ENFERMEDADES DE LA SOJA

El cultivo de soja se ve afectado por enfermedades que varían su intensidad en función del estado fenológico, la región, las condiciones climáticas de cada campaña y las estrategias de manejo utilizadas. Algunas de ellas están difundidas en toda el área productiva, mientras que otras sólo se presentan en regiones con características particulares (Distéfano y Gadbán, 2008).

Debido a la expansión de este cultivo, las enfermedades se han incrementado en número y severidad. Muchas de ellas se han distribuido mediante el intercambio de germoplasma. Se calcula que a nivel mundial las pérdidas de rendimiento que ocasionan, oscilan entre el 10 y el 15% (EEA INTA Pergamino, 2008).

En 1980, sólo en EE.UU, las pérdidas por enfermedades fueron estimadas en 7 millones de t, con un valor aproximado de 135-140 millones de dólares (Sinclair y Backman, 1989). Entre las enfermedades que ocasionaron la mayor cantidad de plantas muertas por ciclo de cultivo, se encuentran las provocadas por *Macrophomina* sp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp. y *Phomopsis* sp., que tienen importancia económica en otros países productores (Cabrera y col., 2004).

El panorama fitosanitario actual de Argentina es diferente al de hace más de 20 años donde la soja era considerada como un cultivo sano. Hongos, bacterias y virus fitopatógenos son responsables de elevadas pérdidas de calidad y rendimiento. Los daños causados, anualmente, alcanzan del 8 al 10% del total de la producción (EEA INTA Pergamino, 2008).

En los últimos años se ha observado un incremento, no solo de las enfermedades provocadas por patógenos que afectan hojas, tallos, vainas y semillas sino también las ocasionadas por aquellos que habitan en el suelo. Dentro del primer grupo se encuentran los agentes causales que se llevan o transmiten por lotes de semillas, como por ejemplo *Colletotrichum truncatum*, causante de la antracnosis; *Peronospora manshurica*, causante del mildiu; *Corynespora cassiicola*, causante de la mancha anillada; *Myrothecium roridum*, causante de la mancha foliar y *Sclerotinia sclerotiorum*, causante de la podredumbre húmeda del tallo. Entre los hongos que se encuentran en el segundo grupo, merecen citarse diferentes especies de *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfisii*, *Pythium* spp. y *Phytophthora sojae* que provocan podredumbre de raíces y base del tallo (Scandiani y Luque, 2009).

Sin embargo, las enfermedades prevalentes son: la mancha marrón, debido a *Septoria glycines*; el tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla causadas por *Cercospora kikuchii*; mancha ojo de rana provocada por *Cercospora sojina*, roya de la soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* y el tizón del tallo y de la vaina y podredumbre de la semilla ocasionados por *Phomopsis phaseoli* y *P. longicolla* respectivamente (Couretot e Ivancovich, 2009; del Pino, 2010).

1.2.1. ENFERMEDADES DE FIN DE CICLO (EFC)

Las EFC de la soja involucran aquellas que se presentan en los estadios reproductivos intermedios-avanzados ocasionando defoliación prematura y madurez anticipada del cultivo (Couretot y col., 2009). Según los especialistas, son responsables de severas reducciones en el rendimiento y la calidad, con el consecuente impacto negativo en la producción y rentabilidad del cultivo (del Pino, 2010).

En los últimos años, las EFC se han incrementado debido al cambio en las prácticas de manejo del cultivo, a la falta de rotaciones, al uso de germoplasma de escasa variabilidad y por condiciones climáticas específicas (EEA INTA Pergamino, 2008; Distéfano y Gadbán, 2009a; Couretot y col., 2010).

En Argentina, las EFC son, como ya se comentó, la mancha marrón de la hoja (*Septoria glycines*), el tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla (*Cercospora kikuchii*), y la mancha ojo de rana (*C.*

sojina). La prevalencia de una u otra depende de las condiciones de manejo del cultivo y de las características climáticas de la zona en consideración (Couretot e Ivancovich, 2009; Formento, 2012).

El tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla está globalmente muy difundida. Se describió por primera vez en Corea en 1921. El organismo causal es *C. kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner (sinónimo *Cercosporina kikuchii* Matsumoto & Tomoyasu) (Figura I.7.). En Argentina, en la región central de la Provincia de Santa Fe, desde el año 2000, el aumento de la prevalencia del tizón por este fitopatógeno, fue motivo de gran preocupación (Ivancovich y Botta, 2000; Distéfano y Gadbán, 2009a; del Pino, 2010).

Los tallos, hojas y vainas pueden verse afectados, presentando coloraciones rojizas. En ambas caras de la hoja aparecen lesiones angulares o irregulares, que pueden coalescer, formando áreas necróticas. También presentan necrosis y coloración púrpura rojiza en las nervaduras (Rupe y Hartman, 1999). Las plantas muy afectadas pierden gran cantidad de follaje lo que adelanta su maduración sin el llenado correcto de vainas y las semillas disminuyen su germinación. En las simientes se observa la presencia de manchas de color púrpura, acompañadas, frecuentemente, de agrietamiento en el tegumento. No siempre la semilla infectada presenta manchado, a veces puede ser asintomática (Formento y Daverio, 2002).

C. kikuchii sobrevive en los restos de plantas afectadas y en las simientes, las que aún siendo asintomáticas se transforman en portadoras, constituyéndose en reservorios de este patógeno (Hartman y col., 1999).

La infección tiene lugar durante el período de floración, aunque se puede iniciar en el estado de emergencia (VE); el viento y el salpicado de lluvia son agentes de diseminación del hongo, iniciando las infecciones secundarias (Dunleavy, 1988). Prolongados períodos con temperaturas de 28 a 30°C y alta humedad favorecen el desarrollo de la enfermedad (Ivancovich y Botta, 2000).



Figura I.7. a y b: Tizón de la hoja. **c:** mancha púrpura de la semilla ocasionada por *Cercospora kikuchii*

Fuente: **a y b:** Observación personal, **c:** <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-enfermedades/cercospora-kikuchii-01.htm>

La mancha ojo de rana (MOR), es una enfermedad de distribución mundial, habiendo sido descrita por primera vez, en 1915, en Japón (Sweets, 2001). En China se la responsabilizó de enormes pérdidas en la producción de soja (Cao y col., 2003). En Argentina, ha sido detectada en diferentes zonas del país (Distéfano y Gadbán, 2009b; Carmona y col., 2010). El agente responsable de esta patología es *Cercospora sojina* Hara (Figura I.8).

Es una enfermedad de ubicación foliar pudiéndose presentar además en tallos, vainas y semillas. La infección puede ocurrir en cualquier estado fenológico del cultivo, sin embargo los síntomas se observan normalmente después de la floración y se hacen más evidentes a partir de R3 (inicio de formación de vainas) (Fehr y col., 1971).

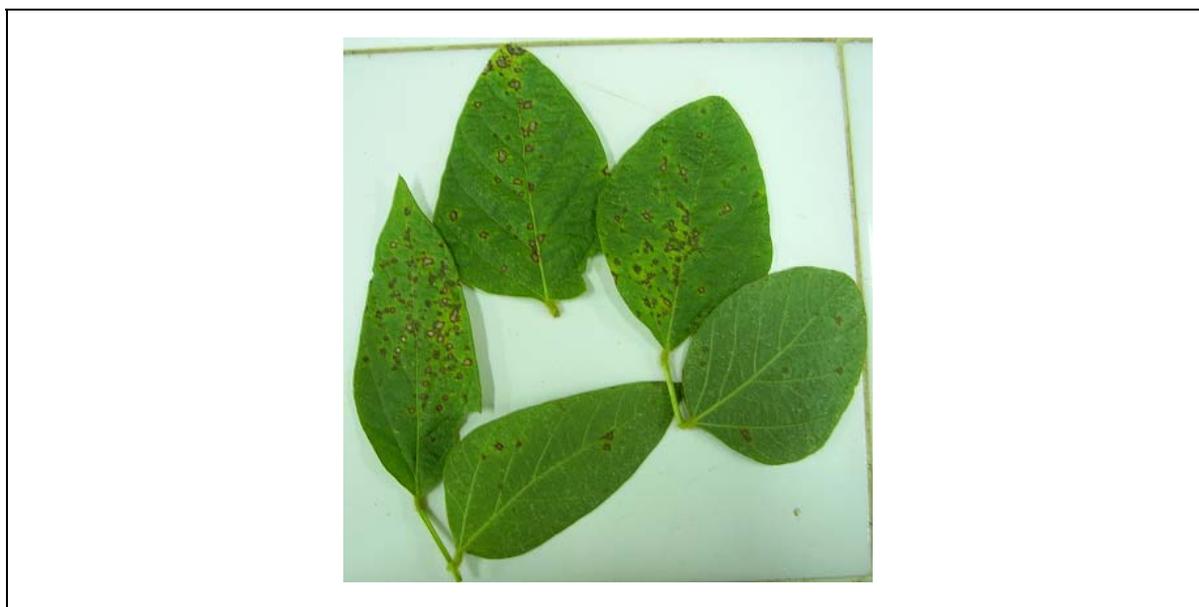


Figura I.8. Mancha ojo de rana ocasionada por *Cercospora sojina*

Fuente: Observación personal

Las lesiones inicialmente aparecen en el haz de las hojas, observándose pequeñas manchas circulares o angulares de 1 a 5 mm de diámetro, de color castaño rojizo o gris oscuro. Cuando la enfermedad avanza, las partes centrales se tornan más claras y grises, rodeándose de un delgado margen marrón rojizo y a diferencia de otras enfermedades foliares, carecen de halo clorótico. En condiciones ideales para la infección y altos niveles de inóculo, las lesiones adyacentes pueden coalescer y formar áreas necróticas grandes e irregulares de hasta 10 mm de diámetro (Carmona y col., 2010).

Eventualmente, pueden cubrir más del 30% de la superficie foliar, dando la apariencia del tizón y causando defoliación prematura. Bajo condiciones de humedad, desarrollan puntos oscuros (estromas) con producción de conidióforos. Es muy común observar las lesiones perforadas a modo de agujeros, lo que genera una gran pérdida del área foliar. En tallos y vainas son menos frecuentes y generalmente aparecen tardíamente, al final del ciclo del cultivo (Carmona y col., 2010).

Las semillas contaminadas pueden ser asintomáticas o mostrar síntomas variados, oscuras, arrugadas y resquebrajadas con desarrollo de áreas de color gris claro a gris oscuro o marrón, de tamaño y formas variables (Carmona y col., 2010).

Entre las condiciones predisponentes para el desarrollo y diseminación del hongo, se destaca su capacidad de sobrevivir en los restos de cultivo y en forma de micelio en semillas infectadas. Las temperaturas elevadas y la humedad, conducen a la formación de sus conidios que son transportados, al igual que otros hongos, a corta distancia, por el aire y por el salpicado de las gotas de lluvia (Couretot e Ivancovich, 2009)

Una vez introducido el patógeno en un área, el rastrojo constituye la principal fuente de inóculo primario; en los residuos de soja, el patógeno permanece viable como micelio en estado saprofítico entre ciclos de cultivo. Por ese motivo en noviembre-diciembre de 2009, la enfermedad se manifestó temprano, en estados vegetativos entre V6 y V8, debido a la siembra directa de soja y al monocultivo, que favorecieron la ocurrencia de la misma (Carmona y col., 2010).

El momento de aparición de los síntomas es distinto para ambas enfermedades; *C. sojae* puede aparecer en estados vegetativos muy tempranos (V2-V3) y luego desaparecer para resurgir en estadios reproductivos tempranos (R2-R3), por este motivo algunos autores no la consideran una EFC (Soda, 2010). *C. kikuchii* presenta sus síntomas en estados reproductivos algo más avanzados (R4). Tiene un periodo de latencia prolongado, es decir, desde el momento de la infección al momento de la aparición de los síntomas transcurre bastante tiempo. Esto es importante, según muchos fitopatólogos, debido a que la enfermedad estaría produciendo daño sin síntomas visibles (Soda, 2010).

1.3. GÉNERO *CERCOSPORA*

El género *Cercospora* Fresen. fue descrito por primera vez por Fresenius y es uno de los géneros de *Hyphomycetes* más grandes y heterogéneos. Las especies que pertenecen a este patógeno de plantas están ampliamente distribuidas y la mayoría de ellas causan lesión en las hojas (Crous y Braun, 2003).

Durante mucho tiempo, *Cercospora apii* Fresen, fue considerada la especie tipo de *Cercospora*. Es el nombre más antiguo para un gran complejo de taxones morfológicamente indistinguibles, caracterizados por tener conidióforos septados, marrones, solitarios o fasciculados, usualmente largos, con locus conidiógenos espesos y oscuros y conidios largos, aciculares, hialinos, pluriseptados y solitarios (Figura I.9) (Crous y Braun, 2003).

A los taxones de este complejo se los consideró hospedante específico, lo cual condujo a la descripción de un gran número de especies (Chupp, 1954).

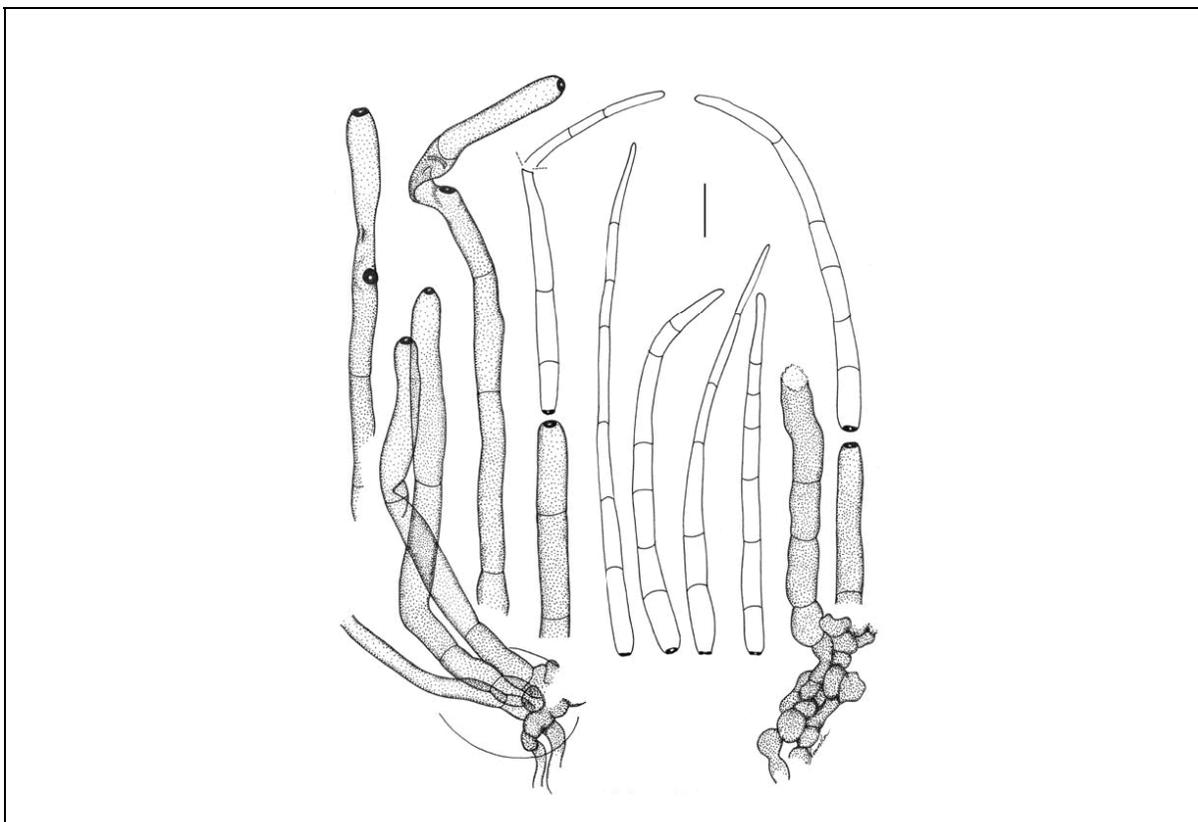


Figura I.9. Ilustración de la especie tipo *Cercospora apii*

Fuente: <http://www.scielo.org.ve/img/fbpe/rfaz/v24n3/art01fig1.gif>

Dentro del género *Cercospora* se han nombrado más de 3000 especies. Recientemente ese número fue reducido a 659, con 281 especies consideradas morfológicamente indistinguibles de *Cercospora apii* (Crous y Braun, 2003, Groenewald, 2007).

Por su parte, Ellis analizó *C. apii* en detalle y redujo un gran número de nombres a sinónimos de esta especie, pero años más tarde, habiendo profundizado su estudio, describió e ilustró nuevamente, la mayoría de ellas como especies separadas (Ellis, 1976).

C. apii tiene un amplio rango de hospedantes y está, a menudo, compuesta de numerosas razas con diferentes adaptaciones biológicas, lo que la hace taxonómicamente problemática. La solución para este complejo sería la de considerar las razas morfológicamente indistinguibles como “razas compuestas” (Crous y Braun, 2003).

Otro problema en el complejo *C. apii*, es la relación anamorfo/teleomorfo, ya que no se conoce su teleomorfo. Se han postulado unas pocas asociaciones con especies de *Mycosphaerella*, como por ejemplo, *M. papuana* Sivan y *M. gossypina* (Cooke) Everh, pero esto no ha sido comprobado en cultivo (Crous y Braun, 2003).

1.3.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *CERCOSPOORA*

La clasificación taxonómica del género *Cercospora* según la base de datos MycoBank MB7545 “Fungal Databases Nomenclature and Species Banks” es:

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Subphylum: *Pezizomycotina*

Clase: *Dothideomycetes*

Subclase: *Dothideomycetidae*

Orden: *Capnodiales*

Familia: *Mycosphaerellaceae*

Género: *Cercospora*

1.3.2. CERCOSPORINA Y SU ROL EN LA PATOGÉNESIS

Los hongos fitopatógenos utilizan múltiples estrategias para infectar las plantas hospedantes, como por ejemplo la producción de toxinas. Un grupo muy interesante de estas toxinas son las perilenoquinonas, entre las que se encuentra la cercosporina.

1.3.2.1. La cercosporina

La cercosporina 1,12-bis(2-hydroxypropyl)-2,11-dimethoxy-6,7-methylenedioxy-4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone es una toxina de color rojo, poco soluble en agua y soluble en álcalis y diversos solventes orgánicos. Fue aislada por primera vez en 1957 (Kuyama y Tamura, 1957) a partir del micelio de *C. kikuchii* y posteriormente, de un gran número de otras especies de *Cercospora* y de plantas infectadas por este género fúngico (Assante y col., 1977; Fajola, 1978).

Posee una amplia toxicidad causando, aún en concentraciones micromolares, la muerte de células de plantas, ratones, bacterias, hongos y cultivos de células tumorales humanas (Daub y Ehrenshaft, 1993). Las especies de *Cercospora* producen, “in vitro” y en presencia de luz, concentraciones de cercosporina del orden de los milimolares. Como se verá más adelante, a pesar de este hecho, no son afectadas, debido a que han desarrollado mecanismos de defensa (Daub y Ehrenshaft, 1993).

1.3.2.2. Mecanismo de acción

Es una molécula pequeña (PM: 534,5) de toxicidad no específica, que pertenece a un gran grupo de compuestos denominados fotosensibilizadores. Éstos se caracterizan por activarse en presencia de la luz (en longitudes de onda del visible) y generar especies activadas del oxígeno, tóxicas para las células vivas de ciertos organismos (Daub y Ehrenshaft, 2000).

Cuando los fotosensibilizadores en fase inactiva (0S) absorben energía luminosa, se transforman en un estado de triplete electrónicamente activado (3S). Aunque éste puede reaccionar directamente con biomoléculas, como los lípidos, la mayor toxicidad se atribuye al efecto de los derivados del oxígeno, generados por dos vías que involucran la reacción del fotosensibilizador activado (3S) y el oxígeno (Daub y Ehrenshaft, 2000).

La primera vía se produce a través de una reacción de transferencia de electrones desde un agente reductor (R) hacia el triplete excitado (3S) tornándolo activo (S^-) contra el oxígeno, reacción conocida como de Tipo I y que resulta en la producción de formas reducidas y radicales del oxígeno como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH) (Daub y Ehrenshaft, 2000).

La reacción de Tipo II, o segunda vía, se produce cuando el triplete activado reacciona directamente con el oxígeno vía transferencia de energía para producir la forma más tóxica, pero no radical, de oxígeno: el “singlet” (1O_2), regenerando el estado basal del fotosensibilizador (0S) (Daub y Ehrenshaft, 2000).

La cercosporina es un potente productor de 1O_2 , poco común en el metabolismo celular, por lo que las células habitualmente no lo toleran. No ocurre lo mismo con las formas radicales del O_2 (O_2^- , H_2O_2 y OH) para las que, como son generadas por reacciones enzimáticas durante el metabolismo normal, existen numerosas defensas celulares (Dobrowolski y Foote, 1998).

1.3.2.3. Rol de la cercosporina en las enfermedades causadas por *Cercospora*

El hongo penetra en la planta a través de los estromas y coloniza los espacios intercelulares de las hojas. Dado que necesita un mecanismo para obtener nutrientes, es ahí en donde la cercosporina juega un papel preponderante para su supervivencia (Daub y Ehrenshaft, 2000).

En presencia de la luz, se activan los genes del hongo que codifican la síntesis de la toxina que absorbe energía y produce las reacciones anteriormente mencionadas. El oxígeno “singlet” generado ocasiona la peroxidación de lípidos y la destrucción de las membranas celulares (Daub y Chung, 2009).

Este mecanismo de ruptura celular provee al hongo de más espacio para seguir desarrollándose y de los nutrientes necesarios para su crecimiento y esporulación en el hospedante (Daub y Ehrenshaft, 2000).

1.3.2.4. Resistencia del hongo

A pesar de la toxicidad generalizada de la cercosporina, especies de *Cercospora* han desarrollado sofisticados mecanismos de resistencia asociados con una reducción temporal de la toxina, tales como la disminución de oxígeno “singlet”, exportación de la toxina y otras funciones, aún desconocidas, que les permiten tolerar la toxicidad de la cercosporina que ellas mismas producen (Daub y Chung, 2009).

Al respecto, se han planteado y tratado de demostrar varias hipótesis:

Daub y Ehrenshaft (2000) sostienen que como el hongo secreta el compuesto y lo utiliza de forma activa para la infección, una detoxificación irreversible o una compartimentalización de la cercosporina serían improbables como posibles mecanismos de resistencia.

Por su parte, Callahan y col. (1999), proponen que una proteína de transmembrana, codificada por el gen *cfp* de *C. kikuchii*, de 65.4 kDa, denominada CFP (“Cercosporin Facilitator Protein”) actuaría como un transportador de la cercosporina contribuyendo tanto con la resistencia del hongo hacia la toxina, como con su virulencia, ya que mutantes del hongo carentes de este gen mostraron una notable disminución en la producción de cercosporina, un incremento en la sensibilidad del hongo a la toxina y una disminución de la virulencia en el hospedante. Además, cuando estas cepas mutantes

fueron co-transformadas con el gen *cfp* intacto, se restablecieron los niveles de producción de toxina, virulencia y resistencia en comparación con las cepas salvajes (Callahan y col., 1999).

Otra de las hipótesis sostenida por Sollod y col. (1992), propone que las especies de *Cercospora* resisten a la cercosporina, gracias a su potencial de membrana, que la reduce de manera momentánea a una forma no-tóxica. Esta conclusión se basa en la observación de que, en presencia de la toxina, las hifas de los hongos resistentes a la misma emiten una fluorescencia verde característica de la cercosporina reducida (incapaz de absorber luz y fotoactivarse) y que las de los hongos sensibles emiten la correspondiente a cercosporina (fluorescencia roja). Además proponen que el compuesto reducido, una vez fuera del micelio, se reoxida espontáneamente siendo así tóxico para las células del hospedante (Daub y col., 1992; Daub y Ehrenshaft, 2000) (Figura I.10).

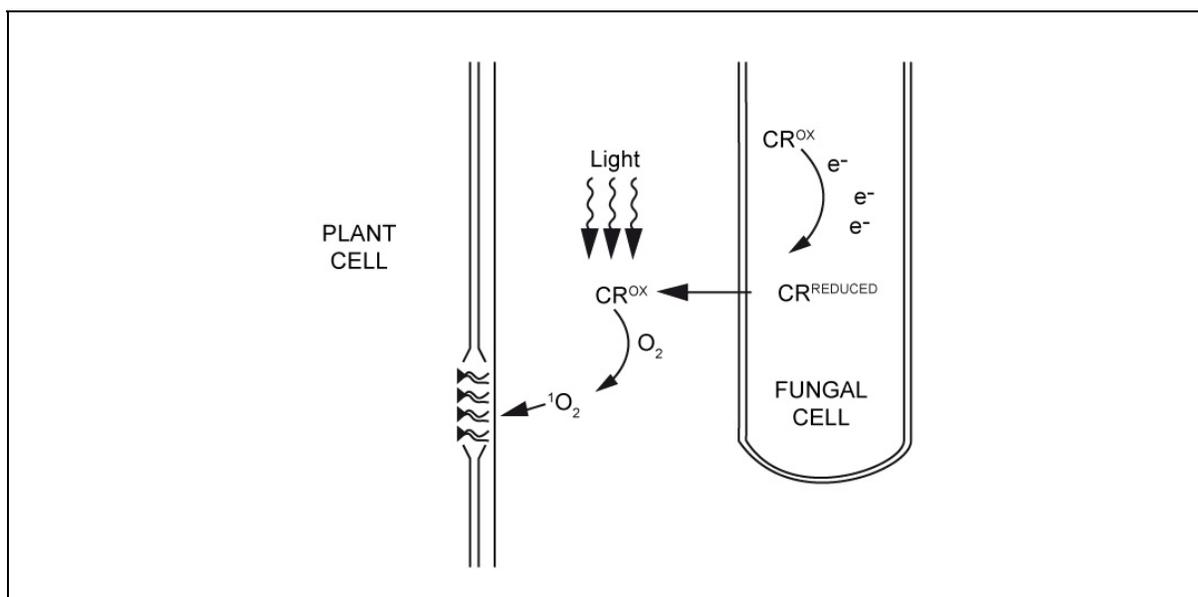


Figura I.10. Mecanismo de resistencia de *Cercospora* a la cercosporina basado en una reducción momentánea de la toxina

Fuente: Daub y Ehrenshaft (2000)

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como se comentó en el capítulo anterior, la soja (*Glycine max* L. Merr.) ha sido el cultivo de más rápida adopción y expansión en la historia de la agricultura de Argentina. Actualmente, es el principal producto de la agricultura nacional, por su participación en el valor total de la producción y de las exportaciones.

En la región central de la Provincia de Santa Fe, en los últimos años, la prevalencia del tizón por *Cercospora* ha aumentado considerablemente, siendo motivo de gran preocupación (Sillón, 2008). A esto se le debe sumar la epidemia de MOR detectada en el sur-oeste de Santa Fe a partir de la campaña 2008-2009 (Carmona y col., 2010).

MOR, en Argentina, ha sido detectada en diferentes zonas del país. *C. sojina* presenta una elevada variabilidad, lo que provoca la existencia de diferentes razas fisiológicas, habiéndose identificado 22 razas en Brasil y 14 en China (Carmona y col., 2010).

Tradicionalmente la identificación de las especies fúngicas, se ha basado en criterios taxonómicos clásicos como son las características morfológicas y de cultivo. Debido a su variabilidad fenotípica, esta identificación, en muchas ocasiones, resulta dificultosa. A estas limitaciones de los caracteres taxonómicos clásicos se suman los problemas en la denominación de las especies, debido a la costumbre de designar los nombres de las distintas especies atendiendo casi exclusivamente al tipo de hospedante de donde fue aislada por primera vez. Otro aspecto complejo es tratar de compatibilizar el comportamiento de los hongos en los cultivos de laboratorio, con el que presentan en los sustratos naturales de los cuales fueron aislados (Gams y col., 1987). Un ejemplo es *C. kikuchii* que forma conidios más fácilmente sobre el sustrato natural y mucho menos cuando se cultiva, en laboratorio, sobre medios agarizados (Crous y Braun, 2003).

Aunque los criterios taxonómicos clásicos siguen siendo la base para la separación entre especies, en la actualidad, se han incorporado nuevas técnicas que permiten disponer de un mayor número de caracteres y pueden ser utilizadas en la identificación de las especies de los géneros fúngicos (Macías Figueroa y col., 2006; González Salgado, 2010).

El diagnóstico de las enfermedades en las plantas se realiza siguiendo una serie de pasos que comienzan por identificar la planta afectada, examinar el área de cultivo, determinar los síntomas primarios y los signos de la enfermedad para concluir con el aislamiento e identificación del agente causal (Sillón e Ivancovich, 2004). La expresión visible de la enfermedad (síntomas) no siempre ofrece un diagnóstico seguro ya que diferentes agentes pueden producir síntomas similares. Por el contrario, los signos que son las estructuras que el patógeno produce como parte de su crecimiento, permiten realizar un diagnóstico más seguro al ser correctamente identificados (Sillón e Ivancovich, 2004).

Sin embargo, muchas veces la observación de los síntomas y/o de los signos suele ser insuficiente para alcanzar un resultado certero y se requieren técnicas de laboratorio para la identificación del agente causal (Sillón e Ivancovich, 2004). Los enzimoanálisis, así como las técnicas moleculares (PCR), son conocidos y utilizados por la mayoría de los sectores implicados en el control de algunas patologías en vegetales, ya que las mismas producen grandes pérdidas económicas en los cultivos (Rangel y col., 2006; Macías Figueroa y col., 2006).

Este trabajo se sustenta en la hipótesis de que la incorporación de técnicas moleculares facilitaría la caracterización de *Cercospora* aisladas de la soja. Esto permitiría llevar a cabo estudios epidemiológicos de manera de que si se detectaran cepas con algunas variaciones genéticas fuera posible confeccionar un "mapa" agrupándolas por regiones según sus características genéticas (clones). Por otra parte, el desarrollo de una metodología que permita la detección precoz del patógeno en la planta aportaría grandes beneficios.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

La incorporación de técnicas de taxonomía molecular para caracterizar y determinar las características poblacionales de las cepas de hongos fitopatógenos y el diseño y uso de estrategias que permitan detectarlos en forma precoz, revisten considerable importancia teórica y práctica. Se pretende contribuir al fortalecimiento de los programas específicos de monitoreo y control de plagas en vegetales que se cultivan en la provincia de Santa Fe.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y determinar las características fenotípicas de especies de *Cercospora* que producen patología en las plantas de soja, cultivadas en la provincia de Santa Fe.
- Caracterizar molecularmente la población de cepas de *Cercospora*, aisladas de soja de la región, mediante: a) la amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR); b) RAPD-PCR y c) la amplificación, por PCR, de regiones intergénicas (ITS) de ADNr, su posterior análisis mediante RFLP (RFLP-PCR) y su secuenciación.
- Establecer la relación filogenética entre las cepas aisladas.
- Confeccionar un "mapa" delimitando regiones según las diferentes especies aisladas o los clones de una misma especie.
- Desarrollar métodos de detección precoz de especies de *Cercospora* en plantas de soja.

CAPÍTULO III

AISLAMIENTO, CULTIVO, CONSERVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS HONGOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BASES PARA LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *CERCOSPORA*

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas, cuya formación puede ser inducida mediante las técnicas de cámara húmeda y/o aislamiento sobre medios agarizados (Agrios, 1997; Bergamin Filho y col., 1995).

La observación tanto de las características macroscópicas de la colonia como microscópicas de las estructuras producidas y el uso de claves taxonómicas son herramientas necesarias para determinar el género y la especie de un hongo.

Las especies de *Cercospora*, así como las de otros hongos fitopatógenos, han sido tradicionalmente identificadas en función de criterios taxonómicos clásicos como son la forma y el tamaño de los conidios, la morfología y el color de sus colonias y la velocidad de crecimiento (Martínez Culebras, 1999).

1.1.1. *CERCOSPORA KIKUCHII* (MATSUMOTO & TOMOYASU) M. W. GARDNER

C. kikuchii presenta, sobre medios agarizados, un micelio denso con pliegues radiales desde el centro de la colonia. Las mismas son blancas en el borde y verde oliva grisáceo en el centro y usualmente, elabora un pigmento de color rojo-púrpura que difunde en el medio (Murakishi, 1951; Hartman y col., 1999). Aunque *C. kikuchii* no esporula bien sobre medios artificiales, sobre el tejido de las plantas infectadas y bajo condiciones de alta humedad y temperaturas de 23-27°C esporula abundantemente (Murakishi, 1951). Los conidios son hialinos, aciculares, multiseptados, rectos a curvados, de base trunca y de 50-375 x 2,5-5 µm (Chupp, 1954). Los conidióforos son normalmente fasciculados, no ramificados, multiseptados, marrones, uniformes en color o pálidos en la punta, y de 45-220 x 4-6 µm (Chupp, 1954).

1.1.2. *CERCOSPORA SOJINA* HARA

Este hongo produce conidióforos y conidios que se forman en el centro de las lesiones. Los conidióforos son de color marrón claro a marrón oscuro, con 1-4 septos, rectos o sinuosos, no ramificados, fasciculados con 1-12 geniculaciones y miden 52-120 x 4-6 µm. Los conidios tienen de 1-10 o 3-13 septos, son hialinos, cilíndricos, elongados, fusiformes, raramente aciculares, de 40-60 x 6-8 µm y truncados en la base (Carmona y col., 2010). En Argentina, se han descrito conidióforos de hasta 203 µm de longitud y conidios de 1- 9 septos que midieron 26-111 x 5,2-7,4 µm (Carmona y col., 2009). Por su parte, Formento y de Souza también detectaron conidios de mayor tamaño que el reportado por la literatura internacional (Carmona y col., 2010).

1.2. RED DE INFORMACIÓN DE INTERÉS AGRONÓMICO. PROGRAMA RiA

El Programa RiiA es desarrollado de manera conjunta por la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Litoral), la Estación Experimental Rafaela del INTA y profesionales de Empresas, Cooperativas e Instituciones vinculadas a la producción agrícola de la región centro-norte de la Provincia de Santa Fe.

Los integrantes del Programa, realizan un seguimiento semanal de forma sistematizada de los cultivos agrícolas con el objetivo de prevenir o detectar en forma temprana situaciones adversas que dificulten el normal desenvolvimiento de los mismos y poder realizar las comunicaciones de alerta y las recomendaciones necesarias para corregir o atenuar los efectos adversos detectados (Frana y col., 2005).

Las Regiones (R) son grandes áreas "isoagronómicas" definidas a fin de facilitar los estudios y seguimientos que se llevan a cabo (Frana y col., 2005). Algunas regiones incluyen varias localidades (Figura III.1):

- R1: Margarita
- R2: Gobernador Crespo
- R3: San Justo - Videla
- R4: Emilia - Llambi Campbell
- R5: Pilar - Franck - Humboldt - Esperanza
- R6: Villa Trinidad - Freyre - Porteña.

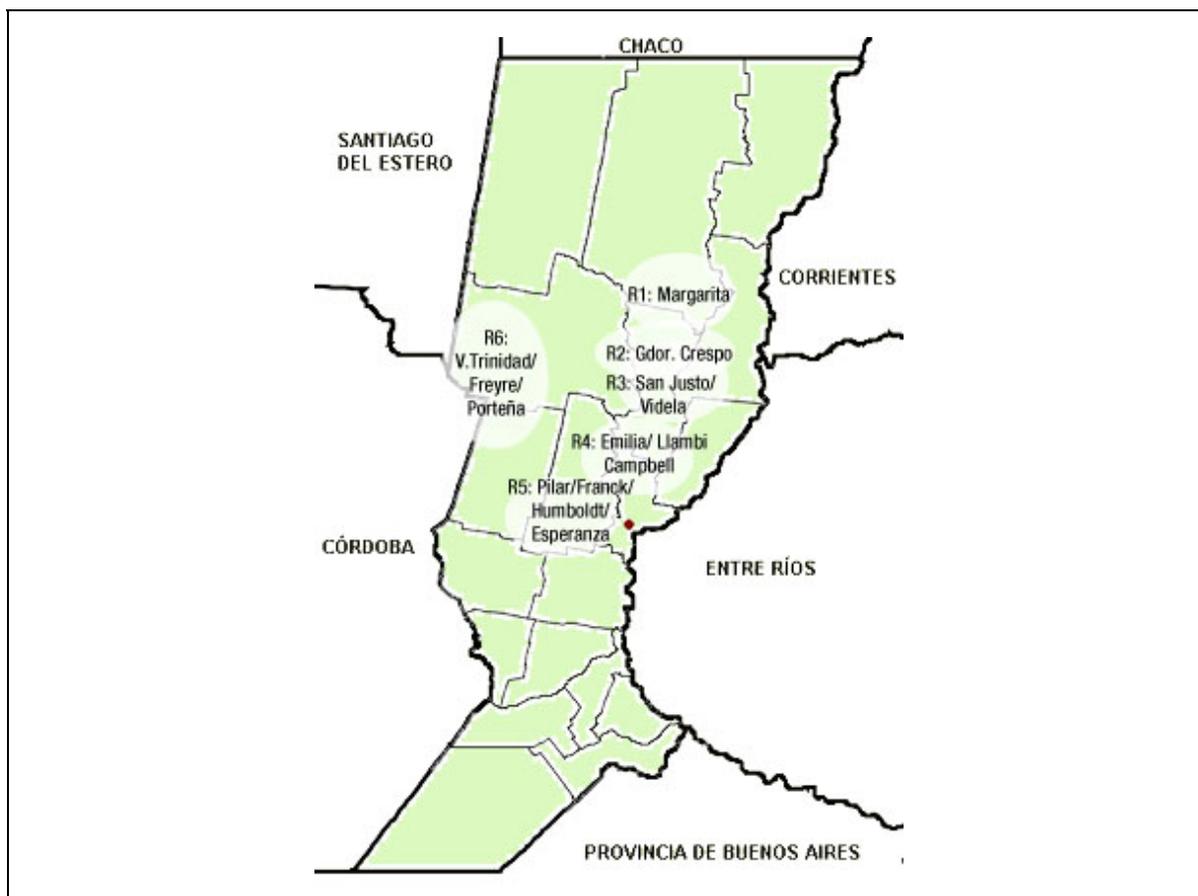


Figura III.1. Mapa de la provincia de Santa Fe con las distintas Regiones isoagronómicas de la zona centro-norte

R: regiones isoagronómicas: R1: Margarita, R2: Gobernador Crespo, R3: San Justo/Videla, R4: Emilia/Llambi Campbell, R5: Pilar/Franck/Humboldt/ Esperanza, R6: Villa Trinidad/Freyre/Porteña

2. OBJETIVOS

- Aislar los hongos del género *Cercospora* a partir de plantas de soja y conservarlos.
- Caracterizar fenotípicamente dichos aislamientos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTO, CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LOS HONGOS

Los muestreos fueron llevados a cabo por integrantes del Programa RiiA, quienes efectuaron el monitoreo de un grupo de lotes de soja representativos de la zona, considerando los grupos de maduración más utilizados en suelos de mayor y menor aptitud agronómica. Dichos lotes fueron monitoreados semanalmente, registrándose datos de lluvia, condiciones de suelo, plagas, enfermedades, evolución y manejo de los cultivos. Los registros climáticos fueron obtenidos de estaciones meteorológicas automáticas colocadas aproximadamente en el centro de cada región. En los casos en que se detectaba soja enferma con tizón de la hoja o mancha ojo de rana, las plantas se remitían al laboratorio de Microbiología General (FBCB, UNL).

Las muestras se recibían en bolsas de polietileno cerradas en cuyos rótulos se registraba la siguiente información: fecha de recolección, ubicación geográfica y dentro del lote, el cultivar/varietal y el grado de madurez de la planta enferma.

El estudio se llevó a cabo entre los meses de Enero y Marzo, durante las campañas 2005/2006, 2006/2007, 2007/2008 y 2008/2009. Las condiciones climáticas imperantes en dichas zonas se consignan en la Tabla III.1.

Se procesaron los pecíolos y folíolos de las muestras con signos y síntomas visibles del tizón de la hoja y MOR.

La esporulación de los hongos se estimuló con cámaras húmedas (Salvador y Garrido, 1990; Latorre Rapela y col., 2011).

Para el aislamiento de los fitopatógenos, se lavaron los trozos de tejidos enfermos, con una solución de hipoclorito de sodio comercial (55 g/L Cl) al 3% durante 3 min y, a continuación, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.

Los trozos de planta así tratados se seccionaron con un bisturí (0,5-1 cm) en condiciones de esterilidad y se colocaron dentro de las cámaras húmedas estériles (Figura III.2).

Tabla III.1. Condiciones climáticas correspondientes a diferentes estaciones meteorológicas en la Provincia de Santa Fe, Argentina. Campañas 2005-2006; 2006-2007; 2007-2008; 2008-2009 (Enero a Marzo)

Estación meteorológica	Promedios				Acumulados lluvia mm
	Tmáx °C	Tmín °C	Tmed °C	Hr %	
Campaña 2005-2006					
Rafaela	26,8	14,4	22,8	67	905
Margarita	28,1	15,0	22,9	70	605
Villa Trinidad*	28,1	15,1	23,7	55	603
Ramayón*	28,8	15,0	22,5	73	692
Campaña 2006-2007					
Rafaela	27,7	22,3	17,4	82	1389
Esperanza	30,6	23,1	16,6	81	1255
Margarita	29,4	23,3	17,9	83	622
Villa Trinidad*	29,4	23,8	18,6	65	614
Ramayón*	28,6	23,3	18,6	72	1055
Campaña 2007-2008					
Rafaela	27,0	15,4	21,1	80	705
Esperanza	27,6	14,5	21,2	80	422
Margarita	28,7	15,7	21,9	73	535
San Justo	28,3	16,7	22,2	66	665
Campaña 2008-2009					
Rafaela	28,4	15,3	21,8	69	597
Esperanza	29,9	15,4	22,7	63	585
Margarita	29,2	17,5	22,9	65	495
San Justo	29,0	17,3	22,8	66	637

* Las Estaciones Meteorológicas de Villa Trinidad y Ramayón dejaron de funcionar durante las campañas 2007-2008 y 2008-2009, por lo cual los registros climáticos se tomaron en otras Estaciones Meteorológicas.

Tmáx: temperatura máxima; Tmín: temperatura mínima; Tmed: temperatura media; RH: humedad relativa.

Fuente: Registros RiiA

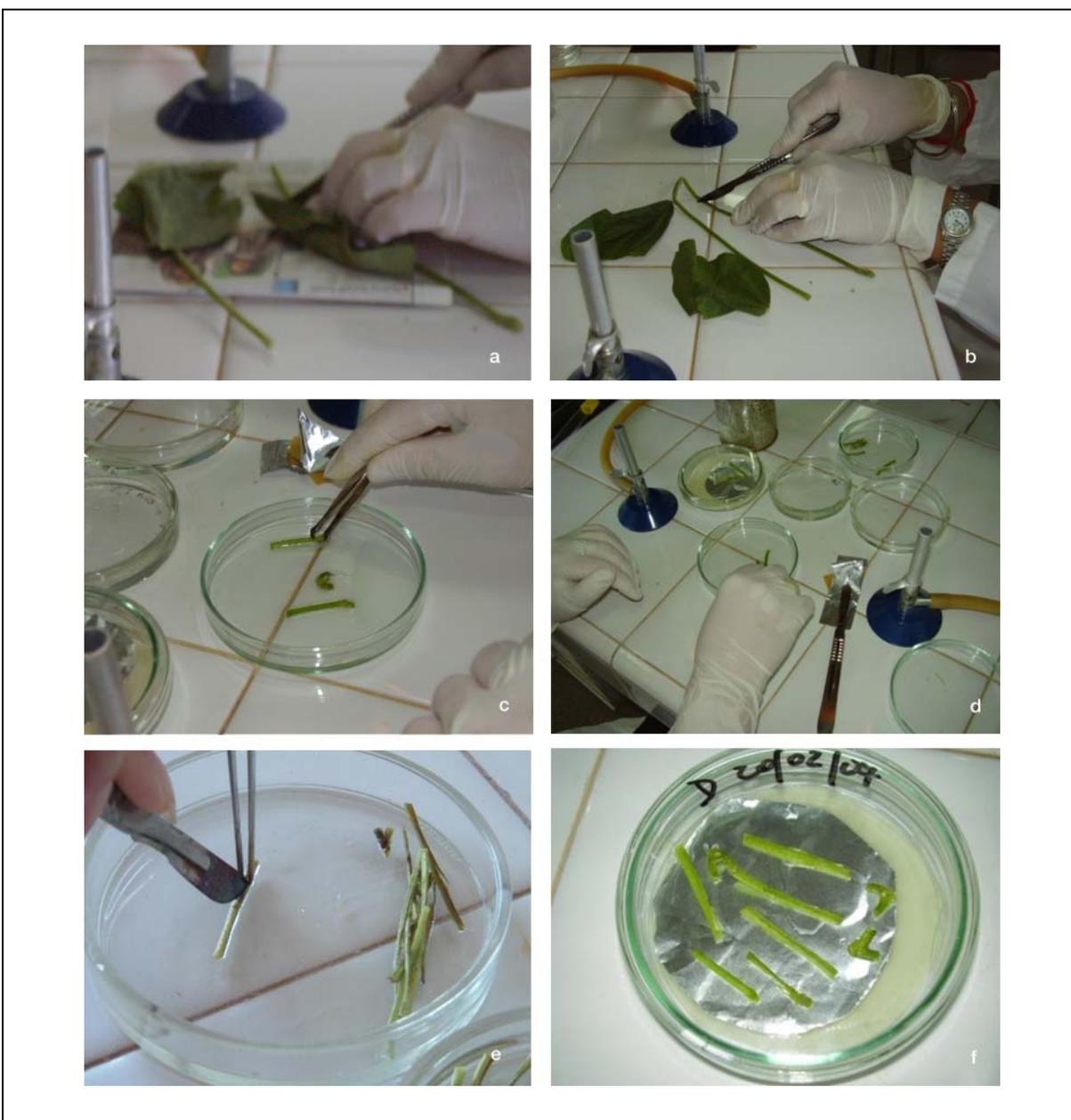


Figura III.2. Preparación de la cámara húmeda

a y b: selección de los peciolo infectados. **c:** decontaminación con NaClO 3%. **d:** enjuague con agua estéril. **e:** corte longitudinal del peciolo, **f:** cámara húmeda.

Fuente: Observación personal.

El conjunto se incubó a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz fría y 8 h de oscuridad) (Salvador y Garrido, 1990), hasta esporulación. Al cabo de 5 d de incubación, se comenzaron a observar bajo lupa estereoscópica (BOECO Germany, BTB 3-C), con un aumento total de 40x.

Verificado el crecimiento de las estructuras conidiales, con una aguja estéril, se tomaron los conidios y se suspendieron en 1 mL de agua estéril. Una vez obtenida una suspensión homogénea y con

el fin de realizar cultivos monospóricos, una alícuota de la misma (100 µL) se distribuyó sobre la superficie de una placa de Petri conteniendo medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) y se incubó de igual modo al descrito anteriormente (Dunkle y col., 2000). Una vez desarrollados los hongos, se procedió a subcultivarlos a fin de obtener colonias puras.

Cada aislamiento fue rotulado con las iniciales, en mayúscula, de la especie correspondiente (CK: *Cercospora kikuchii*; CS: *Cercospora sojina*) y un número correlativo. En la Tabla III.2 se especifican los diferentes aislamientos y los datos que permitieron identificar su origen.

Para el trabajo diario en el laboratorio, los hongos se mantuvieron por resiembras periódicas en estrías de APD. Los cultivos se almacenaron a 4°C por períodos inferiores a 6 meses, al cabo de los cuales se efectuaron nuevas resiembras.

Para la conservación a largo plazo, se utilizaron diferentes métodos: suspensión de pequeños trozos de cultivo en agua estéril, almacenados a temperatura ambiente y suspensiones de conidios en glicerol al 10%, almacenados a -80°C. Para la conservación indefinida, las cepas se liofilizaron (Smith y Onions, 1983).

Tabla III.2. Especies de *Cercospora* aisladas de soja: denominación y origen

Aislamiento ^a	Región ^b	Localidad	Lote	Cultivar/ varietal	Grupo de madurez	Campaña
CK14	R4	Emilia	A01	A 5409	V	2005-2006
CK15	R4	Emilia	A01	A 5409	V	2005-2006
CK16	R4	Emilia	A01	A 5409	V	2005-2006
CK17	R4	Emilia	A01	A 5409	V	2005-2006
CK18	R4	Emilia	A01	A 5409	V	2005-2006
CK19	R4	Emilia	A01	A 5409	V	2005-2006
CK20	R1	Margarita	A04	TJ 2070	VII	2005-2006
CK21	R1	Margarita	A04	TJ 2070	VII	2005-2006
CK22	R1	Margarita	A04	TJ 2070	VII	2005-2006
CK23	R3	San Justo	A02	A 4910	IV	2005-2006
CK24	R1	Margarita	A04	TJ 2070	VII	2005-2006
CK25	R2	Gdor. Crespo ^c	A04	A 8000	VIII	2005-2006
CK26	R4	Emilia	B01	A 5409	V	2005-2006
CK27	R2	Gdor. Crespo ^c	A04	A 8000	VIII	2005-2006
CK28	R5	Esperanza	s/d ^d	A 7636	VII	2005-2006
CK29	R5	Esperanza	s/d ^d	A 7636	VII	2005-2006
CK30	R5	Esperanza	s/d ^d	A 7636	VII	2005-2006
CK31	R5	Esperanza	s/d ^d	A 7636	VII	2005-2006
CK32	R5	Esperanza	s/d ^d	A 7636	VII	2005-2006
CK35	R3	San Justo	A02	RA 514	V	2006-2007
CK36	R5	Esperanza	A06	RA 626	VI	2006-2007
CK37	R1	Margarita	A01	ASGROW.8000	VIII	2006-2007
CK38	R1	Margarita	A03	ASGROW.8000	VIII	2006-2007
CK39	R6	Villa Trinidad	A02	A 6401	VI	2006-2007

Aislamiento ^a	Región ^b	Localidad	Lote	Cultivar/ varietal	Grupo de madurez	Campaña
CK40	R1	Margarita	A06	ASGROW.8000	VIII	2006-2007
CK41	R6	Villa Trinidad	A02	A 6401	VI	2006-2007
CK42	R4	Emilia	A05	RA 703	VII	2007-2008
CK43	R4	Emilia	A03	A 7118	VII	2007-2008
CK44	R4	Llambi Campbell	s/d ^d	s/d ^d	VIII	2007-2008
CK45	R6	Villa Trinidad	A02	A 8000	VIII	2007-2008
CK46	R6	Villa Trinidad	A04	A 6401	VI	2007-2008
CK47	R5	Esperanza	A05	A 6411	VI	2008-2009
CS48	R2	Gdor. Crespo ^c	A02	s/d ^d	s/d ^d	2008-2009
CK49	R1	Margarita	A04	A 8000	VIII	2008-2009
CK50	R2	Gdor. Crespo ^c	B01	NA 7708 RG	VII	2008-2009
CK51	R2	Gdor. Crespo ^c	A02	s/d ^d	s/d ^d	2008-2009
CK52	R3	San Justo	A02	A 4910	IV	2008-2009
CK53	R3	San Justo	A02	A 4910	IV	2008-2009
CK54	R3	San Justo	A03	A 6401	VI	2008-2009
CS55	R4	Emilia	A03	MAN 4355	V	2008-2009
CK56	R5	Esperanza	A05	A 6411	VI	2008-2009
CK57	R3	San Justo	A02	A 4910	IV	2008-2009
CK58	R2	Gdor. Crespo ^c	A08	RA 725	VII	2008-2009
CK59	R5	Esperanza	A04	A 6401	VI	2008-2009
CS60	R5	Esperanza	A01	RA 633	VI	2008-2009
CS61	R5	Esperanza	A07	NA 6126 RG	s/d ^d	2008-2009
CS62	R5	Esperanza	A04	A 6410	VI	2008-2009
CS63	R3	San Justo	A02	A 4910	IV	2008-2009
CS64	R3	San Justo	A05	RA 626	VI	2008-2009
CS65	R6	Porteña	s/d ^d	s/d ^d	s/d ^d	2008-2009
CS66	R3	San Justo	A04	A 6411	VI	2008-2009
CS67	R5	Esperanza	A04	A 6401	VI	2008-2009

^a CK y CS significan *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina*, respectivamente. ^b Regiones RiiA: 6 regiones de la zona centro-norte de la provincia de Santa Fe. ^c Gdor. Crespo, corresponde a Gobernador Crespo. s/d^d, significa sin datos. Los aislamientos correlativos no incluidos en la tabla no fueron estudiados.

3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Para la caracterización fenotípica de los hongos se utilizaron los medios de cultivo: APD, agar jugo de ocho vegetales (AJV8) y agar conejarina (AC). Cada uno de los aislamientos se sembró en superficie, mediante tres toques en una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo respectivo y se incubó de igual modo al descrito anteriormente.

Las observaciones macro y microscópicas se efectuaron a los 10 d, teniendo en cuenta el color y el diámetro de la colonia, la producción de pigmento rojo y la presencia o ausencia de los elementos de fructificación característicos. En este último caso los cultivos no se desecharon hasta los 25 d de incubación.

La caracterización morfológica se llevó a cabo mediante las técnicas clásicas, propuestas por Salvador y Garrido (1990), Gams y col. (1987), Ellis (1976) y Crous y Braun (2003).

4. RESULTADOS

En la Figura III.3 se observan las estructuras conidiales de *C. kikuchii* (a y b) y *C. sojina* (c y d), desarrolladas en cámara húmeda, sobre su sustrato natural.

Se obtuvieron 52 aislamientos de los cuales, 42 provinieron de soja con tizón de la hoja y el resto de plantas enfermas con MOR.

En el primer caso, al efectuar el examen directo de la lesión con mayor aumento (400x), se observaron estructuras compatibles con *C. kikuchii*: conidióforos multiseptados, de color marrón, fasciculados de 91-300 μm de longitud por 3,9-5,2 μm de ancho, con células conidiógenas engrosadas y oscuras que daban origen a conidios pluriseptados (12-26 septos), hialinos, aciculares, largos y simples de 54-260 μm de longitud por 2,6 μm de ancho en la base y 1,3 μm en el extremo aguzado (Figura III.4).

En el caso de las plantas con MOR, las estructuras observadas fueron compatibles con la especie *C. sojina*: conidióforos septados (1-4 septos), de color marrón claro a oscuro, fasciculados de 300-478 μm de longitud por 5 μm de ancho, con células conidiógenas engrosadas y oscuras que daban origen a conidios pluriseptados (9-15 septos), hialinos, elongados a fusiformes y simples de 87-153 μm de longitud por 5 μm de ancho en la base y 2,5 μm en la parte más delgada. En la Figura III.5 se muestran las estructuras visualizadas.

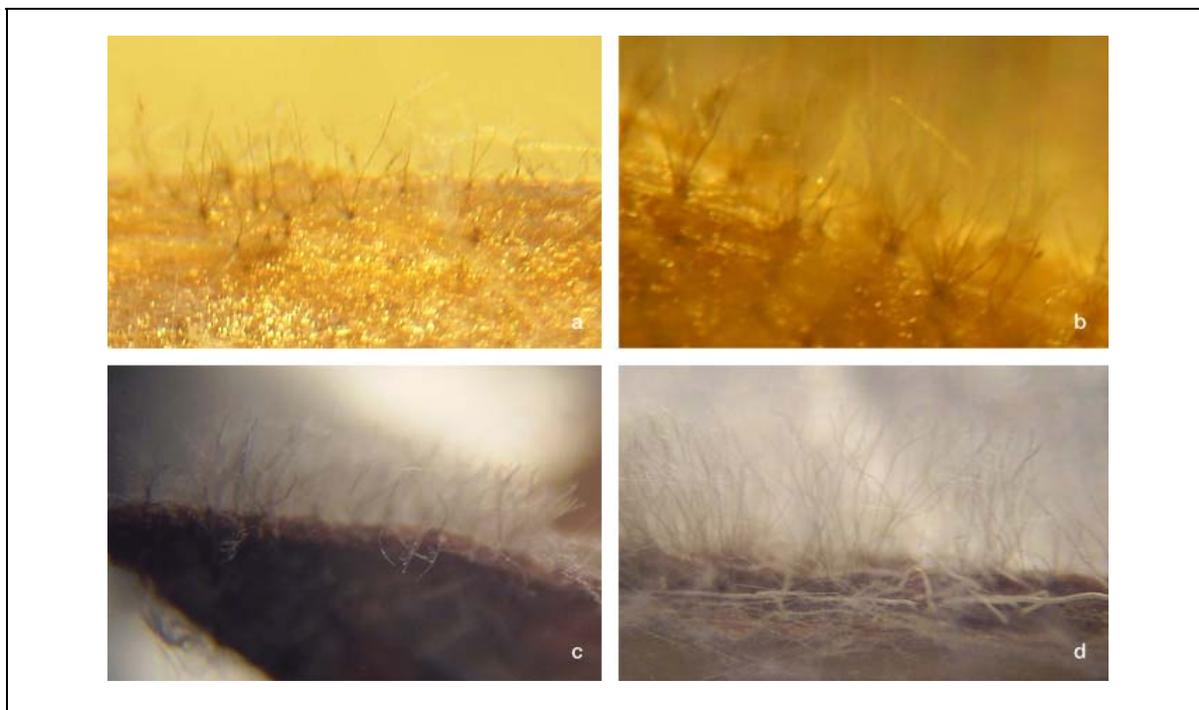


Figura III.3. Estructuras de fructificación sobre sustrato natural (pecíolo) (observación con lupa estereoscópica 40x). **a y b:** *Cercospora kikuchii*. **c y d:** *Cercospora sojina*.

Fuente: Observación personal.

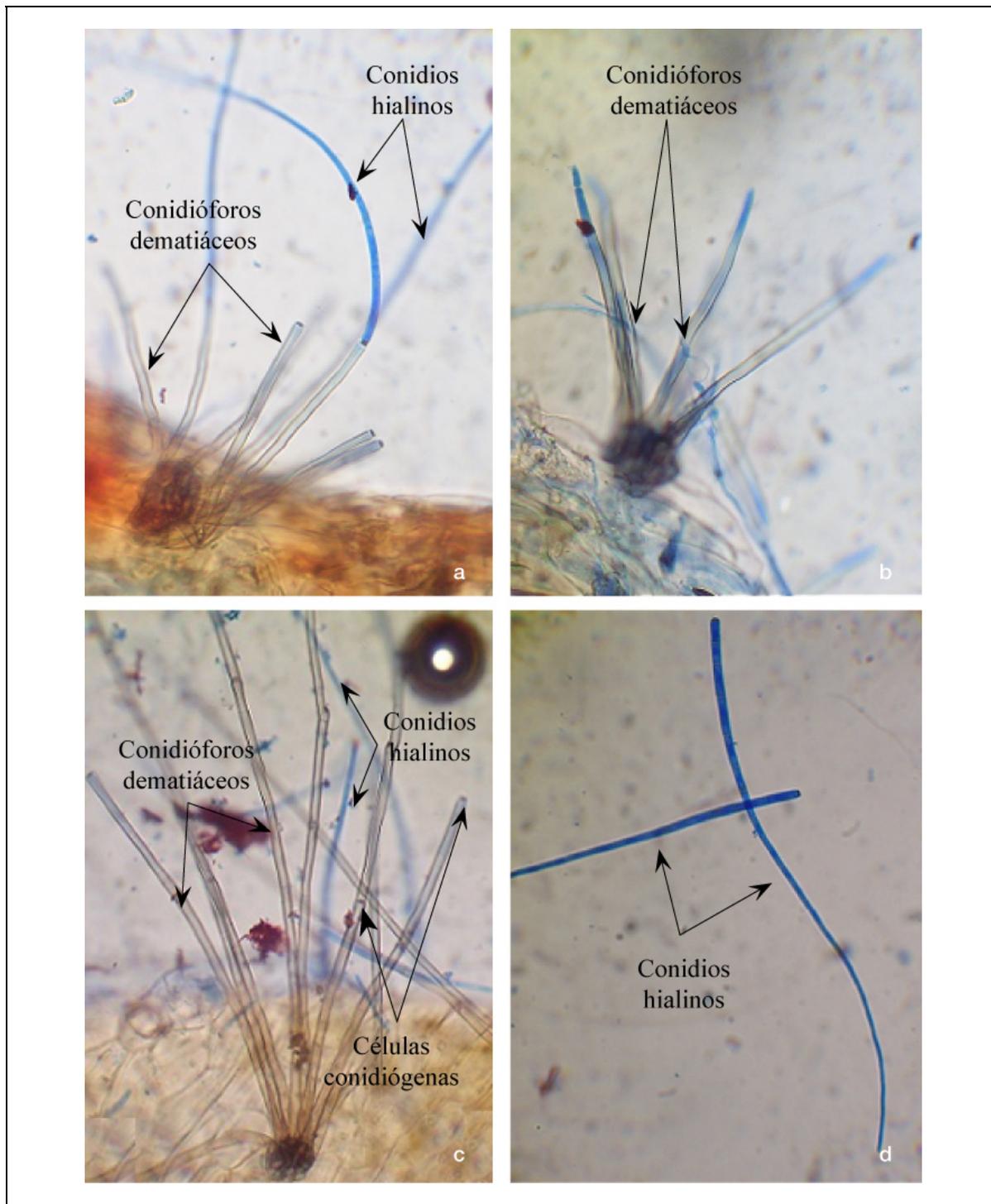


Figura III.4. Estructuras de fructificación de *C. kikuchii* sobre sustrato natural

Observación con MO 400x. **a** y **b**: Desarrollo a los 5 días de incubación. **c**: Desarrollo a los 6 días de incubación. **d**: Conidios hialinos

Fuente: Observación personal.

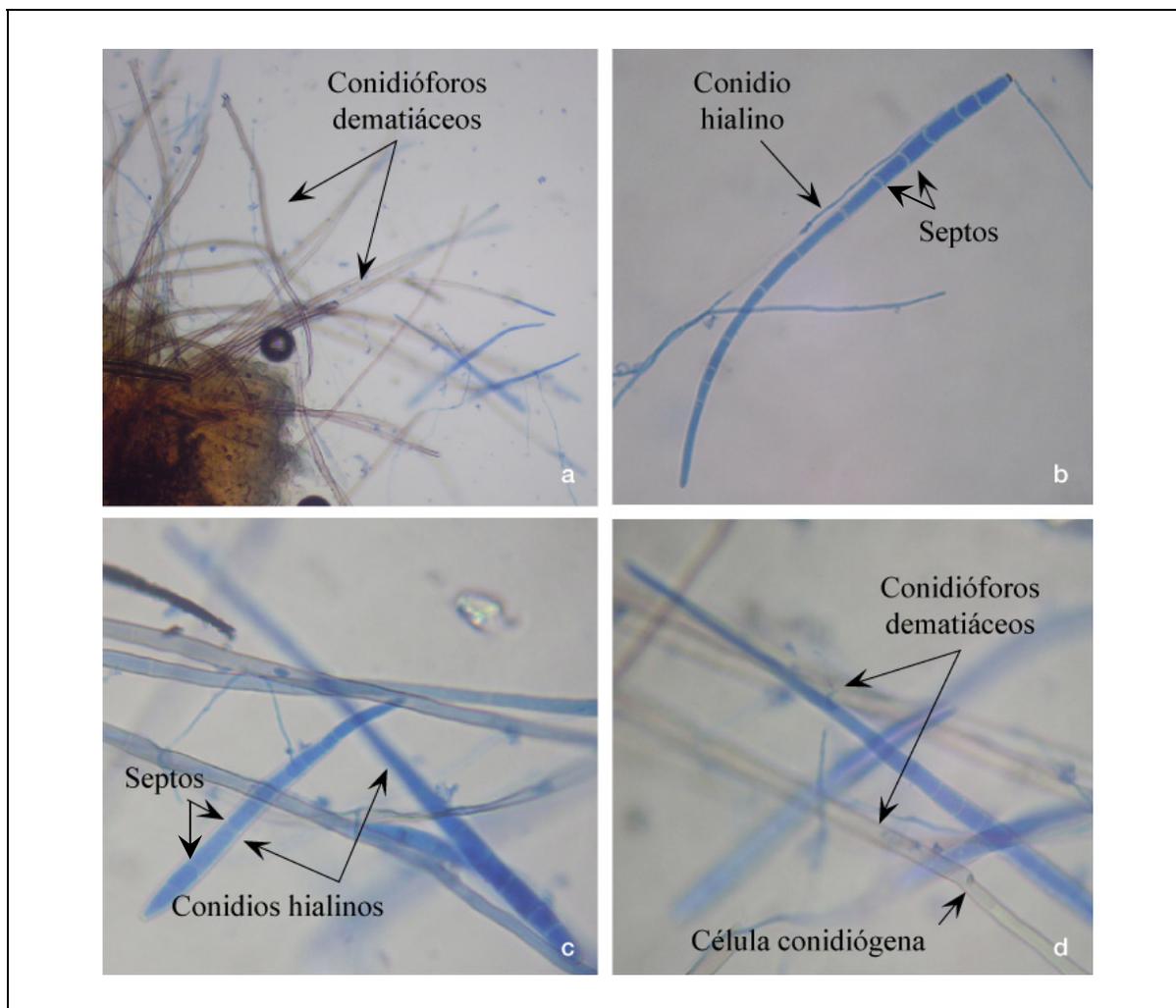


Figura III.5. Estructuras de fructificación de *C. soja* sobre sustrato natural (pecíolo)

Observación con MO 400x. **a:** desarrollo a los 6 días de incubación. **b y c:** conidios hialinos septados. **d:** conidióforos dematiáceos y célula conidiógena.

Fuente: Observación personal.

En la Tabla III.3 (pág. 45 a 70) se describen, para cada aislamiento, las características macroscópicas y la formación (o no) de estructuras de reproducción. En líneas generales puede efectuarse la siguiente síntesis:

Independientemente de la especie, sobre el medio APD las colonias, cuyos diámetros promedios estuvieron comprendidos entre 22-58 mm presentaron, en general, colores en tonalidades de blanco, verde-grisáceo, verde-amarillento, crema y rosado según el aislamiento y abundante exudado incoloro que con el tiempo, se tornó ámbar a ocre. En el reverso, se observaron de color verde oscuro, marrón, marrón con bordes rojizos. Para una mejor visualización, se presentan algunos ejemplos en las Figuras III.6 y III.7. En 28 de ellas el pigmento difundió al medio (Figura III.8.a), mientras que en 17, solo fue visible en el reverso (Figura III.8.b) y 7 no lo produjeron. Solo 19 de los aislamientos fructificaron (Figura III.9), pero la esporulación fue escasa y no se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de la colonia.

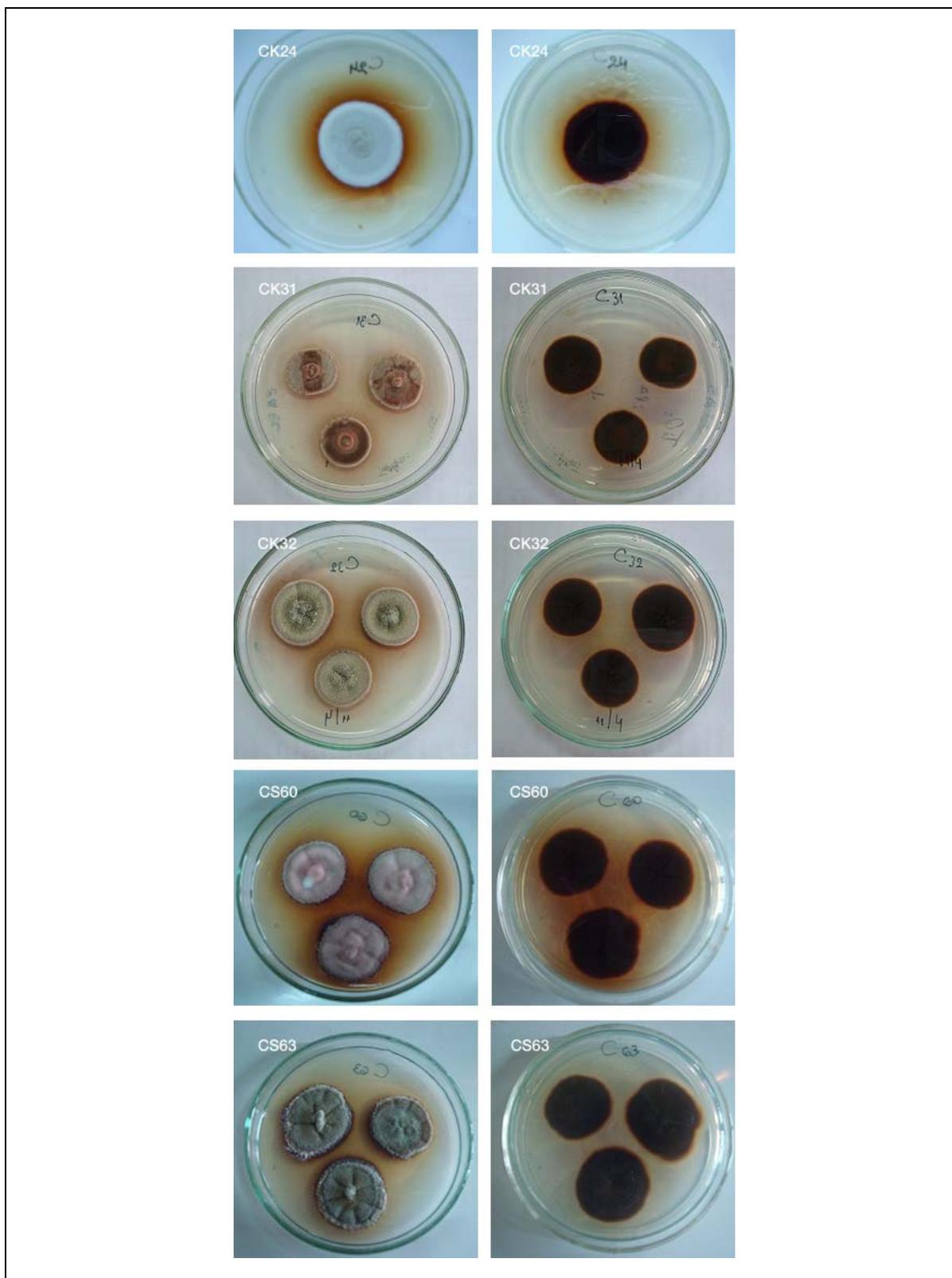


Figura III.6. Colonias de *Cercospora* spp en medio de cultivo APD, incubadas a $25 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, durante 10 d. En la columna de la izquierda se observan los anversos de diferentes aislamientos y a la derecha los respectivos reversos

Fuente: Observación personal.

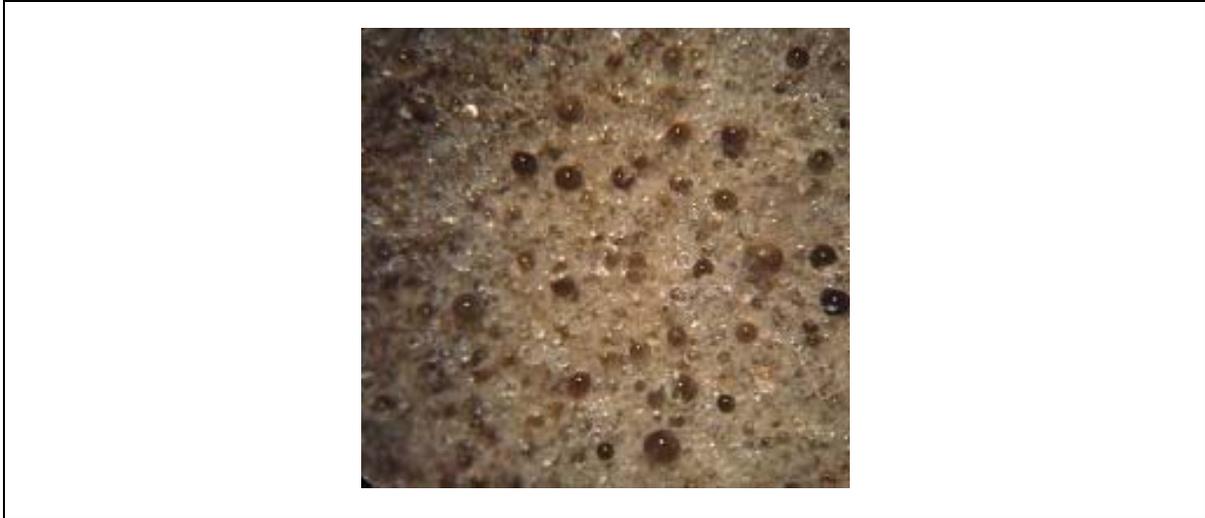


Figura III.7. Presencia de exudado sobre una colonia. Observación con lupa estereoscópica 40x
Fuente: Observación personal.

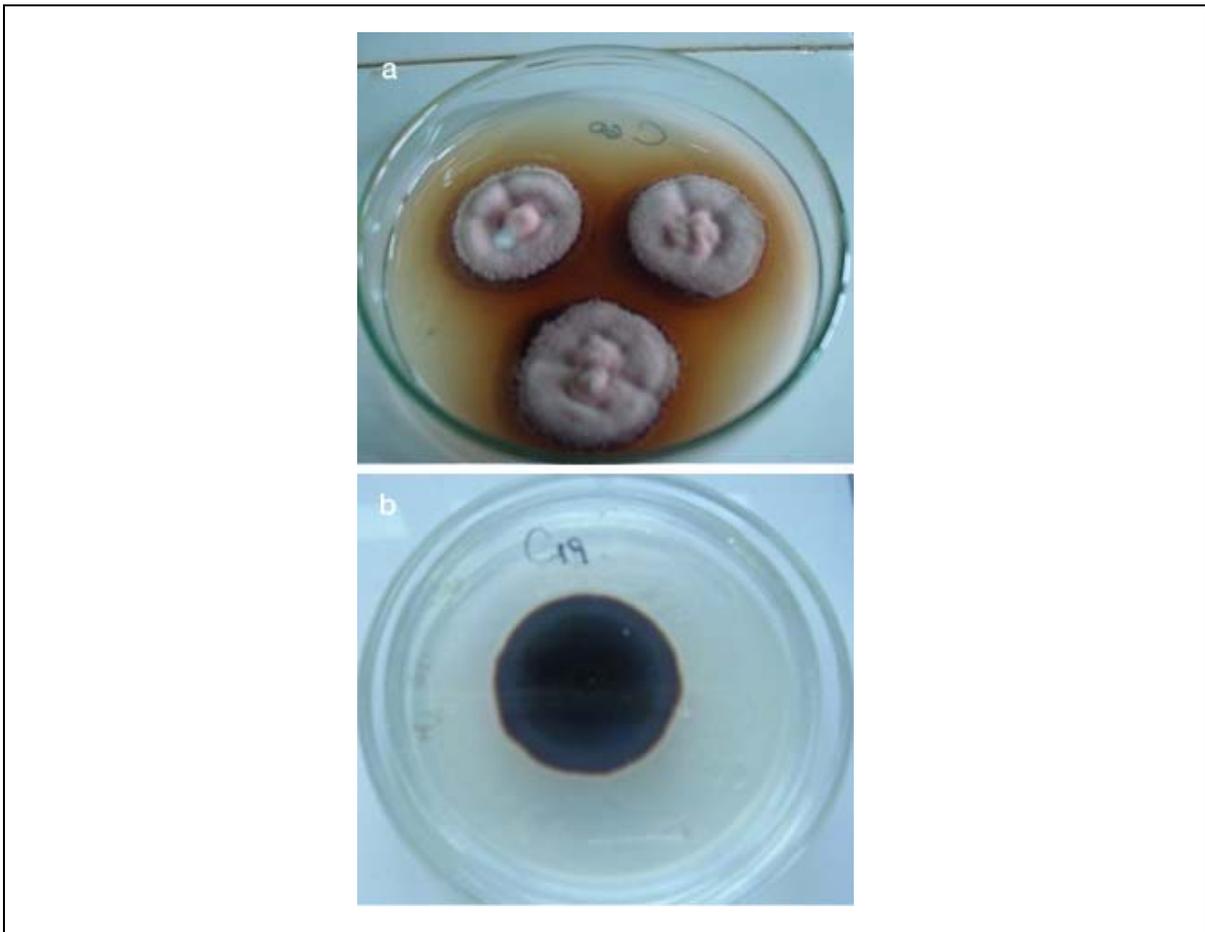


Figura III.8. Producción de pigmento rojo
a: Pigmento rojo que difunde al medio. **b:** Pigmento rojo solo visible en el reverso.
Fuente: Observación personal.

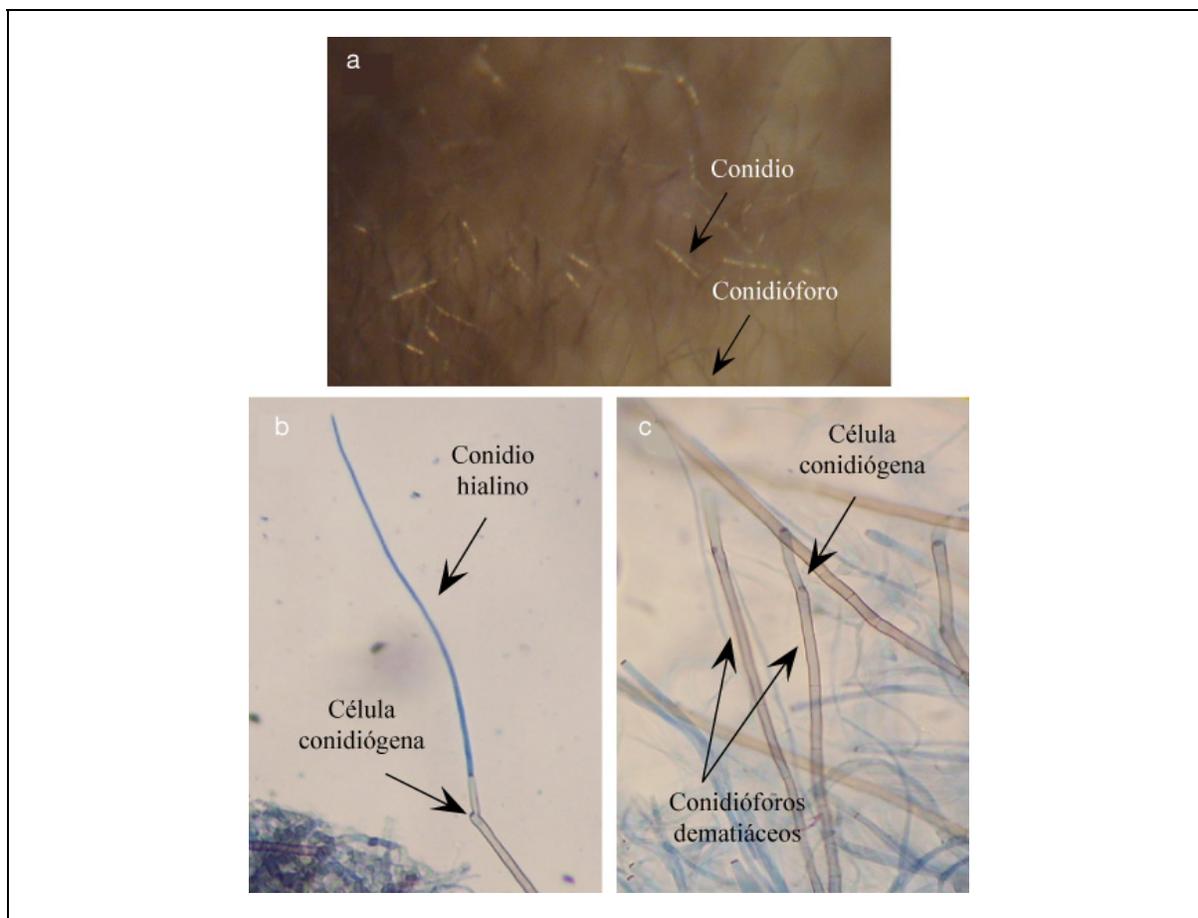


Figura III.9. Micelio aéreo o reproductivo de *Cercospora* spp

a: observación de estructuras de reproducción con lupa estereoscópica (40x). **b y c:** observación de estructuras de reproducción con MO (400x).

Fuente: Observación personal.

Sobre el medio de cultivo AJV8, las colonias, cuyos diámetros promedios estuvieron comprendidos entre 22-45 mm, presentaron colores en tonalidades de verde, verde-grisáceo, gris, rosado, crema, crema con tinte rosado, salmón y marrón. En el reverso se observaron de color verde, verde oscuro, verde con bordes rojo, marrón-rojizo, rojizo, rojo oscuro, marrón, marrón con bordes rojos (Figura III.10). En 22 de ellas el pigmento difundió al medio, mientras que en 10, solo fue visible en el reverso y 20 no lo produjeron. Treinta y nueve de los aislamientos fructificaron, pero de la misma manera que en APD, la esporulación fue escasa y no se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de la colonia.

Sobre el medio de cultivo AC, los tamaños de las colonias fueron más restringidos ya que sus diámetros promedios estuvieron comprendidos entre 12-46 mm. Las mismas presentaron colores en tonalidades de gris, blanco, crema, crema con tinte rosado, verde-grisáceo, blanco con centro marrón, blanco con borde verde y amarillo-grisáceo. En el reverso se observaron de color marrón, verde, marrón-verdoso, marrón verdoso con bordes rojos, marrón-rojizo, crema y centro marrón y borde crema. A manera de ejemplo se presentan algunas en la Figura III.11. No se observó producción de pigmento en 30 aislamientos, en 19 el pigmento difundió al medio y solo en 3 fue visible observando el reverso. De todos los aislamientos, solo 21 fructificaron, pero de la misma manera

que en los medios descritos anteriormente, la esporulación fue escasa y no se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de la colonia.

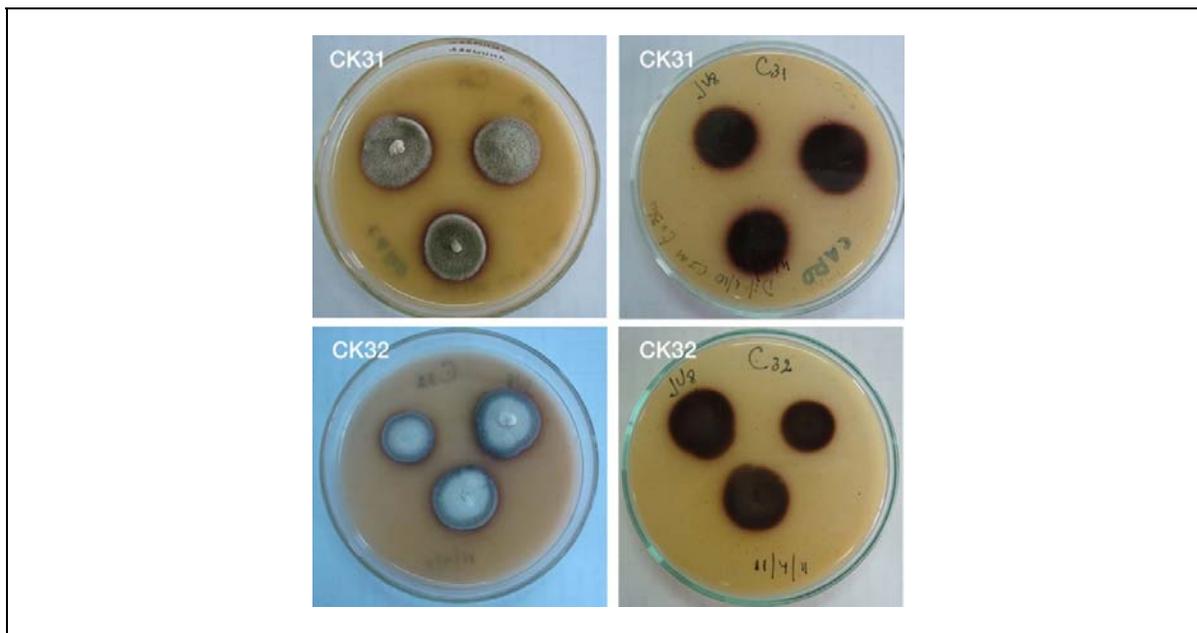


Figura III.10. Colonias de *Cercospora* spp. desarrolladas sobre el medio de cultivo AJV8, incubadas a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$, durante 10 d. En la columna de la izquierda se observan los anversos de diferentes aislamientos y a la derecha los respectivos reversos

Fuente: Observación personal.

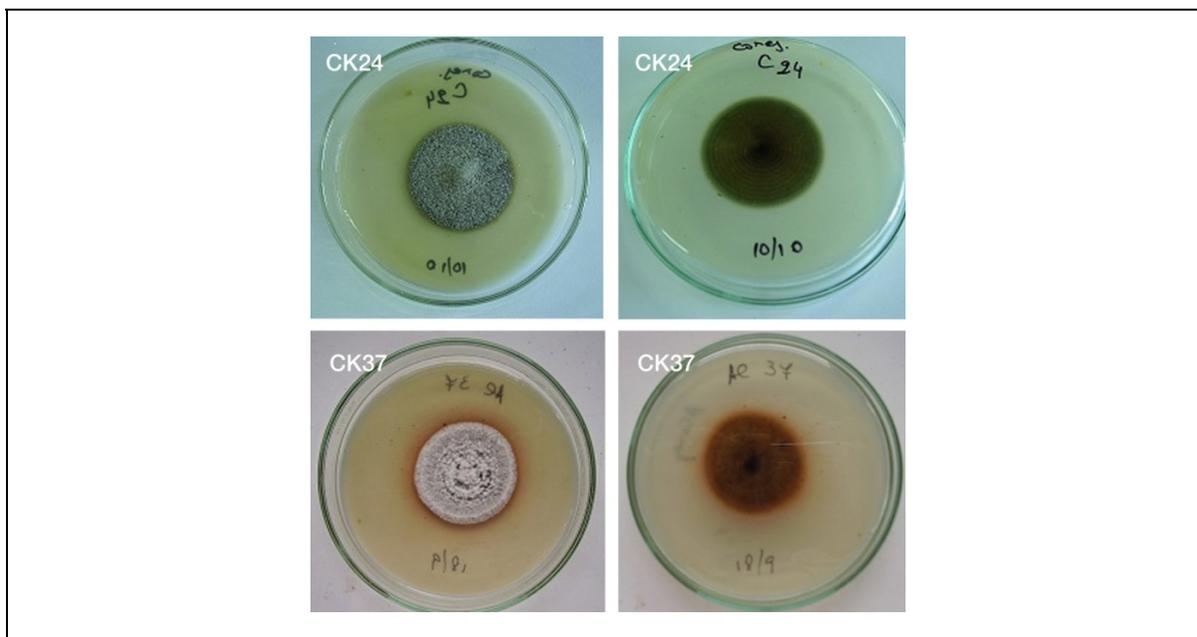


Figura III.11. Colonias de *Cercospora* spp. desarrolladas sobre el medio de cultivo AC, incubadas a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$, durante 10 d. En la columna de la izquierda se observan los anversos de diferentes aislamientos y a la derecha los respectivos reversos

Fuente: Observación personal.

Tabla III.3. Características fenotípicas de los aislamientos de las especies de *Cercospora*. Aspecto macroscópico y presencia de elementos de fructificación.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación	
	CK14	APD: 37 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, pliegues radiados. Color del micelio: gris, zonas rosadas. Exudado: amarillo pálido.	Color: marrón, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
		AJV8: 35 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, centro blanco-rosado. Exudado: incoloro a ámbar.	Color: verde oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 23 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: marrón-rojizo. Zonación.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.	
	CK15	APD: 47 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado y aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
		AJV8: 34 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo.	Color: verde oscuro.	No produjo.	No se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 40 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: centro verdoso, borde marrón con rosa pálido.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

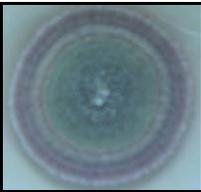
^aLas siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK16  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 47 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo, centro blanco. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón-rojizo, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 34 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: marrón-rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AC: 35 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: verde. Zonación.	No produjo.	No se observó.
CK17  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 39 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-amarillento, centro crema. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 40 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris, centro rosado.	Color: marrón-rojizo, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AC: 44 mm	Aspecto: granuloso, centro algodonoso. Color del micelio: gris, centro blanco. Zonación.	Color: marrón-verdoso, pigmento rosa pálido en el borde.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.

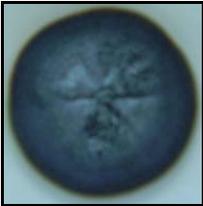
^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK18  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 41 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 44 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: rosado.	Color: marrón-rojizo, borde rojo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AC: 43 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris. Zonación.	Color: marrón.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
CK19  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 40 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 33 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco-grisáceo. Mutación: rosado pálido.	Color: verde oscuro, borde rojizo. Mutación: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 31 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: verde.	No produjo.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK20  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 50 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 38 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris-verdoso. Zonación.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 46 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde. Mutación: blanco. Zonación.	Color: verde.	No produjo.	No se observó.
CK21  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 44 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: centro verde-grisáceo, borde rosado. Exudado: incoloro y ámbar. Zonación.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 35 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: gris. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 40 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris, centro blanco.	Color: marrón-verdoso, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK22  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 44 mm	Aspecto: aterciopelado, plegada. Color del micelio: verde oscuro. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: verde oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 38 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris. Zonación.	Color: verde oscuro.	No produjo.	No se observó.
	AC: 35 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco-grisáceo.	Color: marrón. Zonación.	No produjo.	No se observó.
CK23  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 31 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo con zonas rosadas. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 24 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: gris-verdoso con zonas rosadas. Exudado: incoloro.	Color: rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 24 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: gris-verdoso. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK24 	APD: 36 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro y ocre.	Color: marrón-rojizo, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 33 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 44 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: verde oscuro. Zonación.	No produjo.	Se observó.
Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d					
CK25 	APD: 33 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 32 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: blanco-grisáceo. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: verde con zonas rojas.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 20 mm	Aspecto: aterciopelado, elevado en el centro. Color del micelio: blanco-grisáceo. Exudado incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d					

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK26 	APD: 45 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: centro verde, borde rosado. Exudado: incoloro, ámbar y marrón-rojizo.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 35 mm	Aspecto: aterciopelado Color del micelio: gris. Mutación: rosa pálido. Exudado: incoloro.	Color: marrón y blanco-rosado.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 39 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris.	Color: verde. Zonación.	No produjo.
CK27 	APD: 34 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, superficie plegada. Color del micelio: Verde-grisáceo, zonas rosadas. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 36 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: gris. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro, zonas rojizas.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 25 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: blanco-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	No produjo.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK28  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 34 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, superficie plegada. Color del micelio: verde, borde rosado. Exudado incoloro: ámbar claro y oscuro.	Color: Marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: verde.	No produjo.	Se observó.
	AC: 25 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro, borde rojo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
CK29  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, superficie plegada. Color del micelio: verde-grisáceo, borde crema. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 24 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: verde, zonas rojas.	Difundió pigmento al medio	Se observó
	AC: 30 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: blanco-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: marrón, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK30  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: rosado. Exudado: incoloro.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 25 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 23 mm	Aspecto: aterciopelado, borde y centro elevados. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: marrón.	No produjo.	No se observó.
CK31  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 26 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, con zonas rosadas. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 24 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: gris-verdoso. Exudado: incoloro y ocre	Color: rojo oscuro.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 18 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: gris. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK32  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 27 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, superficie plegada. Color del micelio: verde-grisáceo claro. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 22 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 20 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
CK35  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 48 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, borde rojizo. Exudado: incoloro.	Color: marrón. Borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 44 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 42 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco-cremoso. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: pardo.	No produjo.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK36 	APD: 34 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo en el centro, borde amarillo. Exudado: incoloro a ocre.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 38 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema con tinte rosado que se intensifica en el borde. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 34 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco-cremoso. Exudado: incoloro a amarillo.	Color: pardo, borde rosado. Zonación.	Difundió pigmento al medio.
CK37 	APD: 54 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo, centro blanco. Exudado: incoloro a amarillo.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 44 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema con tinte rosado.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 40 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.

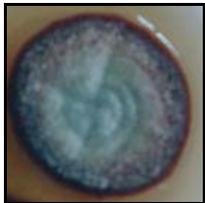
^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK38  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 45 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro a amarillo.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 45 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema-rosado. Exudado: incoloro a amarillo. Zonación.	Color: verde oscuro.	No produjo.	No se observó.
	AC: 46 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: pardo. Zonación.	No produjo.	No se observó.
CK39  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 54 mm	Aspecto: aterciopelado, superficie radiada. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro a amarillo.	Color: verde oscuro, borde rojo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 40 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: blanco con tonos rosados. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: verde oscuro. Zonación.	No produjo.	Se observó.
	AC: 45 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: pardo, borde rosado. Zonación.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojae*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK40  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 51 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: blanco-grisáceo, borde verde. Exudado: incoloro a amarillo. Zonación.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AJV8: 37 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro a amarillo. Zonación.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 40 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro a ámbar.	Color: pardo.	No produjo.	Se observó.
CK41  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 58 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo, borde rojizo. Exudado: incoloro a ámbar. Zonación.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 42 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: crema con tinte rosado. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 47 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: blanco-grisáceo Exudado: incoloro.	Color: pardo. Zonación.	No produjo.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK42  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 28 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, borde rojizo.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 28 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 24 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema con tinte rosado. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
CK43  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, elevada en el centro, surcos radiados. Color del micelio: centro verde-grisáceo, borde rosa-grisáceo, áreas blancas. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 26 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo.	Color: marrón-rojizo	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 12 mm	Aspecto: aterciopelado, elevada. Color del micelio: blanco-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: Marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK44  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 25 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro a ámbar oscuro.	Color: marrón, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 24 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 12 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
CK45  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 22 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro a ocre. Zonación.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 17 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK46  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 25 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro a ocre.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 25 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo, borde rojo oscuro.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 18 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: gris. Exudado: incoloro.	Color: marrón.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
CK47  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 26 mm	Aspecto: aterciopelado, deprimida en el centro, surcos radiados. Color del micelio: verde oscuro con zonas blancas. Exudado: incoloro a ocre.	Color: marrón oscuro. Surcos radiados.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 26 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: marrón, borde rojo oscuro.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 15 mm	Aspecto: granuloso, elevada. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro	Color: marrón oscuro.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CS48  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, Exudado: incoloro, amarillo pálido y marrón. Zonación.	Color: marrón-rojizo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 29 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AC: 25 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: centro pardo, borde crema.	No produjo.	No se observó.
CK49  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 33 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados, centro y margen elevados. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro y amarillo oscuro.	Color: marrón oscuro. Surcos radiados.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 25 mm	Aspecto: aterciopelado, centro y margen elevados. Color del micelio: crema con tinte rosado.	Color: rojo oscuro.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 17 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: centro marrón, borde blanco. Exudado: incoloro y ocre.	Color: centro marrón-rojizo, borde blanco.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK50 	APD: 25 mm	Aspecto: aterciopelado, plegada, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, áreas blancas. Exudado: incoloro.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro.	Color: verde con borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 25 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco.	Color: crema. Zonación.	No produjo.
CK51 	APD: 34 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo, tinte rosado, centro crema. Exudado: incoloro a amarillo pálido.	Color: marrón, borde rosa oscuro. Surcos radiados.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón.	No produjo.	Se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	AC: 25 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco-grisáceo. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: pardo.	No produjo.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK52 	APD: 45 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, surcos radiados. Color del micelio: verde oliva-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: marrón.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 25 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: verde. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 25 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: centro blanco, borde verde.	Color: centro pardo, borde blanquecino.	No produjo.	Se observó.
CK53 	APD: 33 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: verde oscuro. Surcos radiados.	No produjo.	No se observó.
	AJV8: 32mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: gris.	Color: marrón, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 30 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro.	Color: centro marrón oscuro, borde crema.	No produjo.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK54  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 32 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo en el centro, borde crema. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: verde oscuro. Surcos radiados.	No produjo.	No se observó.
	AJV8: 28 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro, ámbar.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 15 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco, borde marrón oscuro. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
CS55  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 29 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: rosado. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo. Surcos radiados.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro y ámbar oscuro.	Color: marrón oscuro, borde rojizo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AC: 27 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema.	Color: marrón-verdoso. Zonación.	No produjo.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK56 	APD: 30 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro y amarillo ámbar.	Color: verde oscuro. Surcos radiados.	No produjo.	No se observó.
	AJV8: 31 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: anaranjado pálido.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 22 mm	Aspecto: algodonoso. Color del micelio: blanco, centro marrón. Exudado: incoloro.	Color: centro marrón oscuro, borde crema.	No produjo.	No se observó.
CK57 	APD: 26 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: amarillo.	Color: verde oscuro. Surcos radiados.	No produjo.	Se observó.
	AJV8: 28 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro, ámbar y amarillo-verdoso.	Color: verde oscuro, borde rojo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AC: 21 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CK58  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 34 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: crema-amarillento, borde rosado. Exudado: amarillo.	Color: verde oscuro.	No produjo.	No se observó.
	AJV8: 32 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: rosa pálido. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: marrón.	No produjo.	Se observó.
	AC: 26 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
CK59  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 38 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: amarillo.	Color: marrón oscuro.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón, borde rojo oscuro.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 21 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema.	Color: verde oscuro en el centro, borde verde más claro.	No produjo.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CS60  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 33 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados, centro elevado. Color del micelio: rosado. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 32 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro.	Color: marrón, borde rojo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AC: 23 mm	Aspecto: aterciopelado, centro deprimido. Color del micelio: crema con tinte rosado. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón. Zonación.	No produjo.	No se observó.
CS61  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 30 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: rosado. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 27 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: marrón claro, tinte rosado. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: rojo oscuro.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 26 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: rosa pálido. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: centro y borde marrón oscuro, resto crema.	No produjo.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojae*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CS62 	APD: 37 mm	Aspecto: aterciopelado con pliegues radiados, centro elevado. Color del micelio: gris con áreas rosadas, centro blanco. Exudado: amarillo pálido.	Color: marrón con borde rojo.	Solo visible en el reverso.	No se observó.
	AJV8: 32 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: anaranjado pálido. Exudado: incoloro.	Color: marrón, borde rojo oscuro.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d AC: 22 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón, borde crema.	No produjo.	Se observó.
CS63 	APD: 23 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo, área central tinte amarillo, borde rosado. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 34 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón oscuro, zonas con tintes rojizos.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d AC: 27 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco.	Color: centro verde oscuro, borde crema.	No produjo.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CS64  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 31 mm	Aspecto: aterciopelado con pliegues radiados, centro elevado. Color del micelio: gris con áreas rosadas, centro blanco. Exudado: amarillo.	Color: marrón con borde rojo.	Solo visible en el reverso.	Se observó.
	AJV8: 32 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: verde oscuro.	No produjo.	Se observó.
	AC: 28 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco, centro verdoso. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón.	No produjo.	Se observó.
CS65  Colonia sobre APD, a 25 ± 0,2°C, 10 d	APD: 33 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado, surcos radiados. Color del micelio: crema, borde rosado. Exudado: amarillo.	Color: marrón, borde rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 33 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: verde oscuro, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 28 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón.	No produjo.	Se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

Aislamiento ^a	Tamaño de la colonia ^b	Descripción del anverso	Descripción del reverso	Producción de pigmento rojo ^c	Fructificación
CS66  Colonia sobre APD, a 25± 0,2°C , 10 d	APD: 32 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde-grisáceo. Exudado: amarillo. Zonación.	Color: verde. Surcos radiados.	No produjo.	No se observó.
	AJV8: 30 mm	Aspecto: granuloso, centro elevado. Color del micelio: crema. Exudado: incoloro, ámbar y ocre.	Color: marrón oscuro, borde rojo.	Difundió pigmento al medio.	Se observó.
	AC: 26 mm	Aspecto: granuloso. Color del micelio: blanco. Exudado: incoloro. Zonación.	Color: marrón, centro más oscuro.	No produjo.	Se observó.
CS67  Colonia sobre APD, a 25± 0,2°C , 10 d	APD: 29 mm	Aspecto: aterciopelado, surcos radiados. Color del micelio: verde, tinte rosado. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AJV8: 26 mm	Aspecto: aterciopelado. Color del micelio: crema-amarillento. Exudado: incoloro y ámbar.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.
	AC: 15 mm	Aspecto: aterciopelado, centro elevado. Color del micelio: amarillo-grisáceo. Exudado: incoloro.	Color: marrón-rojizo.	Difundió pigmento al medio.	No se observó.

^a Las siglas CK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente; ^b los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio, APD: agar papa dextrosa, AJV8: agar jugo de 8 vegetales, AC: agar conejarina; ^c Integrantes del grupo de trabajo lo identificaron como cercosporina.

A manera de resumen, los aislamientos exhibieron colonias con diferentes tamaños tanto en APD, como en AJV8 y AC, durante un período de incubación de 10 días, no detectándose mayores diferencias entre ambas especies.

De igual modo, en APD predominó el tono verde-grisáceo, en cambio en AJV8 predominó el tono crema. Por su parte, en AC, los tonos que se destacaron fueron los blancos, grises y cremas.

La mayoría de los aislamientos fructificaron en el medio AJV8, siendo APD el menos exitoso en este sentido.

5. DISCUSIÓN

Como ya se comentó en la introducción, el cultivo de soja se ve afectado por enfermedades que varían su intensidad en función del estado fenológico, la región, las condiciones climáticas de cada campaña y las estrategias de manejo utilizadas.

El presente estudio tuvo como objetivo contribuir al conocimiento de dos de los fitopatógenos de soja más frecuentes, mediante el aislamiento y la caracterización fenotípica de los mismos.

Las llamadas “EFC”, se fueron transformando en factores limitantes para el óptimo desarrollo del cultivo en las regiones del país que desde hace varios años practican el monocultivo (Sillón, 2009). En el período 2002 a 2008, la mancha marrón y el tizón foliar, fueron las enfermedades predominantes, pero a partir de las campañas agrícolas 2008-2009 y 2009-2010 el aumento de la prevalencia, incidencia y severidad de la MOR fue significativo en la mayoría de las regiones sojeras de Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires. (Carmona y col., 2010; Sillón, 2010)

Durante la campaña 2005/2006 y 2006/2007 se obtuvo, en el laboratorio, la mayor cantidad de aislamientos del hongo *C. kikuchii* a partir de plantas con sintomatología de tizón de la hoja, hecho que coincidió con la aparición y el progreso de numerosas afecciones favorecidas por las abundantes precipitaciones registradas durante ese período (Tabla III.1) (Distéfano y Gadbán, 2009a).

Por el contrario, la campaña 2007/2008 se caracterizó por condiciones ambientales adversas para el progreso de las enfermedades, con escasas lluvias durante los meses de noviembre y marzo en la mayor parte del área productora de cultivo (Distéfano y Gadbán, 2009b). Esto sumado a las heladas tempranas, a mediados de abril, que hicieron estragos en el cultivo de soja, explicaría la disminución tanto en la recepción de muestras como en la recuperación del patógeno.

Durante la campaña 2008/2009, el aislamiento de *C. sojina* a partir de las plantas de soja recepcionadas en el laboratorio, coincidió con la diseminación de la enfermedad, en la mayor parte de la zona sojera de la Región pampeana, con intensos ataques principalmente en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Carmona y Scandiani, 2009).

Si bien el foco primario se detectó en el centro de Córdoba (Distéfano, 2009), la enfermedad progresó rápidamente abarcando un área importante del oeste de la Provincia de Santa Fe debido, posi-

blemente, a la cercanía de los campos y a las lluvias que permitieron el desarrollo del cultivo y que contrastaron fuertemente con la sequía de la zona centro y norte de la provincia (Sillón, 2009).

MOR es una enfermedad policíclica (con varios ciclos de infección durante la campaña) y los conidios producidos por el hongo son diseminados por el viento y el salpicado de las lluvias infectando plantas sanas (Distéfano, 2009).

Los datos obtenidos en el presente estudio, revelaron que tanto la población de *C. kikuchii* como de *C. sojina* presentaron un alto grado de variación fenotípica. Sobre medio APD, los aislamientos fúngicos mostraron colonias con diferentes aspectos macroscópicos, tanto en el color como en el tamaño de las mismas. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Almeida y col. (2005), sobre aislamientos brasileros de *C. kikuchii*.

Con respecto a *C. sojina*, no se han encontrado datos, en la bibliografía, que corroboren la variabilidad fenotípica hallada. Por el contrario a lo observado en el presente trabajo, Luque (2010) informó que, aislamientos seleccionados de distintas provincias, presentaron caracteres macromorfológicos similares mostrando, sus colonias, colores en las distintas gamas del gris.

Debido al amplio rango de tamaños y la variedad de colores que presentaron las colonias tanto de *C. kikuchii* como *C. sojina*, no se pudieron establecer diferencias macroscópicas, entre ambas especies, que permitieran distinguir las.

El pigmento rojo observado entorno a algunas colonias o difundido en el medio, fue causado por la presencia de la cercosporina (Agarwal y Sinclair, 1997; Alaggia y col., 2010). Según Daub y Chung (2009) las condiciones ambientales afectan su producción, siendo la luz el principal factor. También influyen otros factores tales como la temperatura, los nutrientes y micronutrientes y las fuentes de carbono o nitrógeno (Daub y Ehrenshaft, 2000).

Estudios realizados por Daub y Chung (2009) revelaron que esta toxina, es preferentemente sintetizada en cultivos vegetativos y es reprimida cuando crece en AJV8, que es un medio de cultivo que induce la conidiación.

Con *C. nicotianae* encontraron que una delgada capa, menos de 15 mL de medio en una placa de Petri, de APD (Difco) era el mejor medio para la producción de cercosporina bajo luz y que otras marcas de este medio o el elaborado con papas frescas u otro medio sintético reducían dicha producción (Daub y Chung, 2009).

Por el contrario, en el presente trabajo, si bien la mayor cantidad de aislamientos produjeron cercosporina en medio APD, el mismo fue elaborado en forma artesanal. No obstante, en AJV8, también se observaron muchos aislamientos que la producían, aún cuando presentaron esporulación.

Coincidentemente con Daub y Chung (2009), la producción de cercosporina fue altamente variable entre especies y entre aislamientos de una misma especie a pesar de que se respetaron las condiciones de luz y temperatura para su incubación.

En general, los hongos pertenecientes al género *Cercospora*, así como otros géneros similares, presentan una gran dificultad en esporular cuando se cultivan sobre medio artificial (Cadwell, 1994; Avila de la Calle y col., 2004; Agrios, 2007; Quinteros Benítez y col., 2008). En este estudio la mayoría de los aislamientos fructificaron en AJV8 coincidiendo con lo reportado por otros autores (Daub y Chung, 2009).

No obstante, la información acerca de cual es el medio óptimo para el estudio de la esporulación de *Cercospora* es diversa y confusa, ya que no hay criterios uniformes entre los distintos autores. Este hecho particular pone en evidencia la gran variabilidad "entre" y "dentro" de las especies pertenecientes a este género (Chen y col., 1992; Jenks y col., 1989; Salvador y Garrido, 1990; Brunelli, 2004; Cai, 2004).

El género *Cercospora* pertenece al grupo de hongos dematiáceos (de color oscuro), que poseen hifas septadas pigmentadas de color verde oliva y marrón. Vale la pena mencionar que el número de conidios, su tamaño y el número de septos se ven afectados tanto por el medio ambiente como por los medios de cultivo utilizados (Cai, 2004). Yeh y Sinclair (1980) informaron diferencias en el tamaño del conidióforo y conidios de los aislados que estudiaron, incluso cuando se incubaron en las mismas condiciones. Tanto Carmona y col., (2009) como Formento y de Souza, (2009) (datos no publicados), encontraron conidióforos y conidios de *C. sojina* de diferentes tamaños aunque los conidios, siempre fueron más cortos y anchos que los de *C. kikuchii*, los cuales se muestran frecuentemente como "látigos" largos y flexuosos. Pero a pesar de que en el presente trabajo también se observó variabilidad en el tamaño de las estructuras, pudieron diferenciarse las especies *C. kikuchii* y *C. sojina* por sus características micromorfológicas.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS DE *CERCOSPORA*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE HONGOS FITOPATÓGENOS

En el mundo, las áreas destinadas al cultivo de cereales y oleaginosas, ocupan grandes extensiones. Sin embargo, un gran porcentaje de su producción se ve afectado por organismos fitopatógenos entre los que se encuentran bacterias, hongos, nematodos, protozoarios, virus y plantas parásitas (Staskawicz y col., 1995). Los daños que ocasionan, derivan en grandes pérdidas económicas debido a la disminución del rendimiento de los cultivos (Villegas Fernández, 2012).

En los últimos años los fitopatólogos, han centrado su interés en el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de los agentes patógenos de plantas, a fin de implementar medidas de control y erradicación que sean eficaces y duraderas (McDonald, 1997).

Las principales estrategias que se emplean incluyen, entre otras, el uso de cultivares resistentes y/o tolerantes, el tratamiento de semillas, la aplicación foliar de fungicidas y el empleo de prácticas culturales tales como rotación de cultivos y fechas entre otros (Arias y Andrian, 2009; Villegas Fernández, 2012). Sin embargo, estas estrategias no han resultado efectivas del todo (Johnson, 1984; Gilligan, 2008; Moreno y col., 2008).

El uso de pesticidas para el control de plagas agrícolas es una práctica común, pero las aplicaciones continuas de estos, provocan la aparición de resistencia en las poblaciones de hongos, siendo uno de los problemas más serios de la agricultura a nivel mundial (Staub, 1991; Imazaki y col., 2006; Bradley, 2011; Zhang y col., 2012).

La estructura genética de las poblaciones está determinada por la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, refleja su historia evolutiva y su potencial para evolucionar (McDonald, 1997). Su conocimiento es fundamental para saber con qué rapidez, un patógeno, se puede adaptar a los cambios en su medio ambiente para poder sobrevivir. Como ya se comentó, en los ecosistemas agrícolas, los cambios ambientales pueden deberse al uso de variedades resistentes, aplicaciones de fungicidas químicos, fertilizantes, irrigación y rotación de cultivos (Manzo Sánchez, 2001).

Las poblaciones con un alto nivel de variabilidad genética pueden adaptarse rápidamente a estos cambios, por lo tanto, tal información puede ser utilizada para predecir durante que período de tiempo será efectivo un método para control de fitopatógenos.

1.2. MÉTODOS PARA DETECTAR VARIABILIDAD GENÉTICA EN HONGOS

La variabilidad genética es un fenómeno común en la naturaleza y se determina a través de las variaciones del genotipo.

La medida directa de la variabilidad se logra a través del análisis del ADN de cada individuo de la población en estudio o de una muestra de ella, pero también puede obtenerse a partir del análisis de la expresión de los genes contenidos en el ADN, pudiendo tratarse de una molécula, un proceso fisiológico o una determinada estructura morfológica, controlados por los genes que se desean evaluar (Pérez, 2000).

1.2.1 MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos son herramientas importantes para el estudio de poblaciones. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y se los conoce en forma genérica como marcadores moleculares (Picca y col., 2010). Son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana, ya que permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, ya sea que modifiquen o no su fenotipo.

Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede ser considerada, a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos significativos hasta la variación de un solo nucleótido (Picca y col., 2010).

Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación y sencillo de analizar (Cruz, 2010).

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido el análisis del genoma y de las variaciones existentes, tanto en regiones que codifican productos génicos, como en aquellas cuyas funciones aún permanecen desconocidas (Povh y col., 2008).

1.2.1.1. Tipos de marcadores genéticos

Los marcadores utilizados en el análisis genético pueden ser divididos en tres tipos:

1.2.1.1.1. Marcadores morfológicos

Fueron los primeros en ser utilizados. Mendel usó entre otros, el carácter rugoso o liso de las semillas para analizar la segregación de los cruzamientos de arvejas. Por su parte, en 1952, Rick desarrolló uno de los mapas genéticos más completos en tomate utilizando caracteres morfológicos (Álvarez Gil, 2011).

Estos marcadores son de uso limitado en el mejoramiento genético de vegetales, principalmente porque su expresión puede estar influenciada por el ambiente o por factores genéticos (por ejemplo, epistasia o genes modificadores), lo que altera el fenotipo de la planta e interfiere en el mejoramiento (Masuelli, 1999).

1.2.1.1.2. Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos más utilizados son las proteínas de reserva de la semilla y las isoenzimas.

Las primeras, por tener distinto peso molecular (PM) y carga, se pueden separar por electroforesis en geles de poliacrilamida y teñir con un colorante para proteínas. Las bandas que se obtienen son producto de la expresión de genes y se analizan como marcadores genéticos (Masuelli, 1999).

Las isoenzimas consisten en moléculas de proteína que poseen cargas diferentes y pueden separarse aplicando electroforesis. Estas enzimas catalizan reacciones bioquímicas específicas por lo tanto, al separarlas en geles de almidón y poliacrilamida, agregarles el sustrato y los cofactores apropiados, se produce una reacción bioquímica que reduce una sustancia coloreable, la que se deposita como una banda en el gel. Estas bandas se pueden analizar como marcadores genéticos (Masuelli, 1999).

Su aplicación está dirigida a la cuantificación de heterocigosis y otras medidas de variación genética intra e interpoblacional. Han sido aplicadas exitosamente para evaluar y entender aspectos de la biología evolutiva como los sistemas de reproducción y patrones de fecundación cruzada, relaciones entre fenotipo y ambiente, filogenia e interacciones planta-animal (Perez-Nasser y Piñero, 1997). También han resultado ser de gran valor en estudios de mejoramiento tanto en poblaciones naturales como en plantaciones de árboles y continúan siendo útiles en estudios a gran escala de la estructura poblacional y en relación con la resistencia a plagas y enfermedades (Azofeifa-Delgado, 2006).

En la actualidad los marcadores bioquímicos han sido reemplazados en gran medida por otros tipos de marcadores genéticos; entre sus principales desventajas se pueden citar el menor nivel de detección y que al ser productos de la expresión génica, se ven afectados por modificaciones postranscripcionales del ARN o postransduccionales de las proteínas (Masuelli, 1999). Sin embargo, las proteínas de reserva se siguen utilizando en la identificación de especies y variedades pertenecientes a la misma especie (Picca y col., 2010).

1.2.1.1.3. Marcadores moleculares

Dentro del tercer grupo de marcadores se encuentran aquellos que detectan polimorfismo a nivel del ADN. Existen diferentes técnicas basadas en biología molecular que permiten detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la digestión del ADN con enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, la aplicación de sondas marcadas y las hibridaciones son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Picca y col., 2010).

1.2.1.1.3.1. Marcadores moleculares basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de marcadores moleculares a fin de facilitar el análisis de genomas complejos, entre estos se destacan los basados en la PCR (Mullis y col., 1986; Torres Tejada y Baca, 1995).

1.2.1.1.3.1.1. ISSRs “Inter Simple Sequence Repeats”

Los ISSRs son marcadores genéticos que permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélites que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en “tandem” de motivos simples como $(CT)_n$ o $(CA)_n$, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan (González y Aguirre, 2007).

Estos marcadores también han sido llamados “microsatellite-primed PCR”, o MP-PCR, por ser regiones del genoma, entre microsatélites, específicamente amplificadas (Meyer y col., 1993; Lurá y col., 2011).

La molécula generada, con un PM determinado, se considera un “locus” que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Se asume que existen dos alelos por “locus”. Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de una banda representa el genotipo dominante (homocigota o heterocigota), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigota recesivo (González y Aguirre, 2007).

Los ISSRs frecuentemente amplifican entre 25 a 50 bandas en una sola reacción, las que se pueden visualizar tanto en geles de agarosa como de acrilamida. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella digital genética” de cada uno de los individuos analizados (González y Aguirre, 2007).

1.2.1.1.3.1.2. RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA”

Esta técnica consiste en la amplificación de segmentos de ADN a través del uso de un oligonucleótido (ADN monohebra de 10 pares de bases), de secuencia aleatoria o arbitraria, con un contenido de GC de 50-80% sin secuencias palindrómicas (Williams y col., 1990).

El número de fragmentos de ADN amplificados es dependiente del oligonucleótido y del ADN genómico empleados. Las condiciones de la reacción de PCR limitan el tamaño de los mismos entre 100-3000 bp (Bonell, 2000).

El polimorfismo entre los individuos resulta de las diferencias en las secuencias de hibridización de los oligonucleótidos y se comporta como marcador genético del tipo dominante (Azofeifa-Delgado, 2006).

1.2.1.1.3.2. Marcadores moleculares basados en la digestión con endonucleasas (enzimas de restricción)

1.2.1.1.3.2.1. RFLP “Restriction Fragment-Length Polymorphisms”

La aplicación de endonucleasas de restricción permite estudiar el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Los diferentes patrones de bandas intra o interespecie, pueden deberse a sustituciones de bases en los lugares de restricción, a inserciones o deleciones de ADN o al reordenamiento de secuencias (Fontdevila y Moya, 1999).

Los RFLPs proporcionan marcadores codominantes que se han utilizado en la realización de mapas de ligamiento, estudios de segregación y paternidad; es una técnica robusta y fácil de aplicar (Picca y col., 2010).

1.3. ESPACIADORES DE TRANSCRIPCIÓN INTERNA: ITS “Internally transcribed spacers”

El empleo del ADNr es especialmente útil en estudios taxonómicos y filogenéticos, debido a la diferente evolución que presentan las distintas regiones que lo componen o, dicho de otra manera, a que la tasa de sustitución nucleotídica presenta ritmos diferentes en las distintas regiones (Martínez Culebras, 1999).

La subunidad pequeña (18S) es la que presenta una tasa de evolución más baja y sería útil para el estudio de organismos muy divergentes. La subunidad mayor (26S) muestra una tasa de evolución más rápida que la anterior, presentando algunas regiones determinadas con mayor variabilidad, que pueden utilizarse para discriminar entre especies. El gen 5.8S muestra una variabilidad parecida a la subunidad pequeña, pero su menor tamaño dificulta el estudio de organismos muy divergentes. Por último, las zonas espaciadoras son las más variables y útiles para el estudio de organismos que se encuentran próximos en la filogenia (Martínez Culebras, 1999).

La variabilidad hallada en estas regiones (ITS1 e ITS2) puede usarse para discriminar tanto entre especies próximas, como entre variedades de la misma especie.

1.4. SECUENCIACIÓN DE ADN

Los métodos de secuenciación permiten, de manera simple y rápida, determinar la secuencia nucleotídica de cualquier fragmento de ADN (Rodríguez Tarduchy y Santiago Martínez, 2003).

1.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

1.5.1. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS (“CLUSTERING”)

El agrupamiento de datos o “clustering”, también conocido como análisis de conglomerados, es una técnica de análisis estadístico. Su objetivo es clasificar objetos similares en diferentes grupos, o más precisamente, la partición de un conjunto de datos en sub-conjuntos (“clusters”) disjuntos, de tal forma que los datos de cada uno de ellos, compartan algún rasgo en común. Es decir, que se forman grupos en los cuales los objetos que se encuentren dentro de dicho grupo sean similares entre sí y objetos que se encuentren en diferentes grupos sean lo más disímiles posibles (Peña, 2002).

Existen diferentes enfoques para las técnicas de “clustering”, entre los que se encuentran los *Algoritmos particionales*, que construyen varias particiones y las evalúan siguiendo algún criterio y los *Algoritmos jerárquicos*, que crean una jerarquía que descompone el conjunto de datos usando algún criterio (Johnson y Wichern, 1999).

Entre los métodos particionales se encuentra “Fuzzy Analysis” (FANNY) basado en principios de lógica difusa que asigna a cada elemento un grado de pertenencia a la agrupación. El concepto de probabilidad juega un rol fundamental. El algoritmo combina la elección óptima de la cantidad de conglomerados (k) y el parámetro r relacionado con el grado de difusividad o “membership exponent” y asociado a la fuerza de la pertenencia al “cluster” (Kaufman y Rousseeuw, 2008).

En lugar de demostrar que un objeto en particular pertenece al “cluster” 1, FANNY establece que un objeto pertenece en un 90% al “cluster” 1, en un 5% al “cluster” 2 y en un 5% al “cluster” 3; indicando que es más probable que el objeto pertenezca al “cluster” 1 pero que existen dudas a favor de los “cluster” 2 y 3 (Kaufman y Rousseeuw, 2008)

Entre los métodos jerárquicos se encuentra el algoritmo “Agglomerative Nesting Hierarchical Clustering Algorithm” (AGNES).

En AGNES, en el primer paso del algoritmo, los dos objetos más cercanos son unidos, dejando n-1 “cluster”, uno de los cuales contiene dos objetos y los restantes aún tienen uno solo. En todos los sucesivos pasos, los dos “clusters” más cercanos son fusionados entre sí. Se construyen “clusters” jerárquicos aglomerativos y existen formas de medir la disimilaridad entre los mismos. Entre ellos se encuentra el método de Ward (“Ward’s method”) que se aplica para datos de tipo cuantitativo (Ward, 1963; Kaufman y Rousseeuw, 2008)

Este algoritmo permite presentar dos tipos de gráficos: el Dendrograma y el Banner.

También brinda un coeficiente que indica la consistencia de los “clusters” denominado “Agglomerative Coefficient” (AC) que es un número adimensional entre 0 y 1. El AC puede ser comparado con el Coeficiente “Silhouette” (SC) obtenido con los algoritmos particionales, como FANNY (Kaufman y Rousseeuw, 2008).

1.5.2. MEDIDAS DE ASOCIACIÓN Y DISTANCIA

Para describir el grado de parecido que hay entre individuos es necesario medir el grado de similitud.

Hay dos tipos de medidas: los índices de similaridad y las distancias. Los primeros miden el grado de similitud, es decir, si los individuos frente a un conjunto de variables coinciden o no en sus características. Las segundas miden el grado de disimilitud, cuanto más parecidos son dos individuos menor será su distancia, estos dos índices están relacionados: distancia = 1 – similaridad.

Dos de los índices que comparten el criterio de similaridad son Jaccard y Dice.

Coeficiente de Jaccard: es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en los dos individuos.

Coeficiente de Dice: es la proporción de caracteres copresentes respecto al promedio de los caracteres presentes en cada individuo.

En el análisis de la información a partir de bandas, primero se codifica la información, luego se construye la matriz de datos y posteriormente se calculan las matrices de asociación de Jaccard y Dice (Winzer y col., 2010).

1.5.3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UNA CLASIFICACIÓN JERÁRQUICA: EL DENDROGRAMA

La representación gráfica de una clasificación jerárquica es un dendrograma o árbol jerárquico (que puede ser o no enraizado según se hipoteticen o no acerca de un ancestro común a todo el árbol) que indicará como se van asociando los individuos objeto del análisis, a medida que disminuye el grado de semejanza entre ellos. Estos árboles generalmente van acompañados por un eje que indica la distancia y/o similaridad a la que se han producido las diferentes uniones y que se denomina índice de jerarquía. Para dividir o clasificar los individuos en grupos distintos bastará trazar una línea recta para un valor de índice determinado y observar los “clusters” constituidos por debajo de dicho valor, ignorando los agrupamientos que se producen a un valor superior (Figura IV.1) (Bramardi, 2007).

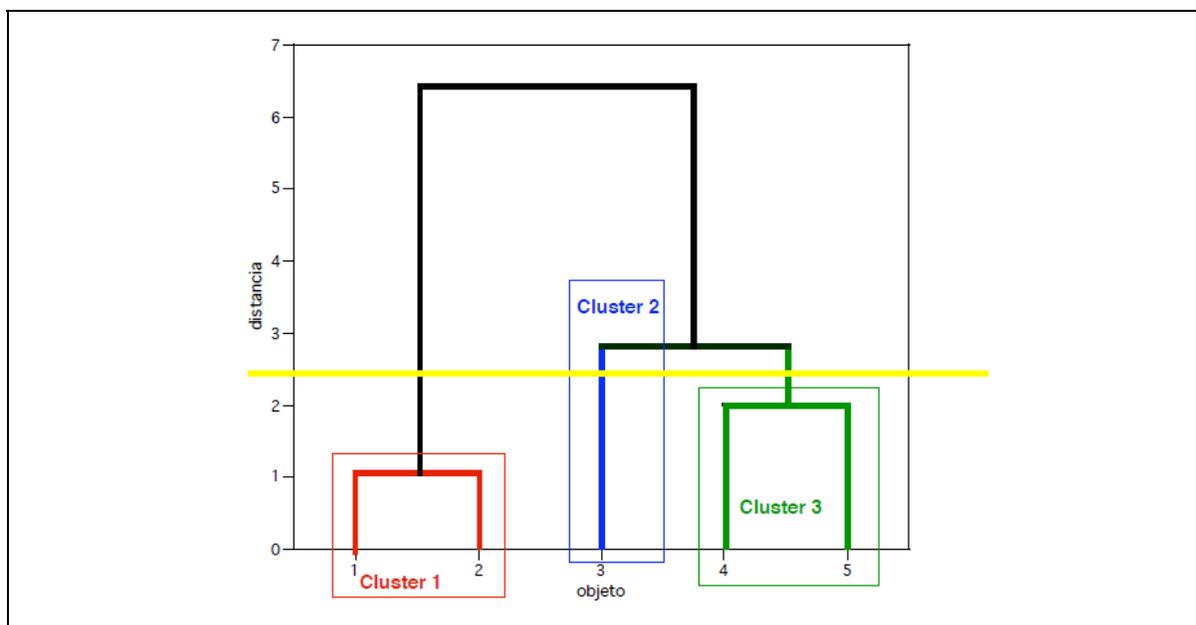


Figura. IV. 1. Dendrograma o árbol jerárquico sin raíz. Esquema que lo representa

Fuente: <http://biplot.usal.es/ALUMNOS/CIENCIAS/2ESTADISTICA/MULTIVAR/cluster.pdf>

Las distancias entre taxas en un árbol de estas características son ultramétricas, ya que se representan equiespaciadas de los puntos de unión.

Los algoritmos para la obtención de dendrogramas tienen siempre como primer paso transformar la disimilaridad original en ultramétrica. Existen diversas formas de realizar tal transformación, lo que da origen a diferentes métodos de construcción de árboles, conocidos generalmente como métodos de agrupación.

Entre los métodos de encadenamiento más difundidos se encuentra UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) (Bramardi, 2007).

1.5.4. “BOOTSTRAP”

Uno de los índices más utilizados para medir la estabilidad o grado de apoyo de los clados de los árboles obtenidos es el “Bootstrap” o técnica de remuestreo (Arnedo y Carranza, 2011). Este test estadístico ha sido propuesto para estimar los límites de confianza de las ramas internas de un dendrograma (Felsenstein, 1985). Desde el punto de vista puramente estadístico, el “bootstrap” es un método para estimar varianzas, intervalos de confianza y otras características de ciertos estadísticos cuando no se conoce o es difícil de establecer, la distribución de las muestras (Efrón, 1987). Con este fin, se asume que la muestra inicial representa fielmente las características del universo al que representa, por lo que en lugar de obtener más muestras de dicho universo, pueden generarse nuevas muestras a partir de la original por remuestreo de la misma (Arnedo y Carranza, 2011).

2. OBJETIVOS

- Caracterizar molecularmente la población de cepas de *Cercospora*, aisladas de soja, mediante: a) la amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR); b) RAPD-PCR y c) la amplificación, por PCR, de regiones intergénicas (ITS) del ADN_r, su posterior análisis mediante RFLP (RFLP-PCR) y su secuenciación.
- Establecer la relación filogenética entre los aislamientos obtenidos.
- Confeccionar un "mapa" delimitando regiones según las diferentes especies o los clones de una misma especie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las técnicas clásicas de Biología Molecular se llevaron a cabo según los protocolos propuestos por Innis y Gelfand, (1990).

3.1. AISLAMIENTOS FÚNGICOS

Se trabajó con cultivos monospóricos de los aislamientos regionales de *C. kikuchii* y *C. sojina* y las cepas pertenecientes a la colección japonesa NITE Biological Resource Center (NBRC), *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715.

3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL DEL HONGO

Cada aislamiento se sembró sobre sendas estrías de APD y se incubó durante 4 días a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz fría y 8 h de oscuridad) (Salvador y Garrido, 1990; Mattio y col., 2008). A continuación, se les agregó 5 mL de agua estéril y se raspó la superficie de la colonia con un ansa, a fin de desprender los elementos fúngicos. La suspensión (10^5 - 10^6 UFC/mL) se agregó a 100 mL de medio MLC (medio de cultivo para *Colletotrichum*) (Bundie y col., 1999; Mattio y col., 2008; Latorre Rapela y col., 2011) y se incubó, durante 48 h, manteniendo las condiciones descritas anteriormente, en agitación orbital (Orbital Shaker, Forma Scientific, Inc.) a 180 rpm. El micelio se recogió sobre un filtro de tela de nylon (200 μm de diámetro de poro) y se secó con la ayuda de papel absorbente hasta eliminar la humedad. Una vez seco, se estiró formando una capa lo más fina posible. Posteriormente se llevó a sequedad en estufa a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ hasta pesada constante. Una vez seco, el micelio, se trituroó en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Para la extracción de ADN total, se trabajó de acuerdo al protocolo de Lee y Taylor, (1992) con las modificaciones propuestas por Di Conza y col. (2007).

El micelio pulverizado del hongo (0,06 g) se trató con 600 μL de buffer de lisis [Tris-HCl (pH 7,2) 0,05 M, EDTA 0,05 M, SDS 3%, 2-mercaptoetanol 1%] y 60 μL de sarkosyl (10%). La suspensión se incubó a 65°C durante 1 h y se añadió 200 μL de acetato de potasio 5 M y 100 μL de cloruro de sodio 4 M. Después de homogeneizar invirtiendo 10 veces, la suspensión se colocó en hielo por 10 min. A continuación se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó igual volumen de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La suspensión se mezcló por inversión hasta observar emulsión, se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm y luego se trasvasó, cuidadosamente, la fase acuosa a otro tubo. La extracción con fenol-cloroformo-isoamílico se realizó dos veces. A continuación se adicionó igual volumen de una solución de cloroformo-isoamílico (24:1, v/v) y se mezcló por inversión hasta la formación de una emulsión. Se centrifugó por 5 min a 13000 rpm. La fase acuosa fue recuperada y el ADN precipitado con el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol. El tubo se incubó a temperatura ambiente por 20-30 min y el ADN se obtuvo por centrifugación a 13000 rpm durante 15 min. El pellet se lavó con 500 μL de etanol 70% (previamente enfriado a -20°C) y se secó completamente a 37°C . Finalmente el ADN fue solubilizado en 100 μL de agua milliQ, tratado con 1 μL RNAsa (Promega, 10 mg/mL) y almacenado a -20°C . El ADN se cuantificó leyendo la absorbancia en espectrofotómetro (A260) y su calidad se evaluó mediante electroforesis sumergida horizontal en geles de agarosa al 0,8% w/v (Sambrook y col., 1989).

3.3. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES ENTRE MICROSATÉLITES (ISSR-PCR)

La amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR) del genoma de cada aislamiento se llevó a cabo según lo propuesto por Longato y Bonfante (1997), utilizándose los siguientes oligonucleótidos (FAGOS/Ruralex, Argentina):

(CAC)₅: 5'-CACCACCACCACCAC-3'
 (GTG)₅: 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'
 (GACA)₄: 5'-GACAGACAGACAGACA-3'

La mezcla de reacción, con un volumen final de 50 µL, consistió en aproximadamente 20 ng de ADN y 5 µL de buffer de reacción (InbioHighway, Argentina) con 1,5 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTPs (InbioHighway, Argentina), 100 pmol de oligonucleótido y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (InbioHighway, Argentina) (5 U/µL). Al final de la reacción se agregó aceite mineral (15 µL). Los ensayos control se llevaron a cabo sin adición de ADN. La reacción de amplificación se realizó en un MJ Research Thermal Cycler programado de la siguiente manera:

Con los oligonucleótidos (CAC)₅ y (GACA)₄, un ciclo de 1 min a 94°C seguido de 27 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a la temperatura de “annealing” específica para cada oligonucleótido, 57°C y 52°C respectivamente y 4 min a 72°C. Finalmente la temperatura de extensión fue de 72°C durante 7 min (Bornet y Branchard, 2001).

Con el oligonucleótido (GTG)₅, se comenzó con una temperatura de “annealing” de 70°C, disminuyendo de a 2°C cada dos ciclos subsecuentes hasta 55°C y 25 ciclos más de 55°C. La temperatura de extensión fue de 72°C (Longato y Bonfante, 1997; Lurá y col., 2011).

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis sumergida horizontal en geles de agarosa de 2,2 % w/v con TBE 0,5x (Tris-borato 0,089 M, EDTA 0,002 M) (Sambrook y col., 1989). El tiempo de corrida fue de 3 h, con un voltaje constante de 100 V. La tinción del gel se realizó con Bromuro de Etidio. Los marcadores de PM utilizados fueron: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (Promega) y 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina).

Todas las reacciones se realizaron por duplicado y se incluyeron *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. como géneros diferentes.

3.3.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS Y ÁRBOLES OBTENIDOS CON LA TÉCNICA ISSR-PCR

Los perfiles de bandas obtenidos con cada uno de los 3 oligonucleótidos ensayados, se fotografiaron y analizaron con el equipo Gel Doc XR System (BIORAD-Life Science Cat. # 170-8170) usando el Software Quantity One para determinar la similitud entre hongos; la matriz de distancia se obtuvo aplicando el algoritmo de Dice (D) y se representó gráficamente por medio de un dendrograma utilizando UPGMA. Para comprobar la fiabilidad del dendrograma, se realizó un procedimiento de remuestreo por el método de “bootstrap”, donde se realizaron 1000 réplicas mediante el Programa WinBoot. Los valores de “bootstrap” obtenidos se señalaron en los nodos del árbol. Se consideró que valores menores al 50% no tenían soporte estadístico y como valores significativos se consideraron los mayores o iguales al 70% (Martínez Castilla, 2007).

3.3.2. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LOS AISLAMIENTOS GENÉTICAMENTE RELACIONADOS

Los grupos formados por los aislamientos genéticamente relacionados, en base al dendrograma obtenido con el oligonucleótido (GTG)₅ se volcaron sobre un plano de la provincia de Santa Fe, de manera de visualizar la distribución espacial y temporal de los mismos.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE RAPD-PCR

Para estudiar la variabilidad genética entre las especies de *Cercospora*, se realizaron reacciones de RAPD según la metodología propuesta por Williams y col. (1990), utilizando veinte oligonucleótidos de la serie OPA (FAGOS/Ruralex, Argentina) (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de RAPD

Oligonucleótido	Secuencia
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-19	5'-CAAACGTCCG-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'

OPA: oligonucleótidos serie Operón

La mezcla de reacción fue preparada para un volumen total de 50 μ L conteniendo: 2,5 mM de Cloruro de Magnesio, 125 μ M de cada uno de los dNTP (Inbiohighway), 1 μ M de oligonucleótido, 5 U de *Taq* ADN polimerasa (Inbiohighway) y 20 ng de ADN por reacción. La amplificación fue llevada a cabo utilizando un MJ Research Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 min a 95°C, 40 ciclos de 75 s a 94°C, 90 s a 36°C y 150 s a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis sumergida horizontal en geles de agarosa al 1,5 % w/v con TBE 0,5x (Tris-borato 0,089 M, EDTA 0,002 M). El tiempo de corrida fue de 180 min, con un voltaje constante de 100 V. La tinción del gel se realizó con Bromuro de Etidio (Sambrook y col., 1989). Los marcadores de PM utilizados fueron: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III (Promega) y 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina). Los perfiles de bandas obtenidos fueron fotografiados y analizados con el equipo Gel Doc XR System (BIORAD-Life Science Cat. # 170-8170) usando el Software Quantity One para determinar la similitud entre hongos.

Se efectuó un control negativo (sin ADN) a fin de descartar contaminación de los reactivos.

Todas las reacciones se realizaron por duplicado y se incluyeron *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. como géneros diferentes.

3.4.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS Y ÁRBOLES OBTENIDOS

Para cada una de las imágenes resultantes de los ensayos con cada oligonucleótido usado, se construyó una matriz con 0 y 1 correspondientes a ausencia y presencia de banda, respectivamente, lográndose un total de N=18 matrices binarias, mx21 (donde N representó la cantidad de oligonucleótidos que amplificaron, m las bandas obtenidas y 21 el total de hongos analizados).

A partir de estas matrices, se obtuvieron las matrices de distancia entre los hongos (mx21), con el Coeficiente de Jaccard, diseñado para variables binarias asimétricas (Tabla IV.2) (Johnson y Wichern, 1999; Everitt y Hothorn, 2009; Cuadras, 2011).

Tabla IV.2. Tabla de contingencia que resume las coincidencias en la presencia / ausencia de bandas entre los pares de hongos

		Hongo j		Total
		1	0	
Hongo i	1	a	b	a+b
	0	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d

Letras i y j: corresponden a hongos diferentes si $i \neq j$ y al mismo hongo si $i = j$; 1: presencia de bandas; 0: ausencia de bandas; a, b, c y d son las frecuencias¹.

¹ El coeficiente de distancia está dado por $J = a / (a+b+c)$ donde a representa dos presencias (1:1), b representa presencia-ausencia (1:0) y c ausencia-presencia (0:1). Se elimina del cálculo el resultado de dos ausencias (0:0) (Digby y Kempton, 1987).

Una vez obtenidas las 18 matrices de distancia, se calculó una matriz de distancia promedio (mx21) y se realizó el análisis de correspondencia (Biplot) con el software R versión 2.10.1 a fin de seleccionar los oligonucleótidos que presentaran características diferentes (Hair y col., 1999; Torgo, 2003).

Finalmente se aplicaron algoritmos de agrupación (FANNY y AGNES) para generar el dendrograma. En la Figura IV.2 se resume el proceso:

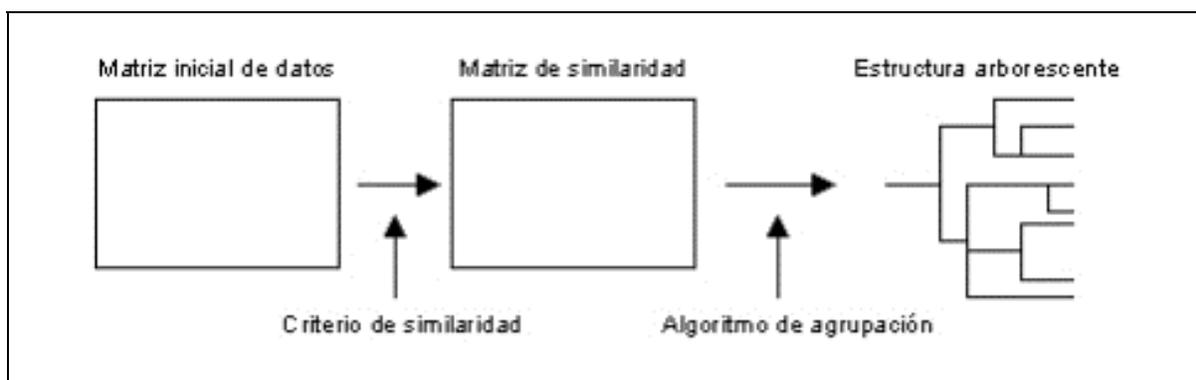


Figura IV.2. Esquema que representa el proceso para generar el dendrograma

Fuente: Hair y col., 1999; Torgo, 2003

Una vez seleccionados los oligonucleótidos, las reacciones de RAPD se llevaron a cabo con el total de la población de hongos aislados ($n=52$) y las dos cepas patrones (*C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715).

De manera semejante a la descrita anteriormente, para cada uno de los perfiles de bandas obtenidos, se construyó una matriz con 0 y 1 correspondientes a ausencia y presencia de bandas, respectivamente, obteniéndose un total de 4 matrices binarias, mx54, donde 4 fue la cantidad de oligonucleótidos considerados, m las bandas obtenidas y 54 el total de hongos analizados. A partir de estas matrices, se obtuvieron las matrices de distancia (mx54) con el Coeficiente de Jaccard¹ (Johnson y Wichern, 1999; Everitt y Hothorn, 2009).

Una vez obtenidas las cuatro matrices, se calculó la matriz de distancia promedio (mx54), esencial para aplicar técnicas de “clustering” (Peña, 2002; Bolshakova y Azuaje, 2003; Abonyi y Feil, 2007).

A fin de comparar la concordancia entre los resultados, se aplicaron el algoritmo de partición FANNY y el algoritmo jerárquico AGNES. En este último caso, la distancia entre “clusters” (k) fue analizada por el método de Ward (Ward, 1963).

La calidad de los “clusters” obtenidos con FANNY, se evaluó mediante el Coeficiente Silhouette (SC) y en el caso del algoritmo AGNES se aplicó el Coeficiente de Aglomeración (AC) (Kaufman y Rousseeuw, 2008).

Los datos fueron procesados con la versión 2.10.1 del software R (Torgo, 2003)².

3.5. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LAS REGIONES INTERGÉNICAS (ITS) DE ADN_r. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para la amplificación de la región ITS del ADN_r se utilizaron los oligonucleótidos ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-'3) e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-'3) (FAGOS/Ruralex, Argentina) (White y col., 1990; Siboe y col., 2000).

La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 50 µL, que incluía 5 µL de buffer 10x (InbioHighway, Argentina), 5 µL de cada uno de los dNTP 10 mM (InbioHighway, Argentina), 2,5 µL de cada oligonucleótido, ITS-4 e ITS-5 (10 µM), 50 ng de ADN genómico, 0,5 µL de *Taq* ADN polimerasa 5000 U/mL (InbioHighway, Argentina) y 4 µL de MgCl₂ 25 mM. La mezcla se homogeneizó suavemente y centrifugó a fin de que se depositara en la parte inferior del tubo. Luego se cubrió con 15 µL de aceite mineral estéril. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research Thermal Cycler, programado de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min y 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min, extensión de la cadena a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los ensayos de control se realizaron sin el agregado de ADN, en su lugar se adicionó igual volumen de agua Milli-Q.

La concentración de ADN fue determinada por electroforesis sumergida horizontal (buffer TBE 0,5x) en geles de agarosa 0,8% a 100 V (Sambrook y col., 1989), por comparación con el 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina) usado como marcador de PM.

Los productos de PCR amplificados fueron extraídos del gel de agarosa y purificados con el "Kit" Wizard SV Gel & PCR Clean Up System (Promega, Cat.#A9281).

3.5.1. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS Y PURIFICADOS MEDIANTE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Una vez purificados los productos de PCR amplificados, se digirieron con las siguientes endonucleasas de restricción: *Hae*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Dde*I, *Hinf*I y *Rsa*I (Promega).

Para la reacción de restricción se mezclaron 2,5 µL del producto amplificado, 2 µL de buffer específico para la enzima, 0,2 µL de BSA ("Bovine Serum Albumin") y 0,5 µL de la enzima, con un volumen final de 20 µL.

Todas las reacciones de digestión se incubaron a 37°C durante 3 h, según las instrucciones del fabricante y se resolvieron mediante electroforesis sumergida horizontal en geles de agarosa 3%. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio, fotografiados y analizados con el equipo Gel Doc XR System (BIORAD-Life Science Cat. # 170-8170) usando el Software Quantity One (Siboe y col., 2000).

² Se trabajó en colaboración con docentes del Departamento de Matemáticas de la FBCB

3.5.2. SECUENCIACIÓN. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Los productos de amplificación purificados se enviaron, para su secuenciación, al Instituto de Biotecnología (Unidad de Genómica) perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

El análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas se realizó con el programa Chromas Lite 2.01 y se alinearon usando los programas Vector NTI.9. Align X (<http://bioinformatics.unc.edu/software/nti/index.htm>) y Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Una vez alineadas se compararon con aquellas disponibles en base de datos GenBank para especies de *Cercospora* (Número de acceso: AY633838 para *C. kikuchii* y AY266157 para *C. sojina*) (Lurá y col, 2011).

4. RESULTADOS

4.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES ENTRE MICROSATÉLITES (ISSR-PCR)

Como consecuencia de la amplificación de las regiones entre microsátélites de los aislamientos fúngicos y de las cepas patrones NBRC, con los oligonucleótidos (CAC)₅, (GTG)₅ y (GACA)₄, se produjeron bandas reproducibles que permitieron detectar polimorfismo entre los hongos estudiados (Figuras IV.3, IV.4 y IV.5, respectivamente)³.

En la Tabla IV.3 se resumen los resultados logrados a partir del análisis del perfil de las bandas obtenidas con cada uno de los oligonucleótidos. El número de bandas detectadas y el polimorfismo dependió del oligonucleótido utilizado.

Con (CAC)₅, se obtuvo un promedio de 10 bandas por hongo con un máximo de 17 y un mínimo de 3.

Con el oligonucleótido (GTG)₅, el promedio de bandas generadas por cada hongo fue de 10, con un máximo de 19 y un mínimo de 4.

Al emplear la secuencia (GACA)₄, se amplificó un promedio de 12 bandas, con un máximo de 21 y un mínimo de 3 por hongo.

Tabla IV.3. Análisis del perfil de bandas de los aislamientos de *Cercospora* y de las cepas patrones NBRC según el oligonucleótido utilizado.

Oligonucleótidos	Nº máx. de bandas	Nº mín. de bandas	Nº Total de bandas	Cantidad de bandas polimórficas	Rango de tamaños (bp) *
(CAC) ₅	17	3	72	72	2598,40-215,42
(GTG) ₅	19	4	63	63	2358,92-158
(GACA) ₄	21	3	70	70	2441,12-219,51

*bp: pares de base

³ Se pueden visualizar en las páginas 92, 95, 98 respectivamente

4.1.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS Y ÁRBOLES OBTENIDOS AL AMPLIFICAR LOS ISSR

En el análisis molecular, los diferentes patrones de bandas ISSR, permitieron reunir a los aislamientos regionales de *Cercospora* y las cepas NBRC en grupos poco relacionados.

Con el oligonucleótido (CAC)₅ se generó un dendrograma, en el cual se pudieron establecer 3 grandes “clusters”, A, B y C, separados a una distancia genética de 0,85 aproximadamente (Figura IV.3).

El “**cluster**” A incluyó aislamientos de las campañas 2005-2006, 2006-2007 y 2008-2009 y se dividió en 2 grupos, A₁ y A₂.

El grupo A₁ contenía los aislamientos CK51 y CK23 de diferentes orígenes geográficos (R2 y R3, respectivamente), con menos del 40% de similitud (nivel de significación del 25,1%).

El grupo A₂ estaba formado por 2 subgrupos A_{2a} y A_{2b}. A_{2a} estaba integrado por un aislamiento, CK35, aislado de la región RiiA R3 y del cultivar RA 514; A_{2b} incluyó 5 aislamientos pertenecientes a especies distintas: CS66, CS63, CK39, CK52 y CK47, provenientes de 3 Regiones RiiA (R3, R5 y R6), y 3 cultivares diferentes (A 4910, A 6411 y A 6401). Los aislamientos correspondientes a *C. sojina*, CS66 y CS63, compartieron el mismo origen geográfico (R3) pero provinieron de diferentes cultivares (A 6411 y A 4910 respectivamente), presentaron un porcentaje de similitud menor del 50% aunque este valor no era estadísticamente significativo (42,1%). Los tres aislamientos restantes, CK39, CK52 y CK47, correspondieron a *C. kikuchii*, a pesar de pertenecer a la misma especie se encontraron alejados genéticamente (porcentaje de similitud menor al 50%), posiblemente por provenir de diferentes regiones (R6, R3 y R5, respectivamente) y cultivares (A 6401, A 4910 y A 6411, respectivamente).

El “**cluster**” B incluyó aislamientos de las campañas 2006-2007, 2007-2008 y 2008-2009 y se dividió en 2 grupos, B₁ y B₂.

El grupo B₁ estaba formado por 2 aislamientos, CS67 y CK50, que presentaron un porcentaje de similitud menor al 40%, pertenecían a especies distintas y provinieron de diferentes regiones (R5 y R2, respectivamente) y cultivares (A 6401 y NA 7708 RG, respectivamente).

En el grupo B₂ se pudieron distinguir 2 subgrupos B_{2a} y B_{2b}. B_{2a} estaba formado por 4 aislamientos (CK41, CK40, CK57 y CS55); CK41 y CK40, presentaron un porcentaje de similitud menor del 50% aproximadamente, fueron aislados de distintas regiones (R6 y R1, respectivamente) y de diferentes cultivares (A 6401 y ASGROW.8000, respectivamente) y CK57 y CS55 mostraron un porcentaje de similitud del 82% (nivel de significación del 80,3%) a pesar de ser especies diferentes y de haber sido aislados de distintas regiones (R3 y R4, respectivamente) y cultivares (A 4910 y MAN 4355, respectivamente). B_{2b} estaba formado por 5 aislamientos (CS62, CK59, CK54, CK45 y CK42), CS62 y CK59 presentaron un bajo porcentaje de similitud entre sí (menor al 50%), a pesar de haber sido aislados de la misma región (RiiA R5) y durante la campaña 2008-2009, aunque eran especies diferentes; los tres restantes CK54, CK45 y CK42, si bien presentaron, entre sí, un porcen-

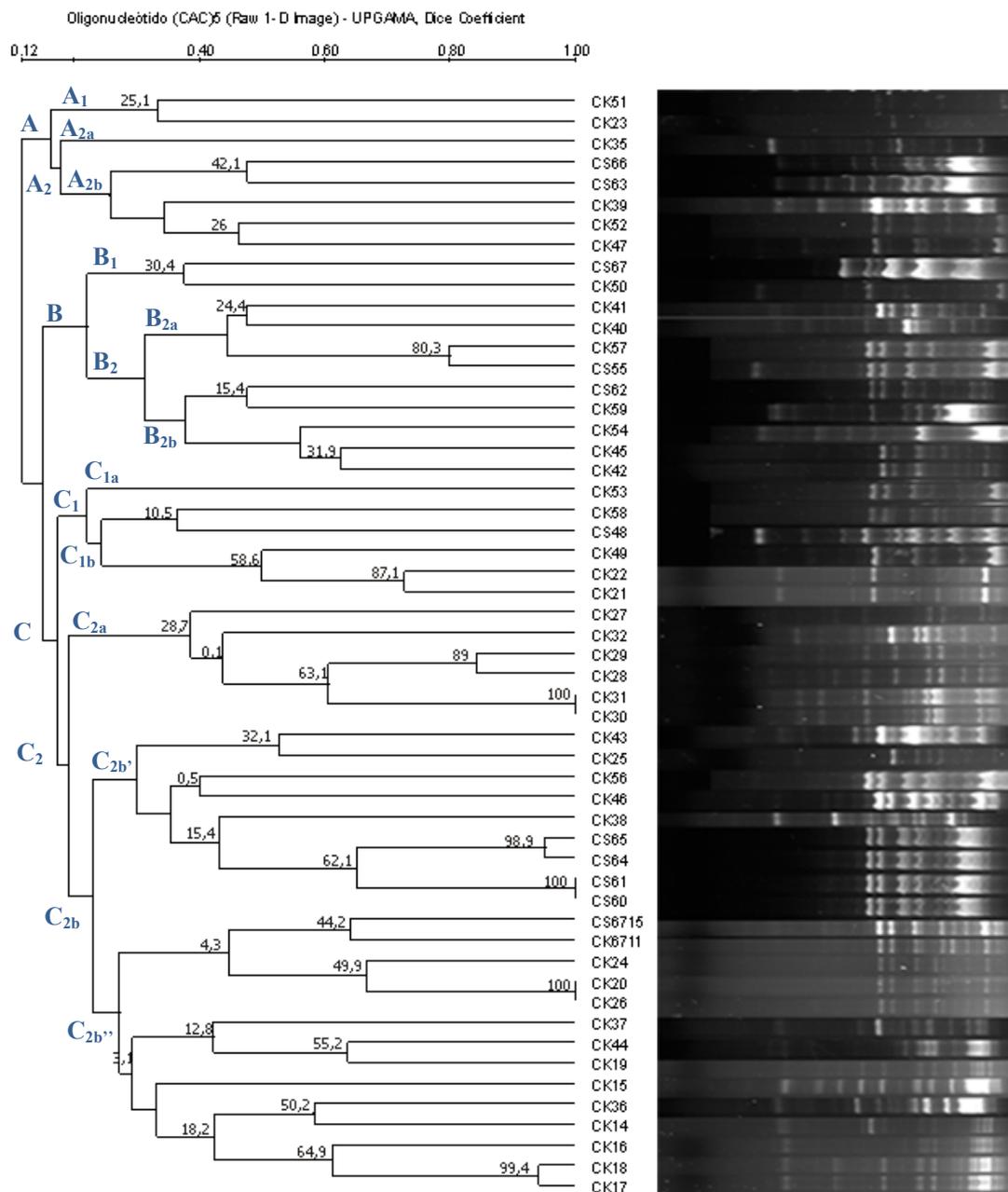
taje de similitud mayor que los anteriores (55 a 62%), se aislaron de diferentes regiones (R3, R6 y R4, respectivamente) y campañas (2007-2008 y 2008-2009).

El “**cluster**” C incluyó aislamientos de las campañas 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008 y 2008-2009 y se dividió en 2 grupos, C₁ y C₂.

El grupo C₁ comprendió 2 subgrupos C_{1a} y C_{1b}. C_{1a} estaba formado por un solo aislamiento, CK53, aislado de la región R3 y del cultivar A 4910. C_{1b} estaba formado por 5 aislamientos (CK58, CS48, CK49, CK22 y CK21), CK58 y CS48 tenían un porcentaje de similitud menor al 40% y habían sido aislados de la misma región (R2), pero eran especies diferentes. CK49, presentó un porcentaje de similitud próxima al 50% respecto a los otros dos hongos, CK22 y CK21. Estas dos últimas cepas presentaron un porcentaje de similitud del 75% (nivel de significación 87,1%). Los 3 aislamientos provenían del mismo origen geográfico, pero solo CK22 y CK21 compartieron el mismo cultivar y fueron aislados durante la campaña 2005-2006, a diferencia del resto de los hongos pertenecientes a este grupo que fueron aislados durante la campaña 2008-2009.

El grupo C₂ comprendió 2 subgrupos C_{2a} y C_{2b}. C_{2a} estaba formado por 6 aislamientos (CK27, CK32, CK29, CK28, CK31 y CK30), de los cuales CK27 era el único que pertenecía a una región (R2) y cultivar (A 8000) diferentes del resto de los hongos que fueron aislados de la región R5 y del cultivar A 7636. CK27 presentó un 40% de similitud con un nivel de significación bajo (28,7%), con los demás aislamientos. CK29 y CK28 presentaron un 85% de similitud entre ellos, con un “bootstrap” significativo de 89%. CK31 y CK30 tenían el mismo patrón de bandas (100% de similitud) con un nivel de significación del 100%. Por último, CK32 presentó una baja similitud con los otros integrantes de su grupo. Todos los hongos de este subgrupo pertenecieron a la campaña 2005-2006. C_{2b} incluyó 23 aislamientos, los cuales formaron a su vez dos grupos bien marcados C_{2b'} y C_{2b''}. El primero comprendió 9 hongos: CK43, CK25, CK56, CK46, CK38, CS65, CS64, CS61 y CS60; estando representadas cada una de las regiones RiiA y todas las campañas implicadas en este estudio; sólo presentaron un alto porcentaje de similitud (> 90%) las especies de *C. sojina*, CS65 y CS64 (nivel de significación 98,9%) y CS61 y CS60 con el mismo patrón de bandas (nivel de significación 100%), observándose un porcentaje de similitud mayor al 60% entre los dos pares. C_{2b''} incluyó la mayor cantidad de aislamientos, 14, entre los que se encontraban las cepas patrones con un porcentaje de similitud mayor al 60% (nivel de significación 44,2%) entre ellas. CK20 y CK26 presentaron el mismo patrón de bandas con un nivel de significación del 100%, a pesar de provenir de diferentes regiones (R1 y R4, respectivamente) y cultivares (TJ 2070 y A 5409, respectivamente). En cambio, CK17 y CK18 que tenían un porcentaje de similitud mayor al 90% (nivel de significación 99,4%) fueron aislados de la misma región (R4) y cultivar (A 5409), lo mismo que CK16 con el que se encontraron muy cercanos genéticamente (nivel de significación 64,9%). En este grupo (C_{2b''}) estaban representadas las regiones RiiA R1 (CK24, CK20 y CK37), R4 (CK26, CK44, CK19, CK15, CK14, CK16, CK18 y CK17) y R5 (CK36) y las campañas 2005-2006, 2006-2007 y 2007-2008.

**Fi-
gu-
ra
IV.
3.** Gel
de
los
pa-
tro-
nes
de
ban-
das
de
ISS-
R
(oli-
go-
nu-
cle-
óti-
do
(C
AC
)₅)
y
den-
dro-
gra-
ma
pro-
du-
ci-
dos
por



aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina* y cepas patrones NBRC CK51, CK23, CK35, CS66, CS63, CK39, CK52, CK47, CS67, CK50, CK41, CK40, CK57, CS55, CS62, CK59, CK54, CK45, CK42, CK53, CK58, CS48, CK49, CK22, CK21, CK27, CK32, CK29, CK28, CK31, CK30, CK43, CK25, CK56, CK46, CK38, CS65, CS64, CS61, CS60, CK24, CK20, CK26, CK37, CK44, CK19, CK15, CK36, CK14, CK16, CK18, CK17: Aislamientos regionales; CS6715: *Cercospora sojina* NBRC 6715; CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. En los nodos se muestran los porcentajes de los valores “bootstrap” basados sobre 1000 réplicas.

Con el oligonucleótido (GTG)₅ se generó un dendrograma, en el que se establecieron 3 grandes “clusters”, A, B y C, que se separaron a una distancia genética de 0,85 aproximadamente (Figura IV.4).

El “**cluster**” A estaba formado por un solo hongo, CK44, aislado durante la campaña 2007-2008, de la región R4, con un porcentaje de similitud del 12% respecto al resto de los aislamientos.

El “**cluster**” B incluyó aislamientos de las 4 campañas en que se llevó a cabo el estudio (2005-2006, 2006-2007, 2007-2008 y 2008-2009) y se dividió en 3 grupos, B₁, B₂ y B₃.

El grupo B₁ se dividió en dos subgrupos B_{1a} y B_{1b}. B_{1a} estaba formado por dos aislamientos (CK47 y CK54) con un porcentaje de similitud menor al 40% (nivel de significación 14,6%), provenientes de diferentes regiones (R5 y R3, respectivamente) y cultivares (A 6411 y A 6401, respectivamente); B_{1b} estaba formado por dos aislamientos que pertenecían a distintas especies (CK56 y CS55), con un porcentaje de similitud del 40% (nivel de significación 23,2%), provenientes de orígenes geográficos diferentes (regiones R5 y R4, respectivamente) y distintos cultivares (A 6411 y MAN 4355, respectivamente). Todos los aislamientos de este grupo pertenecieron a la campaña 2008-2009.

El grupo B₂ se dividió en dos subgrupos, B_{2a} y B_{2b}. B_{2a} estaba formado por 3 aislamientos CK43, CK39 y CK25 provenientes de distintas regiones (R4, R6 y R2, respectivamente) y diferentes cultivares (A 7118, A 6401 y A 8000, respectivamente); los dos últimos presentaron el mismo perfil de bandas (nivel de significación 100%) a pesar de corresponder a campañas diferentes (2006-2007 y 2005-2006, respectivamente) y tenían un porcentaje de similitud menor al 50% (nivel de significación 46,3%) con el primero. B_{2b} incluyó 5 aislamientos (CS66, CK38, CK35, CK22 y CK21), CK38 y CK35 presentaron el mismo perfil de bandas (100% de similitud) con un nivel de significación de 99,5%, a pesar de que provinieron de diferentes regiones RiiA (R1 y R3) y cultivares (AS-GROW.8000 y RA 514) pero fueron aislados durante la misma campaña (2006-2007); CK22 y CK21 también presentaron el mismo perfil de bandas (nivel de significación del 100%), compartieron el mismo origen geográfico (región RiiA R1) y cultivar (TJ 2070) y fueron aislados durante la campaña 2005-2006. El porcentaje de similitud según el Coeficiente de Dice, entre estos 4 aislamientos, fue mayor al 50% (nivel de significación 50,2%) y entre ellos y CS66, del 40% aproximadamente (nivel de significación 18,2%), quizás por ser especies diferentes.

El grupo B₃ incluyó 11 aislamientos. Se separaron en dos subgrupos B_{3a} y B_{3b}. El primero estaba formado por 3 aislamientos (CS64, CK49 y CK31) con un porcentaje de similitud menor al 40% entre ellos, se obtuvieron de diferentes regiones RiiA y cultivares. CK49 fue aislado durante la misma campaña que CS64, sin embargo se encontró más distanciado genéticamente que con CK31 con el que no la compartía, posiblemente por tratarse de diferentes especies. El segundo subgrupo (B_{3b}) estaba formado por 8 aislamientos (CK32, CK41, CK40, CK26, CS63, CS60, CS65 y CS62), de los cuales 4 eran *C. soja* con porcentajes de similitud comprendidos entre el 50 y aproximadamente el 75%, entre sí. Por su parte, CK26 se encontró más relacionado genéticamente a las cepas de *C. soja* que a las cepas de *C. kikuchii* con las que compartía este subgrupo. CK31 y CK32 provinieron de la misma región RiiA (R5) y del mismo cultivar (A 7636) y fueron aislados durante la misma campaña (2005-2006), a pesar de esto se encontraron separados por una distancia genética de 0,8 por lo que se incluyeron en subgrupos diferentes. Los aislamientos CK41 y CK40 presenta-

ron un porcentaje de similitud menor al 50%, si bien fueron aislados durante la misma campaña, provinieron de diferentes regiones geográficas (R6 y R1, respectivamente) y cultivares (A 6401 y ASGROW.8000).

El “**cluster**” C estaba conformado por 30 hongos. Incluyó 2 grupos: C₁ y C₂.

El grupo C₁ estaba formado por 2 aislamientos CK51 y CK45, con un porcentaje de similitud del 50% (nivel de significación 45,2%), provenientes no sólo de dos regiones geográficas diferentes (R2 y R6) sino también de distintas campañas (2008-2009, 2007-2008).

El grupo C₂ se separó en 2 subgrupos C_{2a} y C_{2b}. C_{2a} a su vez se separó en C_{2a'}, constituido por un solo aislamiento CS48 y C_{2a''} formado por 6 aislamientos regionales y las dos cepas de colección. Dentro de C_{2a'}, CS61, CK52, CS6715, CK6711, CK53, CK58 y CK57 se encontraron cercanos con porcentajes de similitud comprendidos entre 50 y 100%. Todos los aislamientos regionales fueron aislados durante la misma campaña (2008-2009) pero solo CK52 y CK57 compartieron además, el mismo origen geográfico (R3) y cultivar (A 4910); a pesar de lo cual presentaron un porcentaje de similitud (50%) menor al encontrado entre CK57 y CK53 (porcentaje de similitud mayor al 70%) que solo compartieron el mismo origen geográfico. A su vez CK58 y CK57 tenían el mismo perfil de bandas con un nivel de significación del 93,2%, aunque provinieron de diferentes regiones y cultivares. Las cepas de colección presentaron, entre sí, un porcentaje de similitud mayor al 70% aunque su valor de “bootstrap” no fue significativo. Dentro de C_{2a''} se encontró también el aislamiento CK50, separado del resto por una distancia genética de 0,7 aproximadamente (30% de similitud).

C_{2b} se separó en C_{2b'} y C_{2b''}. C_{2b'} estaba formado por 3 aislamientos (CK46, CK23 y CK42) provenientes de diferentes regiones y cultivares, CK23 y CK42 se encontraron más cercanos (porcentaje de similitud de casi 60%) entre sí que con CK46 (40%). C_{2b''} fue el subgrupo más grande, constituido por 16 hongos. En él se encontraron la mayoría de los aislamientos de Emilia (región RiiA R4) CK14, CK16, CK19, CK15, CK18 y CK17, obtenidos durante la campaña 2005-2006. El porcentaje de similitud entre ellos varió entre 45 y 85%, con excepción de CK14 cuyo porcentaje de similitud fue del 30% con respecto a sus pares con los que compartió origen y cultivar y del 100% con CK27, con el que no compartió ni origen ni cultivar. Otros 3 hongos provenientes de Esperanza (región RiiA R5), CK30, CK28 y CK29, aislados durante la misma campaña, presentaron porcentajes de similitud entre ellos, comprendidos entre 70 y 77% aproximadamente y 2 de Margarita (región RiiA R1) CK24 y CK20 que, a pesar de que tenían el mismo origen y provenían del mismo cultivar, presentaron un porcentaje de similitud del 50% aproximadamente. CK36 y CK37 fueron los únicos representantes de la campaña 2006-2007, pero provenían de distintas regiones (R5 y R1, respectivamente) y cultivares (RA626 y ASGROW.8000, respectivamente) y presentaron un porcentaje de similitud menor al 50% entre sí. A su vez CK37 presentó un porcentaje de similitud menor al 50% con los aislamientos que compartieron la rama (CK15, CK18, CK17, CK30, CK28 y CK29). CS67 y CK59 fueron aislados durante la campaña 2008-2009, provinieron de la misma región (R5) y cultivar (A 6401), no obstante por ser especies diferentes se encontraron alejados genéticamente (porcentaje de similitud del 30%).

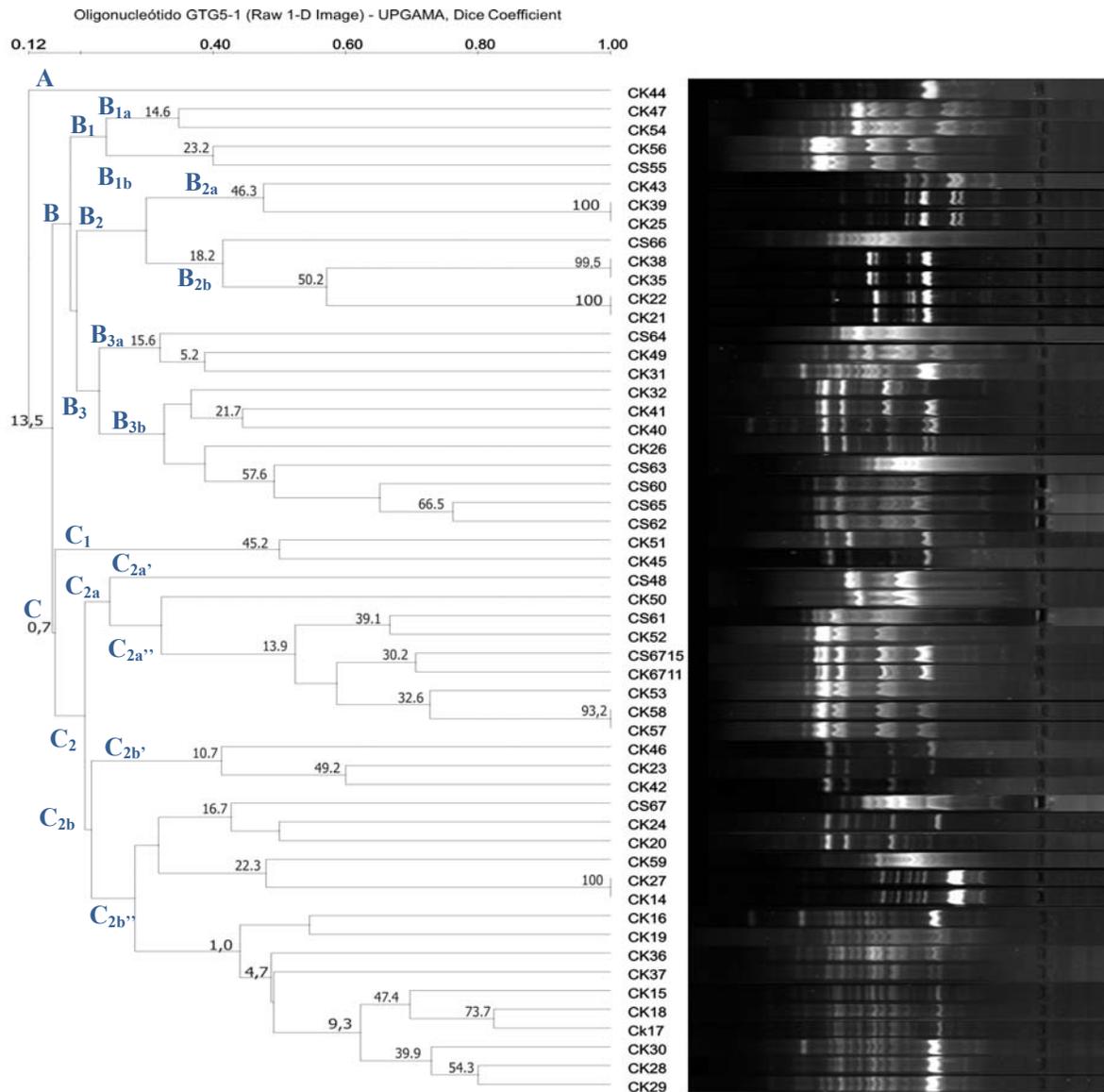


Figura IV.4. Gel de los patrones de bandas de ISSR (oligonucleótido (GTG)₅) y dendrograma producidos por aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii* y *Cercospora soja* y cepas patrones NBRC

CK44, CK47, CK54, CK56, CS55, CK43, CK39, CK25, CS66, CK38, CK35, CK22, CK21, CS64, CK49, CK31, CK32, CK41, CK40, CK26, CS63, CS60, CS65, CS62, CK51, CK45, CS48, CK50, CS61, CK52, CK53, CK58, CK57, CK46, CK23, CK42, CS67, CK24, CK20, CK59, CK27, CK14, CK16, CK19, CK36, CK37, CK15, CK18, CK17, CK30, CK28, CK29: Aislamientos regionales; CS6715: *Cercospora soja* NBRC 6715; CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. En los nodos se muestran los porcentajes de los valores “bootstrap” basados sobre 1000 réplicas.

Con el oligonucleótido (GACA)₄ se generó un dendrograma, en el cual se pudieron establecer 3 grandes “cluster”, A, B y C, que se separaron a una distancia genética de 0,90 aproximadamente (Figura IV.5).

El “**cluster**” A incluyó aislamientos de las campañas 2005-2006, 2006-2007 y 2008-2009 y se dividió en 2 grupos: A₁ y A₂.

El grupo A₁ estaba constituido por un aislamiento (CK23) obtenido durante la campaña 2005-2006 en la localidad de San Justo (región RiiA R3).

El grupo A₂ incluyó 2 aislamientos (CK51 y CK40), obtenidos de diferentes regiones (R2 y R1, respectivamente) y campañas (2008-2009 y 2006-2007, respectivamente), con un porcentaje de similitud menor al 40%.

El “**cluster B**” incluyó aislamientos de las campañas 2005-2006 y 2008-2009 y se dividió en dos grupos: B₁ y B₂.

El grupo B₁ estaba formado por 3 aislamientos (CS67, CK28 y CK27); CS67 a pesar de haber sido aislado de la misma región (R5) que CK28 presentó un porcentaje de similitud menor al 40 % respecto de este, posiblemente por tratarse de especies diferentes, y haber sido aislados durante campañas distintas; mientras que CK28 y CK27, se encontraron próximos entre sí con un porcentaje de similitud mayor al 70% (nivel de significación de 94,4%) a pesar de haber sido aislados de diferentes regiones (R5 y R2, respectivamente) y distintos cultivares (A 7636 y A 8000, respectivamente), pero durante la misma campaña (2005-2006).

El grupo B₂ estaba formado por las dos cepas de referencia y 5 aislamientos regionales, de los cuales CK26, CK24 y CK20 se agruparon con un porcentaje de similitud entre 75 y 85%, compartiendo los dos últimos, el mismo origen geográfico (R1) y cultivar (TJ 2070). Los dos aislamientos restantes, CK58 y CK32, se agruparon con las cepas de referencia incluidas en el análisis. De estos dos aislamientos, CK32 fue el que presentó mayor porcentaje de similitud con las mismas, encontrándose más relacionada genéticamente con la misma especie, CK6711 (nivel de significación de 95,8%), que con CS6715.

El “**cluster**” C incluyó aislamientos de las 4 campañas (2005-2006, 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009) y agrupó la mayor cantidad de hongos. Se dividió en dos grupos C₁ y C₂.

El grupo C₁ incluyó 5 aislamientos (CS66, CK59, CK54, CS63 y CK37), de los cuales dos pertenecieron a la especie *C. sojina* (CS66 y CS63), con porcentajes de similitud menor al 30%, a pesar de haber sido aislados de la misma región (R3) y durante la campaña 2008-2009 pero de diferentes cultivares (A 6411 y A 4910, respectivamente). CK59 y CK54 se agruparon con un porcentaje de similitud menor al 50%, si bien habían sido aisladas de regiones diferentes (R5 y R3, respectivamente), provinieron del mismo cultivar (A 6401). CK37 presentó un porcentaje de similitud con CS63 del 50%, a pesar de que se trataba de especies diferentes, aislados de diferentes regiones (R1 y R3, respectivamente) y cultivares (ASGROW.8000 y A 4910, respectivamente) y durante distintas campañas (2006-2007 y 2008-2009, respectivamente).

El grupo C_2 se separó en 2 subgrupos, C_{2a} y C_{2b} . C_{2a} estaba formado por 6 aislamientos (CS65, CK46, CK36, CK25, CK19 y CK18); si bien CK18 y CK19 compartieron el mismo origen geográfico (R4) y cultivar (A 5409) y fueron aislados del mismo lote durante la campaña 2005-2006, el porcentaje de similitud fue menor al 50% y el nivel de significación bajo, para considerarlo significativo. El resto de los aislamientos provinieron de diferentes orígenes geográficos y el porcentaje de similitud de los mismos fue menor al 50%. En este subgrupo estuvieron representadas todas las campañas estudiadas. C_{2b} se dividió en $C_{2b'}$ y $C_{2b''}$. $C_{2b'}$ contenía 6 aislamientos regionales (CK47, CK57, CS55, CK56, CK53 y CK52), encontrándose muy cercanos CK57 y CS55 con un nivel de significación de 58,3% a pesar de que se trató de especies diferentes; por otro lado se encontraron agrupados CK53 y CK52, con un nivel de significación de 68,9%, provenientes de la misma región (R3) y cultivar (A 4910). Todos estos hongos fueron aislados durante la campaña 2008-2009. $C_{2b''}$ contuvo 24 aislamientos, siendo el subgrupo más numeroso, separado en dos ramas bien marcadas, la primera agrupó 5 de los 10 aislamientos de *C. soja*, encontrándose cercanos, con un nivel de significación del 85%, los aislamientos CS62, CS61 y CS60 los cuales pertenecían a la misma región (R5) pero a cultivares diferentes (A 6410, NA 6126 RG y RA 633, respectivamente). En la segunda rama se pudieron observar algunas agrupaciones de interés, CK31 y CK30, aislados de Esperanza con un 98% de similitud (nivel de significación 100%); CK22 y CK21, aislados de Margarita con un porcentaje de similitud de 90% (nivel de significación 100%) y CK15, CK14, CK17 y CK16, aislados de Emilia con porcentajes de similitud comprendidos entre el 70 y el 55% (nivel de significación entre 75,2 y 40,9% respectivamente). Los hongos incluidos en esta rama correspondieron a aislamientos efectuados a partir de la soja recolectada durante la campaña 2005-2006.

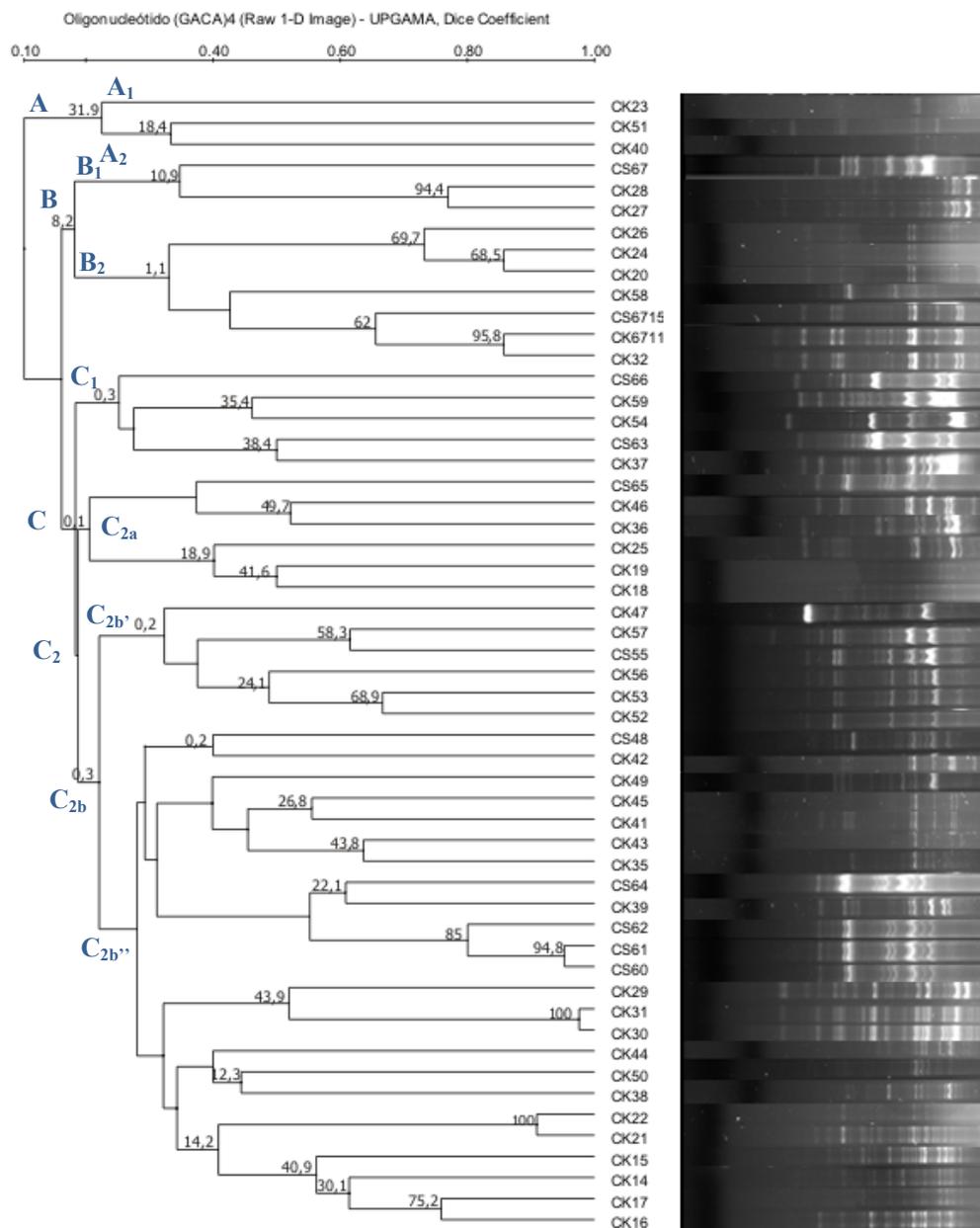


Figura IV.5. Gel de los patrones de bandas de ISSR (oligonucleótido (GACA)₄) y el dendrograma producidos por aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina* y cepas patrones NBRC CK23, CK51, CK40, CS67, CK28, CK27, CK26, CK24, CK20, CK58, CK32, CS66, CK59, CK54, CS63, CK37, CS65, CK46, CK36, CK25, CK19, CK18, CK47, CK57, CS55, CK56, CK53, CK52, CS48, CK42, CK49, CK45, CK41, CK43, CK35, CS64, CK39, CS62, CS61, CS60, CK29, CK31, CK30, CK44, CK50, CK38, CK22, CK21, CK15, CK14, CK17, CK16: Aislamientos regionales; CS6715: *Cercospora sojina* NBRC 6715; CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. En los nodos se muestran los porcentajes de los valores “bootstrap” basados sobre 1000 réplicas

Como se observa en la Figura IV.6, que se coloca como ejemplo, en todas las corridas electroforéticas, la inclusión de *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. fue útil para determinar que la técnica permitió diferenciar géneros fúngicos.

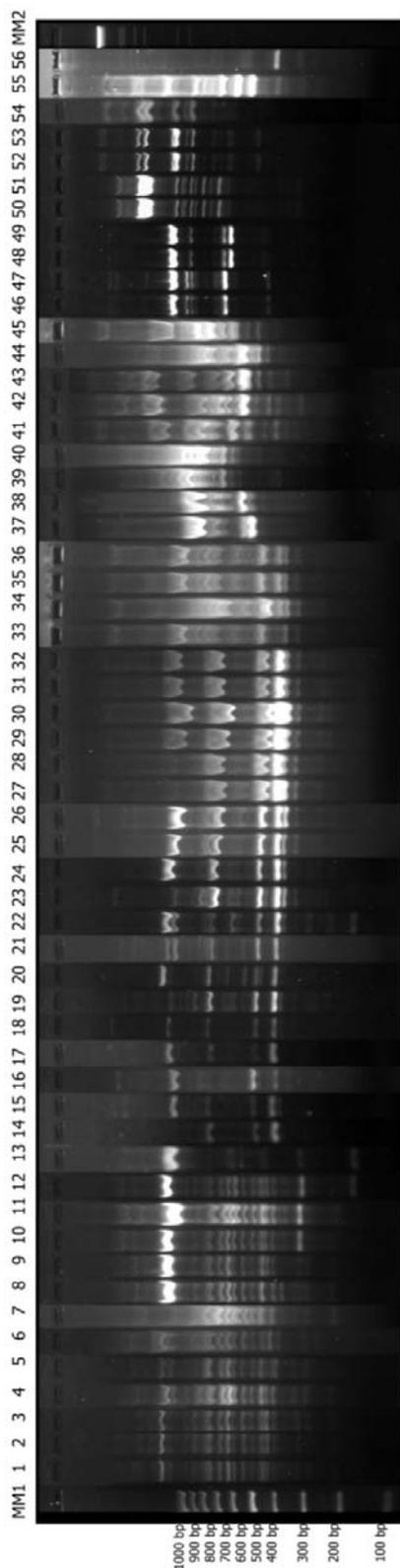


Figura IV. 6. Corrida electroforética de ISSR con el oligonucleótido (GTG)₅

MM1:100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); MM2: Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Promega). Calles 1 a 24 aislamientos regionales: CK15, CK17, CK18, CK36, CK37, CK19, CS66, CK29, CK28, CK30, CK31, CK16, CK44, CK42, CK45, CK51, CK46, CK23, CK20, CK24, CK26, CK40, CK32, CK41; calles: 27 a 54 aislamientos regionales: CK52, CK53, CS55, CK56, CK57, CK58, CS60, CS61, CS62, CS65, CS48, CK50, CK59, CS63, CK49, CK54, CK47, CS64, CS67, CK21, CK22, CK35, CK38, CK14, CK27, CK25, CK39, CK43. Calle 25: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (CK6711); calle 26: *Cercospora sojina* NBRC 6715 (CS6715). Calle 55: *Cladosporium* sp.; calle 56: *Penicillium* sp.

4.1.2. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LOS AISLAMIENTOS RELACIONADOS GENÉTICAMENTE

Los grupos formados a partir del análisis del dendrograma generado con el oligonucleótido (GTG)₅, fueron identificados con un color y ubicados en las diferentes regiones RiiA, de la provincia de Santa Fe, a fin de visualizar la distribución de los aislamientos relacionados genéticamente de *C. kikuchii* y *C. sojina* (Figura IV.7).

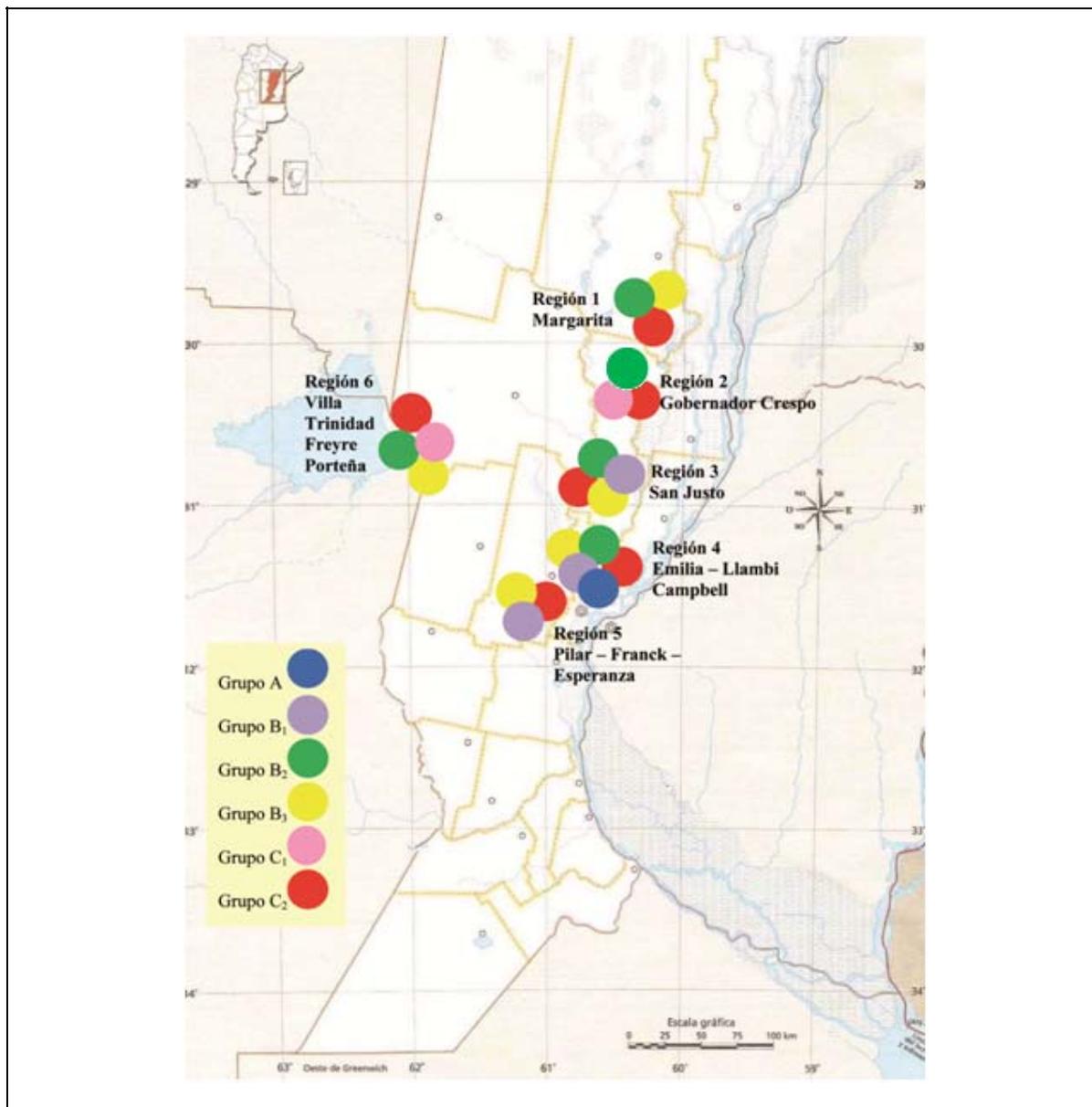


Figura IV.7. Distribución de los aislamientos de las especies de *Cercospora* relacionadas genéticamente, en las regiones RiiA de la provincia de Santa Fe, Argentina, según los resultados obtenidos al amplificar regiones ISSR con el oligonucleótido (GTG)₅

De la observación del mapa y de las campañas en que se aislaron los hongos, se realizó el análisis que se resume en la Tabla IV.4:

Tabla IV.4. Grupos formados a partir del dendrograma generado con (GTG)₅: aislamientos que los conforman, localización y campaña en la que se obtuvieron

Grupos Formados con (GTG) ₅	Identificación por color	Aislamientos relacionados genéticamente	Regiones	Campañas
Grupo A		CK44	R4	2007-2008
Grupo B ₁		B _{1a} :CK47 y CK54 B _{1b} :CK56 y CS55	R3, R4 y R5	2008-2009
Grupo B ₂		B _{2a} :CK43, CK39 y CK25 B _{2b} :CS66, CK38, CK35, CK22 y CK21	R1, R2, R3, R4 y R6	2005-2006
				2006-2007
				2007-2008
				2008-2009
Grupo B ₃		B _{3a} :CS64, CK49 y CK31 B _{3b} :CK32, CK41, CK40, CK26, CS63, CS60, CS65 y CS62	R1, R3, R4, R5 y R6	2005-2006
				2006-2007
				2008-2009
Grupo C ₁		CK51 y CK45	R2 y R6	2007-2008
				2008-2009
Grupo C ₂		C _{2a} : CS48, CK50, CS61, CK52, CK53, CK58 y CK57 C _{2b} :CK46, CK23, CK42, CS67, CK24, CK20, CK59, CK27, CK14, CK16, CK19, CK36, CK37, CK15, CK18, CK17, CK30, CK28 y CK29	R1, R2, R3, R4, R5 y R6	2005-2006
				2006-2007
				2007-2008
				2008-2009

CK: corresponde a *Cercospora kikuchii*, CS: corresponde a *Cercospora sojina*.

B_{1a}, B_{1b}, B_{2a}, B_{2b}, B_{3a}, B_{3b}, C_{2a}, C_{2b}: subgrupos

A manera de síntesis:

- Grupo A: Solo apareció en la región R4, durante la campaña 2007-2008.
- Grupo B₁: Se localizó en las regiones R3, R4 y R5, durante la campaña 2008-2009.
- Grupo B₂: Se encontró en las regiones R1, R2, R3, R4 y R6, en todas las campañas.
- Grupo B₃: No apareció en la región R2 ni se encontró durante la campaña 2007-2008.
- Grupo C₁: Se encontró en la región R6 durante la campaña 2007-2008 y en la región R2 durante la campaña 2008-2009.
- Grupo C₂: es el único que aparece en todas las regiones RiiA y durante todas las campañas estudiadas.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE RAPD-PCR

Efectuado el análisis realizado a los perfiles de bandas obtenidos para los primeros aislamientos regionales (CK14 al CK32), campaña 2005-2006, y las 2 cepas patrones NBRC (CK6711 y CS6715), con 20 oligonucleótidos, se obtuvieron un total de 926 bandas, resultando polimórficas el 100% (Tabla IV.5). El tamaño de las mismas varió entre 2750 y 107 bp; OPA-01 fue el oligonucleótido que produjo la menor cantidad de bandas (1) (Figura IV.8) mientras que OPA-12 produjo la mayor cantidad de fragmentos amplificados (23) (Figura IV.9). Las amplificaciones con OPA-02 y OPA-06 no fueron satisfactorias.

Tabla IV.5. Cantidad de bandas totales y polimórficas y tamaño de las mismas, obtenidas con los oligonucleótidos utilizados para RAPD

Oligonucleótidos	Nº máx. de bandas	Nº mín. de bandas	Nº total de bandas	Cantidad de bandas polimórficas	Tamaño de las bandas (bp)*
OPA-01	19	1	49	49	1846-168
OPA-02			Amplificaciones no satisfactorias		
OPA-03	17	9	49	49	1437-202
OPA-04	16	6	46	46	1451-156
OPA-05	19	7	48	48	1485-107
OPA-06			Amplificaciones no satisfactorias		
OPA-07	14	5	49	49	1599-197
OPA-08	16	3	58	58	2009-253
OPA-09	14	7	53	53	1561-134
OPA-10	18	4	56	56	1797-114
OPA-11	13	5	45	45	1422-212
OPA-12	23	7	55	55	1883-200
OPA-13	17	8	51	51	1495-156
OPA-14	15	6	44	44	1999-309
OPA-15	16	7	53	53	2730-241
OPA-16	18	8	50	50	2252-215
OPA-17	16	4	60	60	2673-213
OPA-18	18	9	51	51	1655-229
OPA-19	18	9	58	58	2750-208
OPA-20	16	7	51	51	1572-242
Total			926	926	

*bp: pares de base

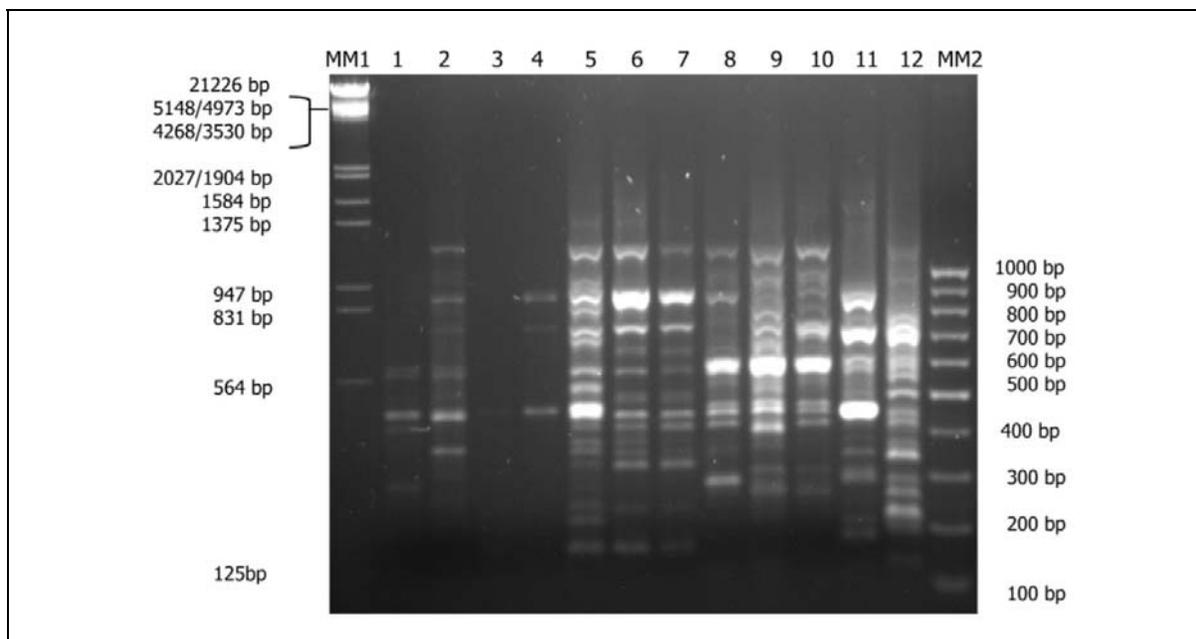


Figura IV.8. Perfil electroforético de RAPD producido por algunos aislamientos de *Cercospora kikuchii*, cepas NBRC y otros géneros usando OPA-01

MM1: marcador molecular Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (Promega); MM2:100-bp DNA Ladder (In-bioHighway, Argentina). Aislamientos regionales:1- CK23, 2- CK25, 3- CK27, 4- CK28, 5- CK29, 6-CK30, 7-CK31, 8-CK32; 9- *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (CK6711); 10-*Cercospora sojina* NBRC 6715 (CS6715); 11- *Cladosporium* sp.; 12- *Penicillium* sp.

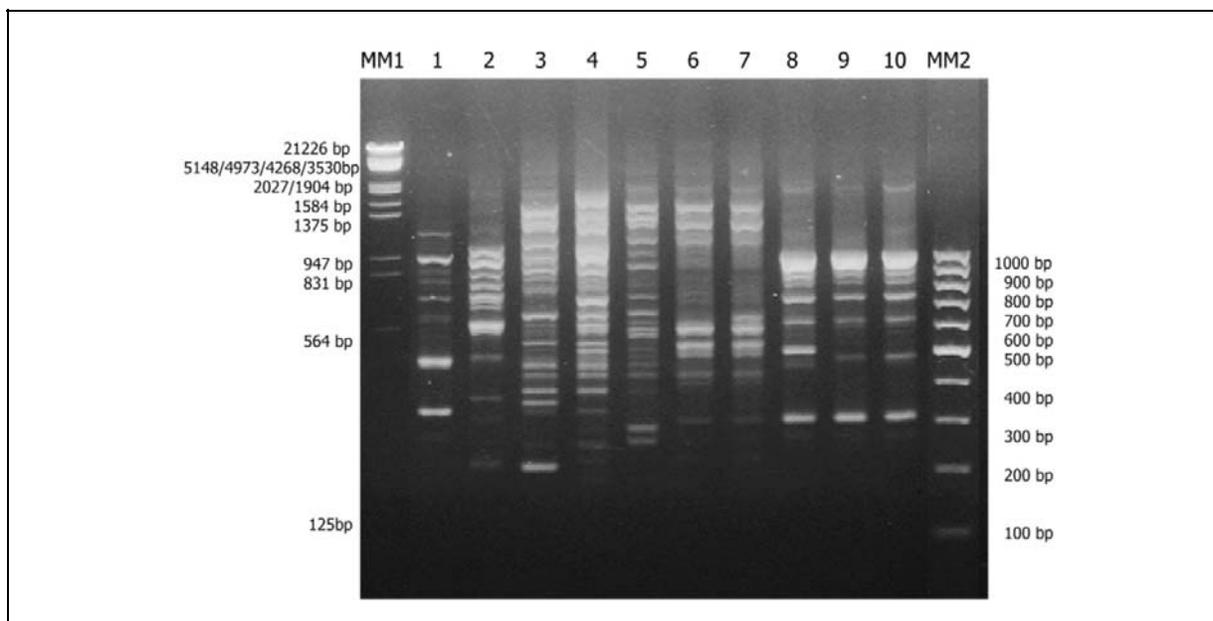


Figura IV.9. Perfil electroforético de RAPD producido por aislamientos de *Cercospora kikuchii* y cepas NBRC usando OPA-12

MM1: marcador molecular Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (Promega); MM2:100-bp DNA Ladder (In-bioHighway, Argentina). Aislamientos regionales: 1- CK23, 2- CK25, 3- CK27, 4- CK28, 5- CK29, 6-CK30, 7-CK31, 8-CK32; 9- *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (CK6711); 10- *Cercospora sojina* NBRC 6715 (CS6715).

La matriz de distancia promedio, obtenida al aplicar el Coeficiente de Jaccard, con los 21 hongos estudiados inicialmente, se observa en la Figura IV.10:

	CK14	CK15	CK16	CK17	CK18	CK19	CK26	CK20	CK21	CK22	CK24	CK6711	CS6715	CK23	CK25	CK27	CK28	CK29	CK30	CK31	CK32
CK14	0,000																				
CK15	0,710	0,000																			
CK16	0,825	0,751	0,000																		
CK17	0,810	0,744	0,779	0,000																	
CK18	0,852	0,813	0,851	0,722	0,000																
CK19	0,840	0,829	0,833	0,811	0,745	0,000															
CK26	0,866	0,892	0,875	0,884	0,888	0,838	0,000														
CK20	0,829	0,886	0,875	0,894	0,893	0,868	0,753	0,000													
CK21	0,867	0,864	0,824	0,876	0,876	0,868	0,891	0,889	0,000												
CK22	0,854	0,847	0,831	0,867	0,867	0,881	0,904	0,893	0,227	0,000											
CK24	0,877	0,904	0,893	0,893	0,879	0,893	0,857	0,735	0,897	0,875	0,000										
CK6711	0,876	0,872	0,863	0,844	0,868	0,841	0,848	0,886	0,878	0,877	0,883	0,000									
CS6715	0,835	0,842	0,848	0,859	0,862	0,855	0,823	0,811	0,858	0,857	0,819	0,531	0,000								
CK23	0,903	0,898	0,883	0,904	0,894	0,878	0,856	0,867	0,896	0,884	0,868	0,857	0,821	0,000							
CK25	0,867	0,845	0,874	0,886	0,875	0,853	0,891	0,883	0,907	0,911	0,863	0,840	0,831	0,845	0,000						
CK27	0,862	0,844	0,869	0,842	0,844	0,848	0,877	0,887	0,880	0,879	0,891	0,865	0,869	0,862	0,825	0,000					
CK28	0,836	0,872	0,842	0,832	0,827	0,828	0,874	0,905	0,866	0,858	0,866	0,849	0,852	0,861	0,802	0,639	0,000				
CK29	0,862	0,848	0,856	0,862	0,856	0,872	0,874	0,895	0,857	0,844	0,860	0,844	0,846	0,879	0,863	0,754	0,786	0,000			
CK30	0,854	0,839	0,826	0,872	0,841	0,853	0,879	0,855	0,872	0,854	0,895	0,842	0,844	0,854	0,850	0,791	0,801	0,766	0,000		
CK31	0,862	0,860	0,833	0,879	0,848	0,842	0,862	0,851	0,881	0,863	0,872	0,831	0,828	0,850	0,858	0,800	0,797	0,796	0,226	0,000	
CK32	0,900	0,847	0,890	0,882	0,885	0,884	0,836	0,866	0,863	0,846	0,903	0,736	0,738	0,805	0,881	0,852	0,840	0,824	0,858	0,849	0,000

Figura IV.10. Matriz de distancia promedio obtenida al aplicar el Coeficiente de Jackard CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK26, CK20, CK21, CK22, CK24, CK23, CK25, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK32: aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*; CS6715: *Cercospora sojina* NBRC 6715; CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711.

En la Figura IV.11 se presenta el diagrama obtenido al efectuar el análisis de correspondencia. De su observación surge que los oligonucleótidos OPA01, OPA03, OPA05 y OPA10 presentaron características distintas y se situaron distantes uno de otro, en cuadrantes diferentes, lo que permitió seleccionarlos para su aplicación a los 52 aislamientos fúngicos regionales y a las 2 cepas patrones.

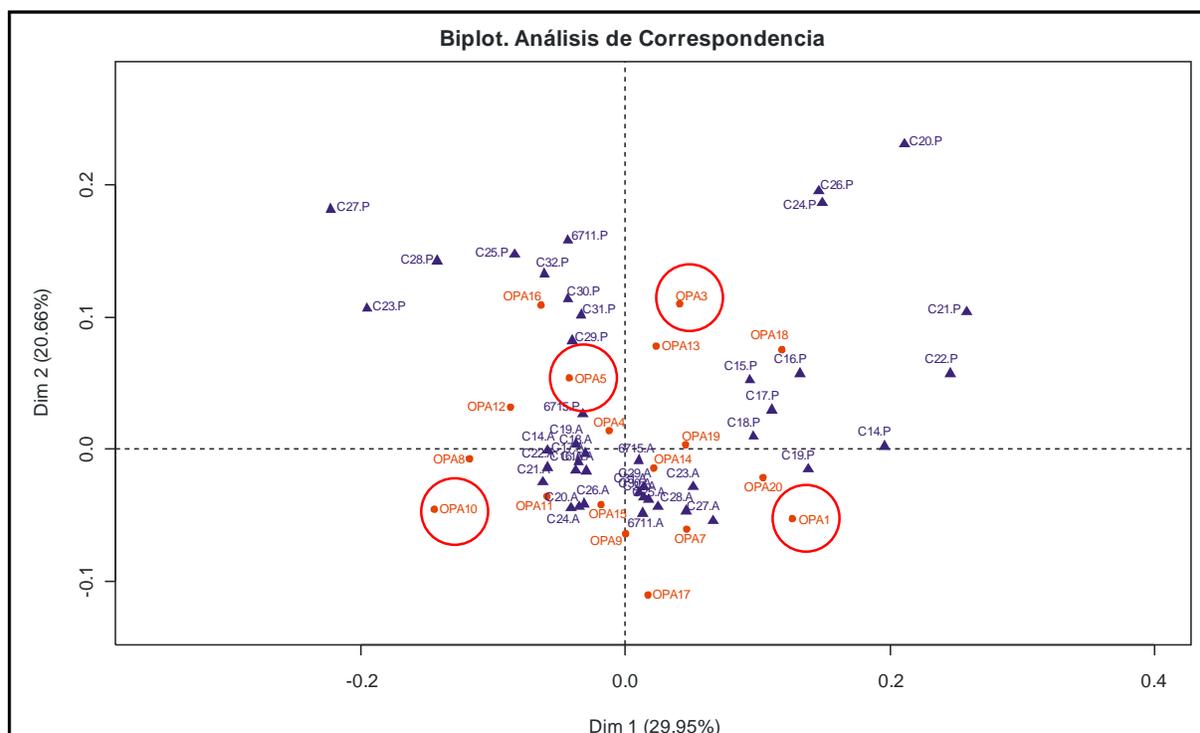


Figura IV.11. Diagrama obtenido al efectuar el análisis de correspondencia de la reacción RAPD con 18 oligonucleótidos para 19 aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii* y cepas patrones NBRC

C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C32: aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*⁴. 6711⁴: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711; 6715⁵: *Cercospora soja* NBRC 6715. OPA1, OPA3, OPA4, OPA5, OPA7, OPA8, OPA9, OPA10, OPA11, OPA12, OPA13, OPA14, OPA15, OPA16, OPA17, OPA18, OPA19, OPA20: Oligonucleótidos⁶.

Efectuados los RAPD para todos los hongos (54), con los 4 oligonucleótidos seleccionados, se obtuvieron un total de 326 bandas, de las cuales el 100% fueron polimórficas (Figuras IV.12 y Figura IV.13). Los tamaños de las bandas variaron entre 3457 y 114 bp y se produjo un promedio de 81,5 bandas /oligonucleótido (Tabla IV.6).

⁴ Aislamientos regionales correspondientes a *C. kikuchii*. En la figura no se pudo insertar la sigla CK.

⁵ En la figura no se pudo insertar la sigla CS.

⁶ Oligonucleótidos correspondientes a la serie OPA (FAGOS/Ruralex, Argentina). En la figura no se pudo insertar la denominación OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19 y OPA-20.

Tabla IV.6. Cantidad de bandas totales y polimórficas y tamaño de las mismas en pares de bases, obtenidas con los 4 oligonucleótidos seleccionados para efectuar RAPD

Oligonucleótidos	N° máx. de bandas	N° mín. de bandas	N° total de bandas	Cantidad de bandas polimórficas	Tamaño de las bandas (bp)*
OPA-01	18	1	84	84	3317-173
OPA-03	22	6	72	72	2128-178
OPA-05	20	1	91	91	3457-163
OPA-10	23	1	79	79	2125-114
Total			326	326	

*bp: pares de bases

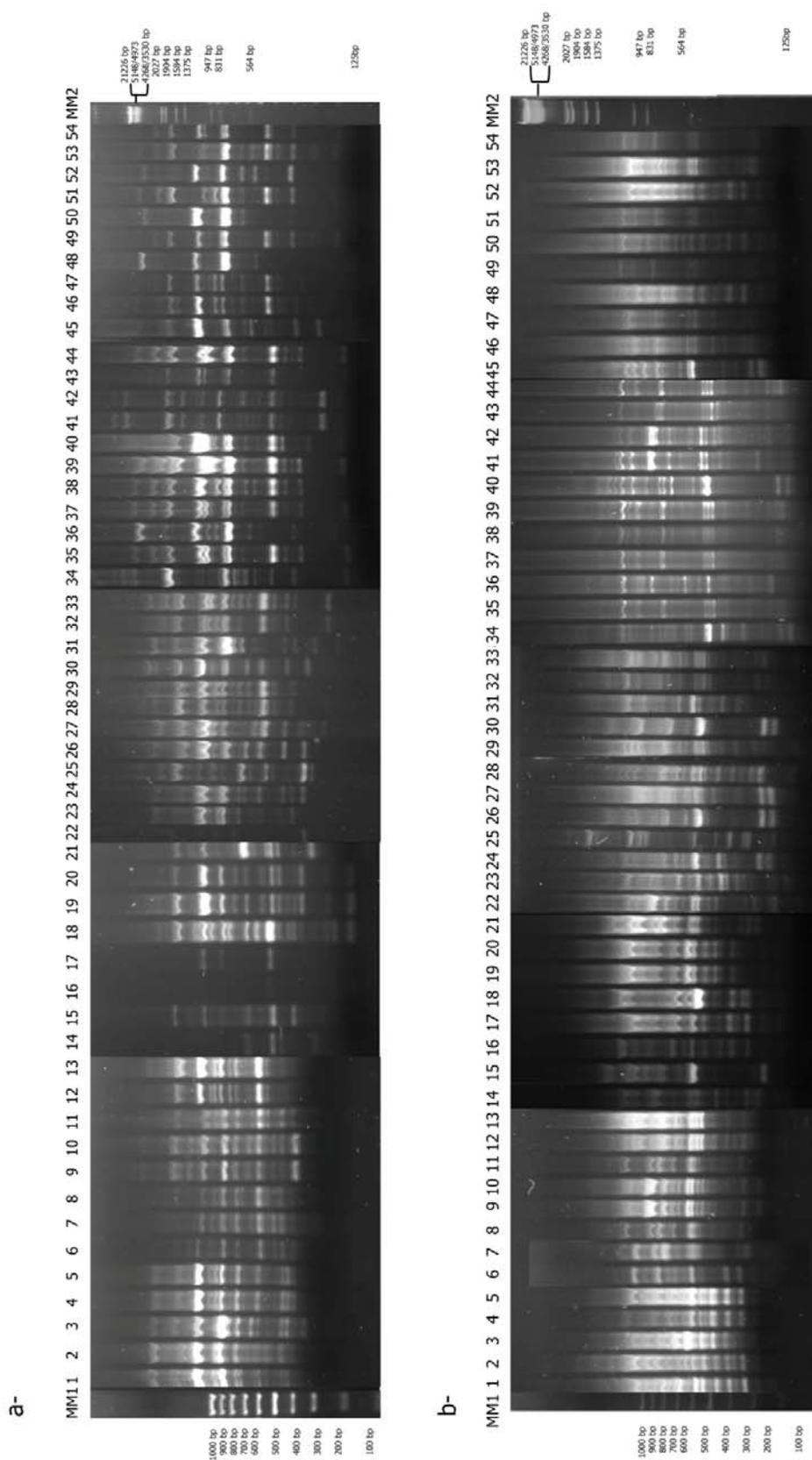
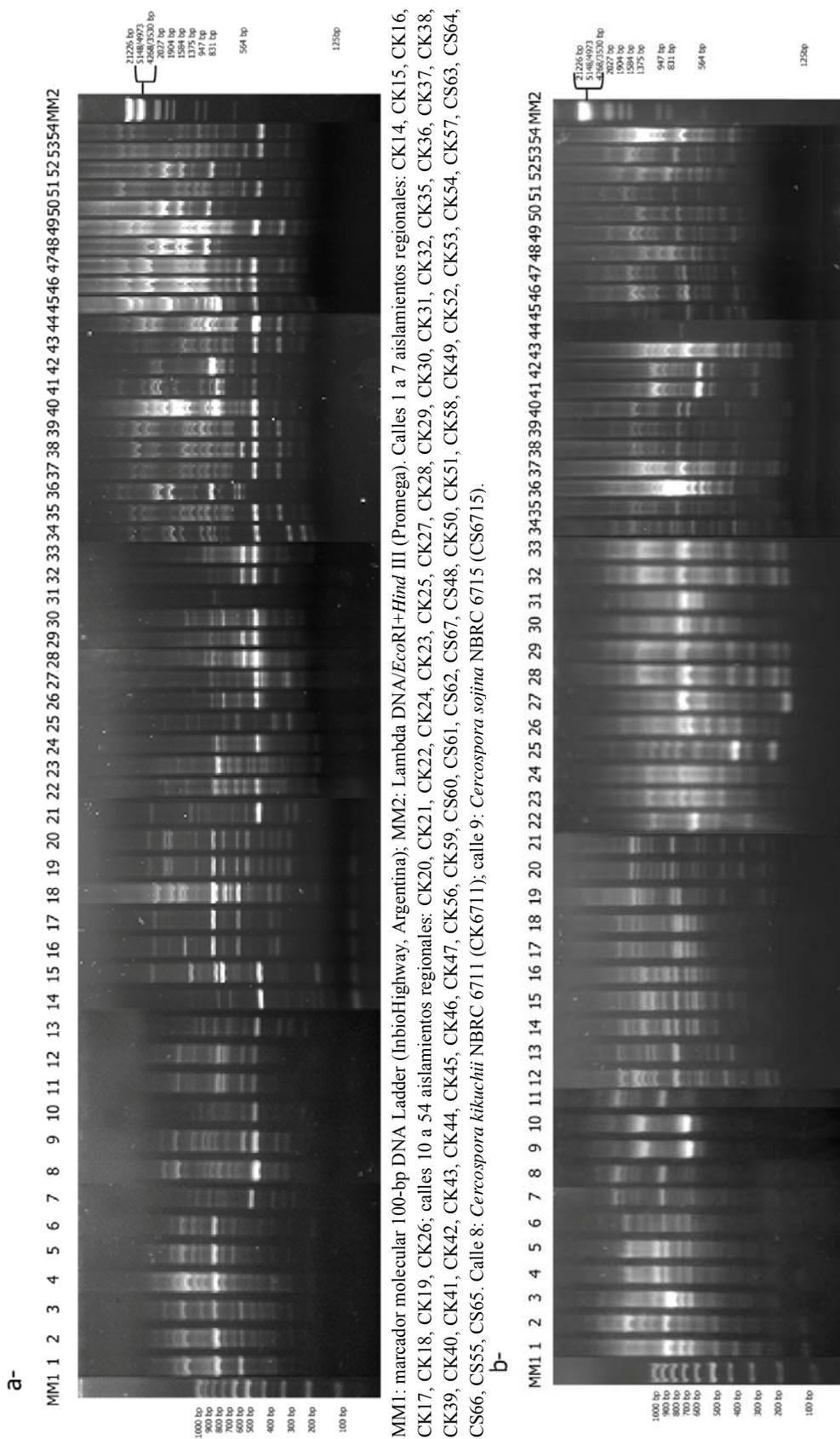


Figura IV.12. Perfil electroforético de RAPD producido por aislamientos de *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina* y cepas NBRC usando a- OPA-01 y b- OPA-03

MM1: marcador molecular 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); MM2: Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Promega). Calles 1 a 11 aislamientos regionales: CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK20, CK21, CK22, CK24; Calles 14 a 54 aislamientos regionales: CK23, CK25, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK32, CK35, CK36, CK37, CK38, CK39, CK40, CK41, CK42, CK43, CK44, CK45, CK46, CK47, CK56, CK59, CS60, CS61, CS62, CS67, CS48, CK50, CK51, CK58, CK49, CK52, CK53, CK54, CK57, CS63, CS64, CS65, CS66, CS67, CS68, CS69, CS70, CS71, CS72, CS73, CS74, CS75, CS76, CS77, CS78, CS79, CS80, CS81, CS82, CS83, CS84, CS85, CS86, CS87, CS88, CS89, CS90, CS91, CS92, CS93, CS94, CS95, CS96, CS97, CS98, CS99, CS100, CS101, CS102, CS103, CS104, CS105, CS106, CS107, CS108, CS109, CS110, CS111, CS112, CS113, CS114, CS115, CS116, CS117, CS118, CS119, CS120, CS121, CS122, CS123, CS124, CS125, CS126, CS127, CS128, CS129, CS130, CS131, CS132, CS133, CS134, CS135, CS136, CS137, CS138, CS139, CS140, CS141, CS142, CS143, CS144, CS145, CS146, CS147, CS148, CS149, CS150, CS151, CS152, CS153, CS154, CS155, CS156, CS157, CS158, CS159, CS160, CS161, CS162, CS163, CS164, CS165, CS166, CS167, CS168, CS169, CS170, CS171, CS172, CS173, CS174, CS175, CS176, CS177, CS178, CS179, CS180, CS181, CS182, CS183, CS184, CS185, CS186, CS187, CS188, CS189, CS190, CS191, CS192, CS193, CS194, CS195, CS196, CS197, CS198, CS199, CS200, CS201, CS202, CS203, CS204, CS205, CS206, CS207, CS208, CS209, CS210, CS211, CS212, CS213, CS214, CS215, CS216, CS217, CS218, CS219, CS220, CS221, CS222, CS223, CS224, CS225, CS226, CS227, CS228, CS229, CS230, CS231, CS232, CS233, CS234, CS235, CS236, CS237, CS238, CS239, CS240, CS241, CS242, CS243, CS244, CS245, CS246, CS247, CS248, CS249, CS250, CS251, CS252, CS253, CS254, CS255, CS256, CS257, CS258, CS259, CS260, CS261, CS262, CS263, CS264, CS265, CS266, CS267, CS268, CS269, CS270, CS271, CS272, CS273, CS274, CS275, CS276, CS277, CS278, CS279, CS280, CS281, CS282, CS283, CS284, CS285, CS286, CS287, CS288, CS289, CS290, CS291, CS292, CS293, CS294, CS295, CS296, CS297, CS298, CS299, CS300, CS301, CS302, CS303, CS304, CS305, CS306, CS307, CS308, CS309, CS310, CS311, CS312, CS313, CS314, CS315, CS316, CS317, CS318, CS319, CS320, CS321, CS322, CS323, CS324, CS325, CS326, CS327, CS328, CS329, CS330, CS331, CS332, CS333, CS334, CS335, CS336, CS337, CS338, CS339, CS340, CS341, CS342, CS343, CS344, CS345, CS346, CS347, CS348, CS349, CS350, CS351, CS352, CS353, CS354, CS355, CS356, CS357, CS358, CS359, CS360, CS361, CS362, CS363, CS364, CS365, CS366, CS367, CS368, CS369, CS370, CS371, CS372, CS373, CS374, CS375, CS376, CS377, CS378, CS379, CS380, CS381, CS382, CS383, CS384, CS385, CS386, CS387, CS388, CS389, CS390, CS391, CS392, CS393, CS394, CS395, CS396, CS397, CS398, CS399, CS400, CS401, CS402, CS403, CS404, CS405, CS406, CS407, CS408, CS409, CS410, CS411, CS412, CS413, CS414, CS415, CS416, CS417, CS418, CS419, CS420, CS421, CS422, CS423, CS424, CS425, CS426, CS427, CS428, CS429, CS430, CS431, CS432, CS433, CS434, CS435, CS436, CS437, CS438, CS439, CS440, CS441, CS442, CS443, CS444, CS445, CS446, CS447, CS448, CS449, CS450, CS451, CS452, CS453, CS454, CS455, CS456, CS457, CS458, CS459, CS460, CS461, CS462, CS463, CS464, CS465, CS466, CS467, CS468, CS469, CS470, CS471, CS472, CS473, CS474, CS475, CS476, CS477, CS478, CS479, CS480, CS481, CS482, CS483, CS484, CS485, CS486, CS487, CS488, CS489, CS490, CS491, CS492, CS493, CS494, CS495, CS496, CS497, CS498, CS499, CS500, CS501, CS502, CS503, CS504, CS505, CS506, CS507, CS508, CS509, CS510, CS511, CS512, CS513, CS514, CS515, CS516, CS517, CS518, CS519, CS520, CS521, CS522, CS523, CS524, CS525, CS526, CS527, CS528, CS529, CS530, CS531, CS532, CS533, CS534, CS535, CS536, CS537, CS538, CS539, CS540, CS541, CS542, CS543, CS544, CS545, CS546, CS547, CS548, CS549, CS550, CS551, CS552, CS553, CS554, CS555, CS556, CS557, CS558, CS559, CS560, CS561, CS562, CS563, CS564, CS565, CS566, CS567, CS568, CS569, CS570, CS571, CS572, CS573, CS574, CS575, CS576, CS577, CS578, CS579, CS580, CS581, CS582, CS583, CS584, CS585, CS586, CS587, CS588, CS589, CS590, CS591, CS592, CS593, CS594, CS595, CS596, CS597, CS598, CS599, CS600, CS601, CS602, CS603, CS604, CS605, CS606, CS607, CS608, CS609, CS610, CS611, CS612, CS613, CS614, CS615, CS616, CS617, CS618, CS619, CS620, CS621, CS622, CS623, CS624, CS625, CS626, CS627, CS628, CS629, CS630, CS631, CS632, CS633, CS634, CS635, CS636, CS637, CS638, CS639, CS640, CS641, CS642, CS643, CS644, CS645, CS646, CS647, CS648, CS649, CS650, CS651, CS652, CS653, CS654, CS655, CS656, CS657, CS658, CS659, CS660, CS661, CS662, CS663, CS664, CS665, CS666, CS667, CS668, CS669, CS670, CS671, CS672, CS673, CS674, CS675, CS676, CS677, CS678, CS679, CS680, CS681, CS682, CS683, CS684, CS685, CS686, CS687, CS688, CS689, CS690, CS691, CS692, CS693, CS694, CS695, CS696, CS697, CS698, CS699, CS700, CS701, CS702, CS703, CS704, CS705, CS706, CS707, CS708, CS709, CS710, CS711, CS712, CS713, CS714, CS715, CS716, CS717, CS718, CS719, CS720, CS721, CS722, CS723, CS724, CS725, CS726, CS727, CS728, CS729, CS730, CS731, CS732, CS733, CS734, CS735, CS736, CS737, CS738, CS739, CS740, CS741, CS742, CS743, CS744, CS745, CS746, CS747, CS748, CS749, CS750, CS751, CS752, CS753, CS754, CS755, CS756, CS757, CS758, CS759, CS760, CS761, CS762, CS763, CS764, CS765, CS766, CS767, CS768, CS769, CS770, CS771, CS772, CS773, CS774, CS775, CS776, CS777, CS778, CS779, CS780, CS781, CS782, CS783, CS784, CS785, CS786, CS787, CS788, CS789, CS790, CS791, CS792, CS793, CS794, CS795, CS796, CS797, CS798, CS799, CS800, CS801, CS802, CS803, CS804, CS805, CS806, CS807, CS808, CS809, CS810, CS811, CS812, CS813, CS814, CS815, CS816, CS817, CS818, CS819, CS820, CS821, CS822, CS823, CS824, CS825, CS826, CS827, CS828, CS829, CS830, CS831, CS832, CS833, CS834, CS835, CS836, CS837, CS838, CS839, CS840, CS841, CS842, CS843, CS844, CS845, CS846, CS847, CS848, CS849, CS850, CS851, CS852, CS853, CS854, CS855, CS856, CS857, CS858, CS859, CS860, CS861, CS862, CS863, CS864, CS865, CS866, CS867, CS868, CS869, CS870, CS871, CS872, CS873, CS874, CS875, CS876, CS877, CS878, CS879, CS880, CS881, CS882, CS883, CS884, CS885, CS886, CS887, CS888, CS889, CS890, CS891, CS892, CS893, CS894, CS895, CS896, CS897, CS898, CS899, CS900, CS901, CS902, CS903, CS904, CS905, CS906, CS907, CS908, CS909, CS910, CS911, CS912, CS913, CS914, CS915, CS916, CS917, CS918, CS919, CS920, CS921, CS922, CS923, CS924, CS925, CS926, CS927, CS928, CS929, CS930, CS931, CS932, CS933, CS934, CS935, CS936, CS937, CS938, CS939, CS940, CS941, CS942, CS943, CS944, CS945, CS946, CS947, CS948, CS949, CS950, CS951, CS952, CS953, CS954, CS955, CS956, CS957, CS958, CS959, CS960, CS961, CS962, CS963, CS964, CS965, CS966, CS967, CS968, CS969, CS970, CS971, CS972, CS973, CS974, CS975, CS976, CS977, CS978, CS979, CS980, CS981, CS982, CS983, CS984, CS985, CS986, CS987, CS988, CS989, CS990, CS991, CS992, CS993, CS994, CS995, CS996, CS997, CS998, CS999, CS1000.



MM1: marcador molecular 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); MM2: Lambda DNA/EcoRI+Hind III (Promega). Calles 1 a 7 aislamientos regionales: CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK26; calles 10 a 54 aislamientos regionales: CK20, CK21, CK22, CK24, CK25, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK32, CK35, CK36, CK37, CK38, CK39, CK40, CK41, CK42, CK43, CK44, CK45, CK46, CK47, CK56, CK59, CS60, CS61, CS62, CS67, CS48, CK50, CK51, CK58, CK49, CK52, CK53, CK54, CK57, CS63, CS64, CS66, CS55, CS65. Calle 8: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (CK6711); calle 9: *Cercospora sojae* NBRC 6715 (CS6715).

MM1: marcador molecular 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); MM2: Lambda DNA/EcoRI+Hind III (Promega). Calles 1 a 19 aislamientos regionales: CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK26, CK20, CK21, CK22, CK24, CK25, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK32; calles 22 a 54 aislamientos regionales: CK35, CK36, CK37, CK38, CK39, CK40, CK41, CK42, CK43, CK44, CK45, CK46, CK47, CK56, CK59, CS60, CS61, CS62, CS67, CS48, CK50, CK51, CK58, CK49, CK52, CK53, CK54, CK57, CS63, CS64, CS66, CS55, CS65. Calle 20: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (CK6711); calle 21: *Cercospora sojae* NBRC 6715 (CS6715).

Figura IV.13. Perfil electroforético de RAPD producido por aislamientos de *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae* y cepas patrones NBRC usando a- OPA-05 y b- OPA-10

Con las 4 matrices de distancia obtenidas para cada uno de los OPA seleccionados, se calculó una nueva matriz de distancia promedio (93x54) (Figura IV.14).

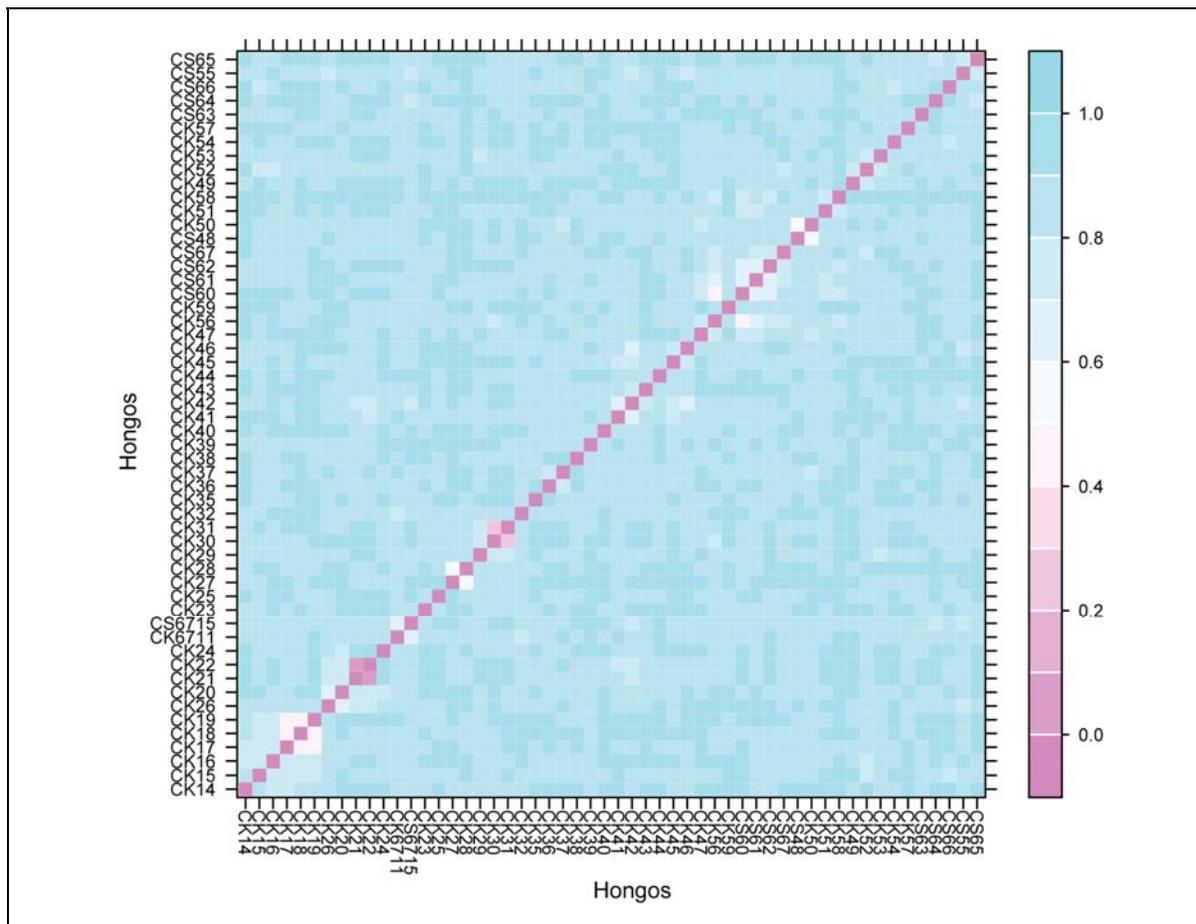


Figura IV.14. Matriz de distancia promedio

CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK26, CK20, CK21, CK22, CK24, CK23, CK25, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK32, CK35, CK36, CK37, CK38, CK39, CK40, CK41, CK42, CK43, CK44, CK45, CK46, CK47, CK56, CK59, CS60, CS61, CS62, CS67, CS48, CK50, CK51, CK58, CK49, CK52, CK53, CK54, CK57, CS63, CS64, CS66, CS55, CS65: aislamientos regionales. CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. CS6715: *Cercospora sojina* NBRC 6715

Se observaron distancias cercanas a cero en aquellos aislamientos regionales fuertemente relacionados como CK21 y CK22 aislados de la región R1 (Margarita) y del mismo cultivar, así como también CK30 y CK31, ambos aislados de la región R5 (Esperanza) e idéntico cultivar. Por otro lado, CK17, CK18 y CK19, CK27 y CK28 y CS48 y CK50 formaron grupos relacionados genéticamente ya que sus aislamientos se encontraban a una distancia de 0,5. Para el resto de los hongos se detectaron grandes distancias genéticas.

En base a la óptima combinación obtenida con el análisis Fuzzy (FANNY) y respetando el número de “clusters” hallados (óptimo “average silhouette” $k=9$), se aplicó el algoritmo AGNES.

El análisis de los “clusters” según AGNES, resultó en un dendrograma que mostró grandes distancias genéticas entre los diferentes hongos (Figura IV.15). No obstante se pudo realizar el siguiente análisis:

El “**cluster**” 1 incluyó 24 hongos (22 aislamientos y las 2 cepas patrones), CK14, CK23, CK35, CS63, CK6711, CS6715, CK32, CK59, CS64, CS55, CS65, CK54, CS66, CK15, CK16, CK29, CK52, CK53, CK25, CK49, CK57, CK38, CK47, CS67, agrupados en 8 subgrupos.

El subgrupo 1a incluyó 4 aislamientos (CK14, CK23, CK35 y CS63), 3 de ellos, CK23, CK35 y CS63, provinieron del mismo origen geográfico (R3, San Justo) en diferentes campañas y de estos, solo dos (CK23 y CS63) compartieron el mismo cultivar (A 4910).

El subgrupo 1b incluyó las dos cepas NBRC (CK6711 y CS6715) y el aislamiento CK32 obtenido de la localidad de Esperanza (R5).

El subgrupo 1c se formó con 4 aislamientos (CK59, CS64, CS55 y CS65) obtenidos durante la campaña 2008-2009. Tres de ellos correspondieron a la especie *C. sojina*, y provinieron de diferentes orígenes (R3, R4 y R6, respectivamente) y cultivares.

El subgrupo 1d incluyó dos aislamientos de especies diferentes (CK54 y CS66), ambos procedentes del mismo origen geográfico (R3, San Justo) en la campaña 2008-2009, pero de distintos cultivares (A 6401 y A 6411, respectivamente).

El subgrupo 1e incluyó dos aislamientos (CK15 y CK16), que fueron aislados en la campaña 2005-2006, de la misma región (R4) y cultivar (A 5409).

El subgrupo 1f se formó con 3 aislamientos, CK29, CK52 y CK53, los dos últimos provinieron de la misma localidad (San Justo) y cultivar (A 4910).

Los aislamientos del subgrupo 1g (CK25, CK49 y CK57) no compartieron el mismo origen geográfico, solo CK25 y CK49 provinieron del mismo cultivar (A 8000) pero en campañas diferentes.

Por último, el subgrupo 1h, incluyó 3 aislamientos CK38, CK47 y CS67. Los dos últimos compartieron el mismo origen geográfico (R5, Esperanza) y fueron aislados durante la misma campaña (2008-2009), pero pertenecieron a especies diferentes.

El “**cluster**” 2 incluyó dos aislamientos, CK27 y CK28, aislados durante la misma campaña (2005-2006), pero de diferente origen geográfico (R2, G. Crespo y R5, Esperanza, respectivamente) y cultivar (A 8000 y A 7636).

El “**cluster**” 3 incluyó dos aislamientos, CK30 y CK31, muy cercanos entre sí (distancia genética: 0,2), fueron aislados durante la campaña 2005-2006 y provinieron del mismo origen geográfico (R5, Esperanza) y cultivar (A 7636).

El “**cluster**” 4 incluyó 6 aislamientos (CK56, CS60, CS61, CS62, CK51, CK58) obtenidos durante la campaña 2008-2009, que se agruparon en dos subgrupos 4a y 4b. El primero estaba formado por 4 aislamientos provenientes del mismo origen geográfico (R5, Esperanza), entre los cuales CK56 y CS60 estuvieron relacionados entre sí a pesar de ser especies diferentes. El subgrupo 4b incluyó a CK51 y CK58 que solo compartieron el origen geográfico (R2, G. Crespo).

El “**cluster**” 5, incluyó 3 aislamientos relacionados entre sí, CK17, CK18 y CK19 (distancia genética 0,5). Los mismos fueron aislados de una misma región (R4, Emilia) y cultivar (A 5409).

El “**cluster**” 6 incluyó 3 aislamientos, CK26, CK20 y CK24 obtenidos durante la campaña 2005-2006. CK20 se encontró genéticamente más cerca de CK26 que de CK24 con el que compartió el mismo origen geográfico y cultivar.

El “**cluster**” 7 estaba formado por dos aislamientos, CK21 y CK22, cuya distancia era 0, ambos provinieron del mismo origen geográfico (R1, Margarita) y cultivar (TJ 2070).

El “**cluster**” 8 incluyó 10 aislamientos agrupados en 4 subgrupos. El subgrupo 8a estaba formado por 3 aislamientos, CK36, CK37 y CK44 de diferentes orígenes geográficos (R5 Esperanza, R1 Margarita y R4 Llambi Campbell, respectivamente) y cultivares (RA 626, ASGROW.8000 y A 8000, respectivamente). El subgrupo 8b también estaba formado por 3 aislamientos, CK39, CK43 y CK40, provenientes de diferentes localidades (R6 Villa Trinidad, R4 Emilia y R1 Margarita, respectivamente) y cultivares (A 6401, A 7118 y ASGROW.8000, respectivamente). El subgrupo 8c estaba formado por 2 aislamientos, CK41 y CK42, que no compartían ni el origen (R6 Villa Trinidad y R4 Emilia, respectivamente), ni el cultivar (A 6401 y RA 703, respectivamente). El subgrupo 8d estaba formado por dos aislamientos CK45 y CK46, que tenían el mismo origen geográfico (R6, Villa Trinidad) pero provenían de cultivares diferentes (A 8000 y A 6401, respectivamente).

El “**cluster**” 9 incluyó 2 aislamientos de diferentes especies CS48 y CK50, ambos se obtuvieron de la misma región (R2, G. Crespo) durante la campaña 2008-2009.

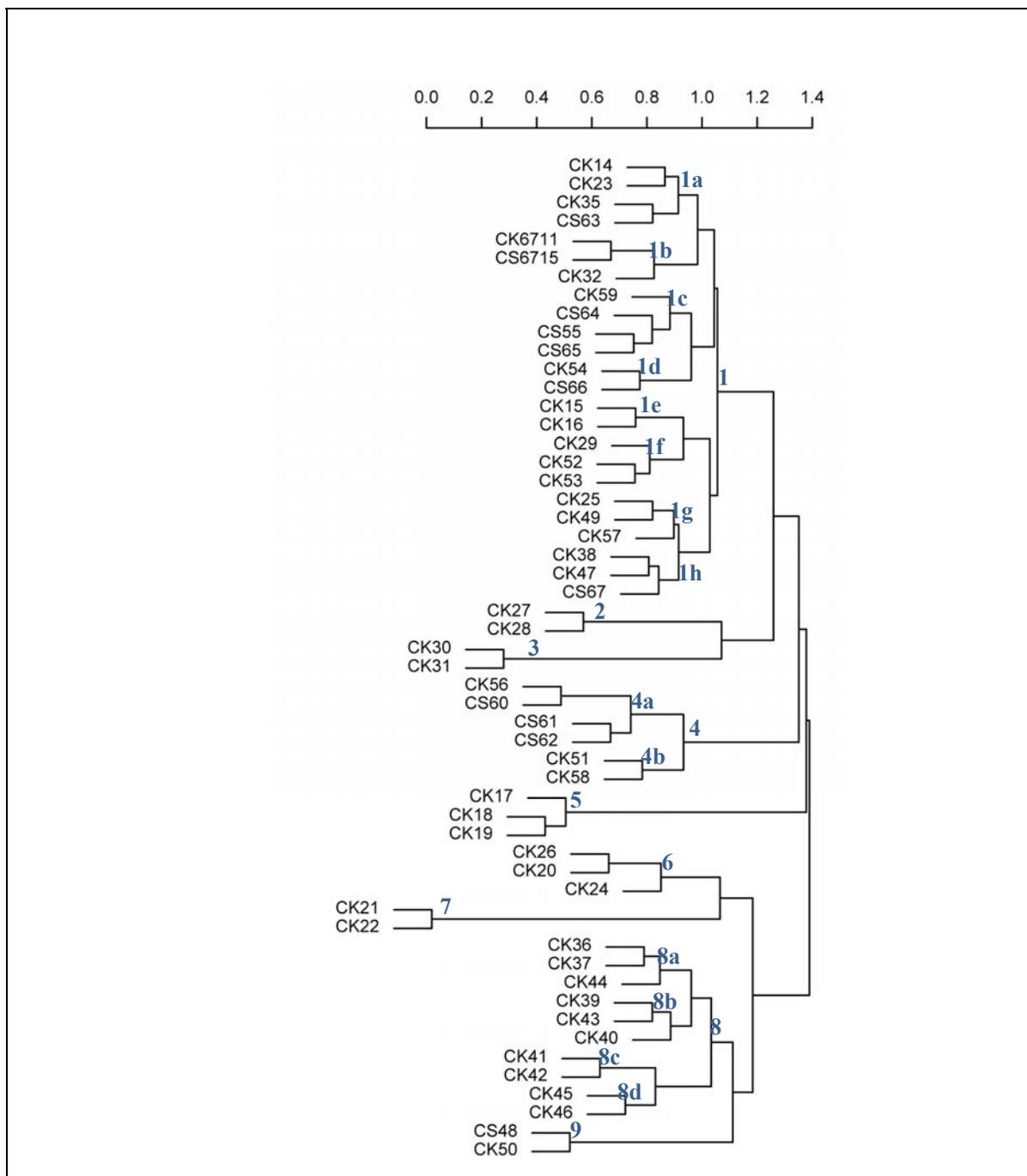


Figura IV.15. Dendrograma de AGNES (met.=”Ward”; Coeficiente Aglomerativo= 0,51)

CK14, CK23, CK35, CS63, CK32, CK59, CS64, CS55, CS65, CK54, CS66, CK15, CK16, CK29, CK52, CK53, CK25, CK49, CK57, CK38, CK47, CS67, CK27, CK28, CK30, CK31, CK56, CS60, CS61, CS62, CK51, CK58, CK17, CK18, CK19, CK26, CK20, CK24, CK21, CK22, CK36, CK37, CK44, CK39, CK43, CK40, CK41, CK42, CK45, CK46, CS48 y CK50: Aislamientos regionales. CS6715: *Cercospora sojina* NBRC 6715. CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711.

4.3. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LAS REGIONES INTERGÉNICAS (ITS) DE ADN_r. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

El análisis electroforético de los productos de amplificación de los 52 aislamientos de *Cercospora* y de las dos cepas patrones *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715, reveló la presencia de una única banda de aproximadamente 500-600 bp, por comparación con el marcador de peso molecular 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina).

A modo de ejemplo, se puede visualizar dicha banda en la Figura IV.16, para los aislamientos CK14, CK36 y CS67.

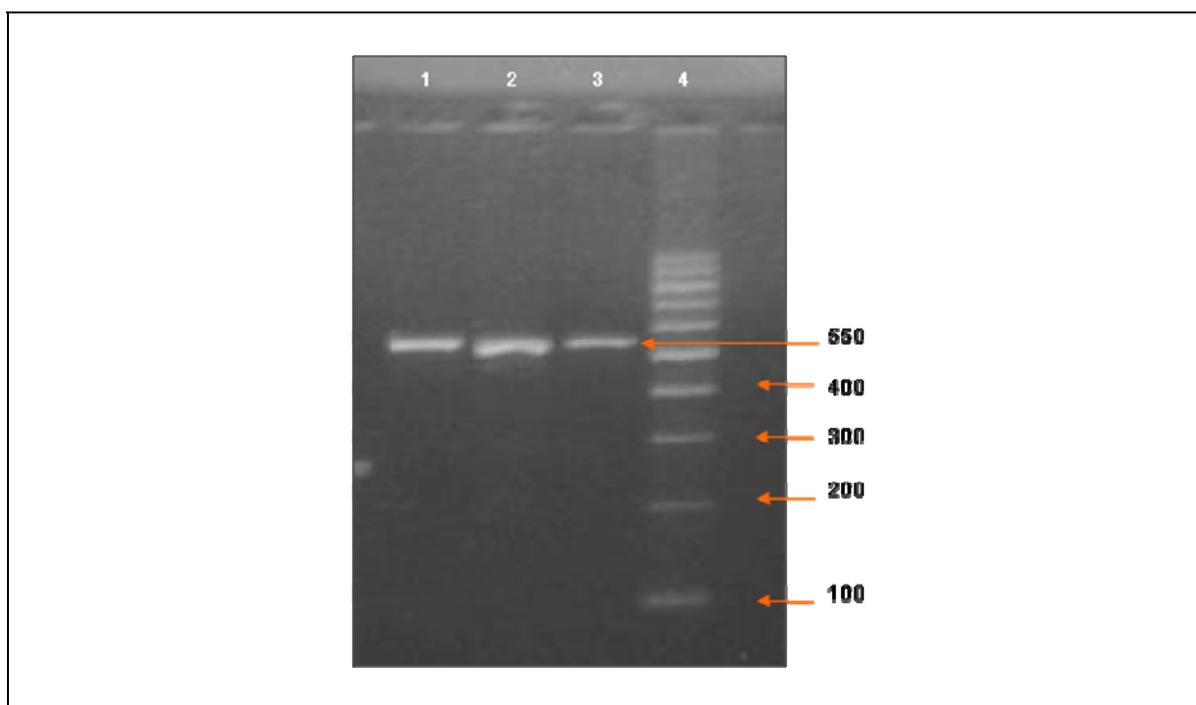


Figura IV.16. Gel de los productos de amplificación de la región intergénica (ITS) del ADN_r Calle1: CK14, Calle 2: CK36, Calle 3: CS67, Calle 4: marcador molecular 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina)

4.3.1. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS Y PURIFICADOS MEDIANTE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Como se comentó en Materiales y Métodos, los fragmentos amplificados y purificados se digirieron con 6 endonucleasas de restricción *DdeI*, *EcoRI*, *HinfI*, *HaeIII*, *HindIII*, y *RsaI* (Promega). Las enzimas con las que se obtuvo menor número de bandas fueron *DdeI* (dos bandas de 386 bp y 105 bp), *EcoRI* (dos bandas de 279 bp) e *HinfI* (dos bandas de 279 bp y 266 bp). La enzima que mayor variabilidad aportó fue *HaeIII*, dando como resultado 3 patrones diferentes, de 356 bp, 86 bp y 68 bp aproximadamente. Por su parte, *HindIII*, y *RsaI*, en las mismas condiciones de trabajo, no presentaron sitios de corte, observándose una sola banda de 550 bp y 600 bp respectivamente.

Cada uno de los aislamientos analizados, presentó el mismo patrón de restricción con cada una de las enzimas empleadas.

Los hongos de los géneros *Cladosporium* y *Penicillium* mostraron un patrón de restricción distinto a los observados en las especies de *Cercospora*, con cada una de las enzimas empleadas.

A modo de ejemplo, se pueden visualizar en la Figura IV.17, los fragmentos obtenidos para algunos aislamientos regionales de *C. kikuchii* (CK14, CK36 y CK41) y *C. sojina* (CS67).

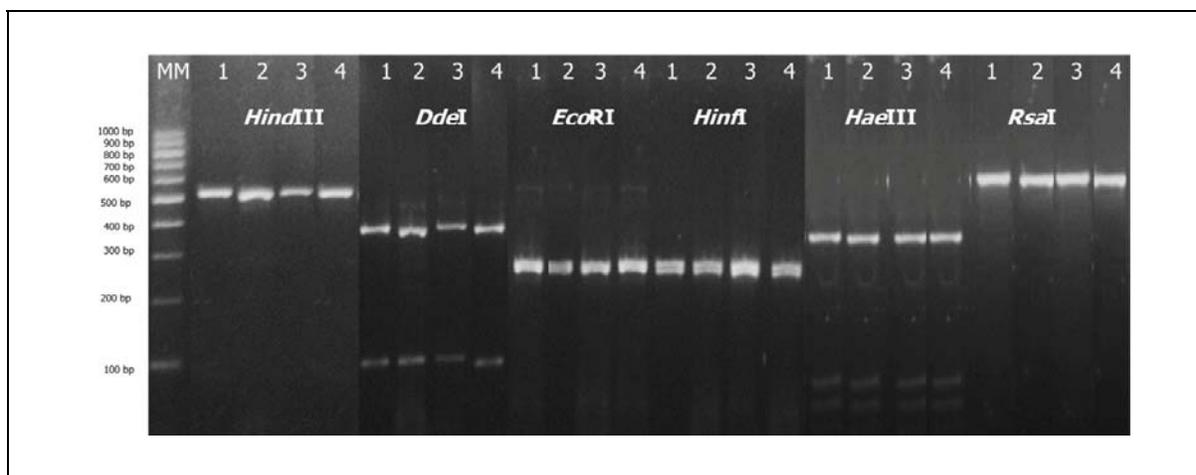


Figura IV.17. Fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción (RFLP)

Marcador molecular: 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina). Aislamientos regionales 1- CK14, 2- CK36, 3- CK41, 4- CS67. Endonucleasas de restricción: *HindIII*, *DdeI*, *EcoRI*, *HinfI*, *HaeIII* y *RsaI*

4.3.2. SECUENCIACIÓN. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Se secuenciaron 54 hongos: los 52 aislamientos regionales del género *Cercospora* y las dos cepas patrones *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715. Los oligonucleótidos ITS-4 e ITS-5 amplificaron uniformemente, en todos los casos, un fragmento de 518 bp, que involucró la fracción 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S.

El rango de concentraciones de ADN_r amplificado estuvo entre 100 y 150 ng/μL.

Dos de las secuencias obtenidas, correspondientes a los aislamientos CK14 y CK35, se depositaron en la base de datos de secuencias GenBank, bajo los números de acceso HM631727 y HM631728, respectivamente (Lurá y col., 2011). En las mismas, se logró diferenciar los exones e intrones y se determinó su longitud en pares de bases (pb), siendo de 32 pb, 158 pb y 39 pb para los primeros (subunidades del ADN_r 18S, 5.8S y 26S, respectivamente) y de 145 pb y 144 pb para los segundos (secuencias no codificables ITS1 e ITS2, respectivamente), como se visualiza en la Figura IV.18.

<1...32 “18S ribosomal RNA”

ORIGIN

```

1 tctccgtagg tgaacctgcg gagggatcat tactgagtga gggccttcgg gctcgacctc
61 caaccctttg tgaacacaac ttgttgcttc gggggcgacc ctgccgtttc gacggcgagc
121 gccccgggag gccttcaaac actgcatctt tgcgtcggag ttaagtaaa taaacaaaa
181 ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcga atgcgataag
241 taatgtgaat tgcagaatc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccttg
301 gtattccgag gggcatgcct gttcagcgt catttcacca ctcaagcctc gcttggatt
361 gggcgccgcg gtgttcgcg cgctcaaag tctccggtg agctgtccgt ctctaagcgt
421 tgtgatttca ttaatcgctt cggagcggc gcggtcggc cgttaaatc tttataagg
481 ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct gaacttaa

```

33..177 “internal transcribed spacer 1”

ORIGIN

```

1 tctccgtagg tgaacctgcg gagggatcat tactgagtga gggccttcgg gctcgacctc
61 caaccctttg tgaacacaac ttgttgcttc gggggcgacc ctgccgtttc gacggcgagc
121 gccccgggag gccttcaaac actgcatctt tgcgtcggag ttaagtaaa taaacaaa
181 ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcga atgcgataag
241 taatgtgaat tgcagaatc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccttg
301 gtattccgag gggcatgcct gttcagcgt catttcacca ctcaagcctc gcttggatt
361 gggcgccgcg gtgttcgcg cgctcaaag tctccggtg agctgtccgt ctctaagcgt
421 tgtgatttca ttaatcgctt cggagcggc gcggtcggc cgttaaatc tttataagg
481 ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct gaacttaa

```

178..335 “5.8S ribosomal RNA”

ORIGIN

```

1 tctccgtagg tgaacctgcg gagggatcat tactgagtga gggccttcgg gctcgacctc
61 caaccctttg tgaacacaac ttgttgcttc gggggcgacc ctgccgtttc gacggcgagc
121 gccccgggag gccttcaaac actgcatctt tgcgtcggag ttaagtaaa taaacaaa
181 ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcga atgcgataag
241 taatgtgaat tgcagaatc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccttg
301 gtattccgag gggcatgcct gttcagcgt catttcacca ctcaagcctc gcttggatt
361 gggcgccgcg gtgttcgcg cgctcaaag tctccggtg agctgtccgt ctctaagcgt
421 tgtgatttca ttaatcgctt cggagcggc gcggtcggc cgttaaatc tttataagg
481 ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct gaacttaa

```

336..479 “internal transcribed spacer 2”

ORIGIN

```

1 tctccgtagg tgaacctgcg gagggatcat tactgagtga gggccttcgg gctcgacctc
61 caaccctttg tgaacacaac ttgttgcttc gggggcgacc ctgccgtttc gacggcgagc
121 gccccgggag gccttcaaac actgcatctt tgcgtcggag ttaagtaaa taaacaaaa
181 ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcga atgcgataag
241 taatgtgaat tgcagaatc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccttg
301 gtattccgag gggcatgcct gttcagcgt catttcacca ctcaagcctc gcttggatt
361 gggcgccgcg gtgttcgcg cgctcaaag tctccggtg agctgtccgt ctctaagcgt
421 tgtgatttca ttaatcgctt cggagcggc gcggtcggc cgttaaatc tttataagg
481 ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct gaacttaa

```

480..>518 “26S ribosomal RNA”

ORIGIN

```

1 tctccgtagg tgaacctgcg gagggatcat tactgagtga gggccttcgg gctcgacctc
61 caaccctttg tgaacacaac ttgttgcttc gggggcgacc ctgccgtttc gacggcgagc
121 gccccgggag gccttcaaac actgcatctt tgcgtcggag ttaagtaaa taaacaaaa
181 ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcga atgcgataag
241 taatgtgaat tgcagaatc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccttg
301 gtattccgag gggcatgcct gttcagcgt catttcacca ctcaagcctc gcttggatt
361 gggcgccgcg gtgttcgcg cgctcaaag tctccggtg agctgtccgt ctctaagcgt
421 tgtgatttca ttaatcgctt cggagcggc gcggtcggc cgttaaatc tttataagg
481 ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct gaacttaa

```

Figura IV.18. *Cercospora kikuchii* isolate C14. Secuencia en GenBank: número de acceso HM631727 (Vaccari y col., 2010)

Una vez alineados todos los nucleótidos, se observaron 2 sitios variables en la región intergénica ITS2 (posiciones 474 y 476).

De la comparación de las secuencias correspondientes a los aislamientos regionales y las cepas NBRC, con aquellas disponibles en la base de datos GenBank para especies de *Cercospora* (número de acceso: AY633838 para *C. kikuchii* y AY266157 para *C. sojina*), se obtuvo el siguiente análisis:

Del total de hongos aislados, veintidós de ellos (CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK21, CK22, CK24, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK36, CK37, CK44, CK46, CK49, CK51, CK59, CS63 y CS66) presentaron 100% de identidad con la secuencia de *Cercospora sojina* cuyo número de acceso en GenBank es AY266157 (denominada *Cercospora sojina* isolate CS42 por Stewart y col., 2003) y 99% de identidad con *C. kikuchii* cuyo número de acceso en GenBank es AY633838 (denominada *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 por Marin y col., 2004), la diferencia consistió en una sustitución en la posición 474 (C sustituyó a T) (Figura IV.19)

	460	470	480	490	500
AY266157.1 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
AY633838.1 (449)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK15 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK16 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK17 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK18 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK19 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK21 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK22 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK24 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK27 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK28 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK29 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK30 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK31 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK36 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK37 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK44 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK46 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK49 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK51 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK59 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CS63 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CS66 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	

Figura IV.19. Alineamiento de la región ITS de algunos aislamientos de *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina*

AY266157.1: *Cercospora sojina* isolate CS42 (Stewart y col., 2003)

AY633838.1: *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 (Marin y col., 2004)

CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK21, CK22, CK24, CK27, CK28, CK29, CK30, CK31, CK36, CK37, CK44, CK46, CK49, CK51, CK59, CS63 y CS66: aislamientos regionales.

Diecisiete de los aislamientos regionales (CK20, CK23, CK26, CK32, CK41, CK50, CK52, CK53, CK56, CK57, CK58, CS55, CS60, CS61, CS62, CS64 y CS65), y las cepas de colección *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715, presentaron 100% de identidad con *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 cuyo número de acceso en GenBank es AY633838 (Marin y col., 2004), y 99% de identidad con *Cercospora sojina* isolate CS42 cuyo número de acceso en GenBank es AY266157 (Stewart y col., 2003), la diferencia consistió en una sustitución en la posición 474 (T sustituyó a C) (Figura IV.20)

	460	470	480	490	500
AY266157.1 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	C	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
AY633838.1 (449)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK6711 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK20 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK23 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK26 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK32 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK41 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK50 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK52 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK53 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK56 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK57 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CK58 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS6715 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS55 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS60 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS61 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS62 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS64 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		
CS65 (451)	GCGGTTCGCGCCGTTAAATCTTT	T	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG		

Figura IV.20. Alineamiento de la región ITS de algunos aislamientos de *C. kikuchii* y *C. sojina*

AY266157.1: *Cercospora sojina* isolate CS42 (Stewart y col., 2003)

AY633838.1: *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 (Marin y col., 2004)

CK20, CK23, CK32, CK41, CK50, CK52, CK53, CK56, CK57, CK58, CS55, CS60, CS61, CS62, CS64 y CS65: aislamientos regionales. CK6711: *C. kikuchii* NBRC 6711. CS6715: *C. sojina* NBRC 6715.

Las secuencias de diez aislamientos regionales (CK14, CK25, CK39, CK40, CK42, CK43, CK45, CK47, CK54 y CS48) mostraron un 99% de identidad con *Cercospora sojina* isolate CS42 cuyo número de acceso en GenBank es AY266157 (Stewart y col., 2003), la diferencia consistió en sustituciones en las posiciones 474 (T sustituyó a C) y 476 (T sustituyó a C); y con *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 cuyo número de acceso en GenBank es AY633838 (Marin y col., 2004), la diferencia radicó en la posición 476 donde T sustituyó a C (Figura IV.21).

	460	470	480	490	500
AY266157.1 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
AY633838.1 (449)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK14 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK25 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK39 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK40 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK42 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK43 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK45 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK47 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK54 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CS48 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	

Figura IV.21. Alineamiento de la región ITS de algunos aislamientos de *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina*

AY266157.1: *Cercospora sojina* isolate CS42 (Stewart y col., 2003)

AY633838.1: *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 (Marin y col., 2004)

CK14, CK25, CK39, CK40, CK42, CK43, CK45, CK47, CK54 y CS48: aislamientos regionales

Tres aislamientos regionales (CK35, CK38 y CS67) presentaron 99% de identidad con *Cercospora sojina* isolate CS42 cuyo número de acceso en GenBank es AY266157 (Stewart y col., 2003), la diferencia consistió en una sustitución en la posición 476 (T sustituyó a C) y con *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 cuyo número de acceso en GenBank es AY633838 (Marin y col., 2004), la diferencia radicó en la posición 474 (C sustituyó a T) y 476 (T sustituyó a C) (Figura IV.22).

	460	470	480	490	500
AY266157.1 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
AY633838.1 (449)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	T	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK35 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CK38 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	
CS67 (451)	GCGGTCGCGGCCGTTAAATCTTT	C	A	AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG	

Figura IV.22. Alineamiento de la región ITS de algunos aislamientos de *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina*

AY266157.1: *Cercospora sojina* isolate CS42 (Stewart y col., 2003)

AY633838.1: *Cercospora kikuchii* voucher BRCK 179 (Marin y col., 2004)

CK35, CK38 y CS67: aislamientos regionales.

A manera de resumen, en la tabla IV.7, se presentan el origen y los resultados de la caracterización molecular de las especies de *Cercospora* estudiadas durante el transcurso de esta tesis.

Tabla IV.7. Especies de *Cercospora* aisladas de soja. Origen y resultados de la caracterización molecular

Aislamiento ^a	Región ^b	Localidad	Cultivar - varietal	Campaña	Cluster con ISSR ^c (GTG) ₅	Cluster con RAPD ^d	Sitio variable en las secuencias
CK14	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 C _{2b} "	1a	T-T
CK15	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 C _{2b} "	1e	C-C
CK16	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 C _{2b} "	1e	C-C
CK17	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 C _{2b} "	5	C-C
CK18	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 C _{2b} "	5	C-C
CK19	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 C _{2b} "	5	C-C
CK20	R1	Margarita	TJ 2070	2005-2006	 C _{2b} "	6	T-C
CK21	R1	Margarita	TJ 2070	2005-2006	 B _{2b}	7	C-C
CK22	R1	Margarita	TJ 2070	2005-2006	 B _{2b}	7	C-C
CK23	R3	San Justo	A 4910	2005-2006	 C _{2b} '	1a	T-C
CK24	R1	Margarita	TJ 2070	2005-2006	 C _{2b} "	6	C-C
CK25	R2	G. Crespo ^e	A 8000	2005-2006	 B _{2a}	1g	T-T
CK26	R4	Emilia	A 5409	2005-2006	 B _{3b}	6	T-C

^aCK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente. ^b Regiones RiiA. ^c ISSR (GTG)₅: "Inter Simple Sequence Repeats" obtenido con (GTG)₅. ^dRAPD: "Random Amplified Polymorphic DNA". ^eG. Crespo: Gobernador Crespo. ^fs/d: sin datos.

Los círculos de colores indican los grupos de los aislamientos relacionados genéticamente. Figuras IV.4 y IV.7 y Tabla IV.4.

Aislamiento ^a	Región ^b	Localidad	Cultivar - varietal	Campaña	Cluster con ISSR ^c (GTG) ₅	Cluster con RAPD ^d	Sitio variable en las secuencias
CK27	R2	G. Crespo ^e	A 8000	2005-2006	 C _{2b} ^{''}	2	C-C
CK28	R5	Esperanza	A 7636	2005-2006	 C _{2b} ^{''}	2	C-C
CK29	R5	Esperanza	A 7636	2005-2006	 C _{2b} ^{''}	1f	C-C
CK30	R5	Esperanza	A 7636	2005-2006	 C _{2b} ^{''}	3	C-C
CK31	R5	Esperanza	A 7636	2005-2006	 B _{3a}	3	C-C
CK32	R5	Esperanza	A 7636	2005-2006	 B _{3b}	1b	T-C
CK35	R3	San Justo	RA 514	2006-2007	 B _{2b}	1a	C-T
CK36	R5	Esperanza	RA 626	2006-2007	 C _{2b} ^{''}	8a	C-C
CK37	R1	Margarita	ASGROW. 8000	2006-2007	 C _{2b} ^{''}	8a	C-C
CK38	R1	Margarita	ASGROW. 8000	2006-2007	 B _{2b}	1h	C-T
CK39	R6	Villa Trini- dad	A 6401	2006-2007	 B _{2a}	8b	T-T
CK40	R1	Margarita	ASGROW. 8000	2006-2007	 B _{3b}	8b	T-T
CK41	R6	Villa Trini- dad	A 6401	2006-2007	 B _{3b}	8c	T-C
CK42	R4	Emilia	RA 703	2007-2008	 C _{2b} [']	8c	T-T

^aCK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente. ^b Regiones RiiA. ^c ISSR (GTG)₅: "Inter Simple Sequence Repeats" obtenido con (GTG)₅. ^dRAPD: "Random Amplified Polymorphic DNA". ^eG. Crespo: Gobernador Crespo. ^fs/d: sin datos.

Los círculos de colores indican los grupos de los aislamientos relacionados genéticamente. Figuras IV.4 y IV.7 y Tabla IV.4.

Aislamiento ^a	Región ^b	Localidad	Cultivar - varietal	Campaña	Cluster con ISSR ^c (GTG) ₅	Cluster con RAPD ^d	Sitio variable en las secuencias
CK43	R4	Emilia	A 7118	2007-2008	B _{2a} 	8b	T-T
CK44	R4	Llambi Campbell	A 8000	2007-2008	A 	8a	C-C
CK45	R6	Villa Trinidad	A 8000	2007-2008	C ₁ 	8d	T-T
CK46	R6	Villa Trinidad	A 6401	2007-2008	C _{2b'} 	8d	C-C
CK47	R5	Esperanza	A 6411	2008-2009	B _{1a} 	1h	T-T
CS48	R2	G. Crespo ^e	s/d ^f	2008-2009	C _{2a'} 	9	T-T
CK49	R1	Margarita	A 8000	2008-2009	B _{3a} 	1g	C-C
CK50	R2	G. Crespo ^e	NA 7708 RG	2008-2009	C _{2a''} 	9	T-C
CK51	R2	G. Crespo ^e	s/d ^f	2008-2009	C ₁ 	4b	C-C
CK52	R3	San Justo	A 4910	2008-2009	C _{2a''} 	1f	T-C
CK53	R3	San Justo	A 4910	2008-2009	C _{2a''} 	1f	T-C
CK54	R3	San Justo	A 6401	2008-2009	B _{1a} 	1d	T-T
CS55	R4	Emilia	MAN 4355	2008-2009	B _{1b} 	1c	T-C
CK56	R5	Esperanza	A 6411	2008-2009	B _{1b} 	4a	T-C

^aCK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente. ^b Regiones RiiA. ^c ISSR (GTG)₅: “Inter Simple Sequence Repeats” obtenido con (GTG)₅. ^dRAPD: “Random Amplified Polymorphic DNA”. ^eG. Crespo: Gobernador Crespo. ^fs/d: sin datos.

Los círculos de colores indican los grupos de los aislamientos relacionados genéticamente. Figuras IV.4 y IV.7 y Tabla IV.4.

Aislamiento ^a	Región ^b	Localidad	Cultivar - varietal	Campaña	Cluster con ISSR ^c (GTG) ₅	Cluster con RAPD ^d	Sitio variable en las secuencias
CK57	R3	San Justo	A 4910	2008-2009	C _{2a} " 	1g	T-C
CK58	R2	G. Crespo ^e	RA 725	2008-2009	C _{2a} " 	4b	T-C
CK59	R5	Esperanza	A 6401	2008-2009	C _{2b} " 	1c	C-C
CS60	R5	Esperanza	RA 633	2008-2009	B _{3b} 	4a	T-C
CS61	R5	Esperanza	NA 6126 RG	2008-2009	C _{2a} " 	4a	T-C
CS62	R5	Esperanza	A 6410	2008-2009	B _{3b} 	4a	T-C
CS63	R3	San Justo	A 4910	2008-2009	B _{3b} 	1a	C-C
CS64	R3	San Justo	RA 626	2008-2009	B _{3a} 	1c	T-C
CS65	R6	Porteña	s/d ^f	2008-2009	B _{3b} 	1c	T-C
CS66	R3	San Justo	A 6411	2008-2009	B _{2b} 	1d	C-C
CS67	R5	Esperanza	A 6401	2008-2009	C _{2b} " 	1h	C-T

^aCK y CS significan *C. kikuchii* y *C. sojina*, respectivamente. ^bRegiones RiiA. ^cISSR (GTG)₅: "Inter Simple Sequence Repeats" obtenido con (GTG)₅. ^dRAPD: "Random Amplified Polymorphic DNA". ^eG. Crespo: Gobernador Crespo. ^fs/d: sin datos.

Los círculos de colores indican los grupos de los aislamientos relacionados genéticamente. Figuras IV.4 y IV.7 y Tabla IV.4.

5. DISCUSIÓN

La prevención y el control de las enfermedades en las plantas es un desafío continuo para los productores. El ambiente complejo en el que los microorganismos perjudiciales interactúan con los hospedantes y el escaso conocimiento de la variabilidad y de la estructura genética de las poblaciones de los patógenos constituyen algunas de las causas del éxito limitado en el manejo de las enfermedades (Macías Figueroa y col., 2006).

Como ya se comentara, para analizar la diversidad de patógenos de plantas a nivel del genoma se han aplicado diferentes métodos moleculares basados en la técnica de PCR, entre los que se encuentran ISSR y RAPD (Bornet y Branchard, 2001; Becerra y col., 2007)

La técnica de ISSR-PCR, ha sido utilizada para estudiar este aspecto en hongos. Diferentes autores han estudiado la variabilidad genética en *Ascomycetes*, *Zygomycetes* y en otros fitopatógenos tales como son las especies de *Pyrenophora* (Crous y col., 1995; Longato y Bonfante, 1997; Singh y Hughes, 2006).

En este trabajo, se utilizaron tres oligonucleótidos diferentes (CAC)₅, (GTG)₅ y (GACA)₄. Con los dos primeros se generaron más grupos y subgrupos y de estos dos, (GTG)₅ fue el que generó menor cantidad de bandas no obstante lo cual, los perfiles obtenidos se utilizaron para distribuir espacial y temporalmente las genoviedades (Castillo y col., 2010; Tiago y col., 2011). Cai (2004), en su trabajo de tesis, reportó que este oligonucleótido producía un perfil de bandas reproducible y permitía detectar variabilidad entre aislamientos de *Cercospora*. Por su parte, Longato y Bonfante (1997) demostraron que este “primer”, en particular, era una herramienta confiable, sensible y técnicamente simple para el ensayo de la variabilidad genética en hongos que pertenecen al grupo de las micorizas, detectando un alto grado de polimorfismo en los perfiles obtenidos, por lo que concluyeron que sería de gran utilidad para la comparación entre especies.

Los aislamientos de *Cercospora* aquí estudiados, mostraron una escasa asociación entre el origen geográfico de los mismos y la diversidad genética. Por ejemplo, CK14 aislado de la Región 4 fue genéticamente similar a CK27 de la Región 2. Por otro lado, algunos aislamientos provenientes de la misma región fueron genéticamente distintos entre ellos. Es así como CK18 y CK26, provenientes de la Región 4 no fueron agrupados juntos. Este hecho confirmó que los aislamientos de *Cercospora* presentaron una amplia diversidad genética dentro y entre regiones, lo cual se vio reflejado cuando los datos obtenidos se representaron sobre el mapa de la zona estudiada.

Con la técnica de RAPD se detectó, en la población de *Cercospora* aislada de cultivares de soja de la provincia de Santa Fe, un mayor grado de diversidad entre los aislamientos, corroborando la variabilidad fenotípica observada previamente en los medios de cultivo. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos por el grupo de trabajo dentro del que se enmarcó esta tesis, Lurá y col. (2007), González y col. (2008), Latorre Rapela y col. (2011) y los comunicados por Almeida y col. (2005) y Cai y col. (2004) (2009) para aislamientos obtenidos a partir de soja cultivada en Brasil y Louisiana.

Dos de los 20 oligonucleótidos utilizados en RAPD, no amplificaron satisfactoriamente. Se detectaron muy pocas bandas con OPA-06, lo que podría explicarse si se tiene en cuenta que las regiones de ADN amplificadas de manera eficiente deben estar situadas entre dos espacios complementarios a los cebadores y separados por una distancia de unos pocos kb (Williams y col., 1990). En las especies de *Cercospora* en estudio, los sitios complementarios de este oligonucleótido pueden ser menos frecuentes, lo que hizo la amplificación de fragmentos técnicamente imposible. OPA-02, por el contrario, mostró un patrón con numerosas bandas por lo que, cada vez, su lectura e interpretación resultó muy difícil.

Los agrupamientos genéticos formados con ISSR y RAPD, en general, no fueron coincidentes. Sin embargo, existieron algunos aislamientos que se encontraron fuertemente relacionados. Tal es el caso de CK21 y CK22 cuya similitud se detectó con los tres oligonucleótidos utilizados en ISSR y por RAPD. Un caso particular se dio con CK30 y CK31. Su similitud fue determinada por RAPD y con (CAC)₅ y (GACA)₄; sin embargo, con (GTG)₅ quedaron muy alejados, a pesar de haberse reiterado el ensayo.

De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, las poblaciones argentinas de *C. kikuchii* y *C. sojina* son fenotípica, genotípica y geográficamente variables, constituyendo un grupo muy heterogéneo.

Estos hallazgos no son sencillos de explicar. No obstante, es imprescindible tener presente que este hongo se transmite a través de las semillas de soja y que por ser necrotrófico, puede sobrevivir en el rastrojo. Entonces por un lado, se debe tener en cuenta que durante la última década, en Argentina, se produjo un incremento en la superficie de producción de soja por lo cual el tráfico de semillas de áreas de cultivo tradicional a áreas nuevas se vio aumentado (SAGPyA, 2003). Por otra parte, la supervivencia del mismo en el rastrojo, transforma a éste en la principal fuente de inóculo primario para la epifitía de la campaña siguiente (Sillón, 2007; Cai y col., 2009).

Según Pujol Vieira dos Santos y col. (2002) y Stenglein y Ballati (2006), muchos factores podrían afectar el análisis del polimorfismo, por ejemplo, las variantes intraespecíficas de un agente patógeno, el número de muestras seleccionadas para el análisis, el flujo genético entre poblaciones, la adaptación del medio ambiente y la presión selectiva y la migración.

Otros factores a considerar que podrían explicar la variabilidad genética detectada serían los cambios en el ADN que ocurren dentro de las poblaciones de hongos filamentosos. Según lo planteado por McDonald (1997), estos cambios se deben a mutaciones, deleciones, sistemas de apareamiento, migración o flujo de genes y selección de la población, ya que no se conoce la reproducción sexual de la mayoría de las especies de *Cercospora* incluyendo *C. kikuchii* (Cai y Schneider, 2008). Da-boussi y Capy (2003) y Cai y col. (2009) por otro lado, afirman que los cambios mediados por elementos transponibles, asociados con transposición y recombinación, proporcionan un amplio rango de variación genética, lo cual es útil para la natural adaptación de la población a los cambios del medio ambiente y a la interacción con otros organismos.

En cuanto a las cepas *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715, depositadas en la Colección de Cultivos pertenecientes al National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Japón, no se han encontrado datos respecto a su fuente de aislamiento y localidad o país de origen. La baja similitud que presentaron, con relación a los aislamientos regionales, podría ser atribuida a que provienen de regiones naturalmente diferentes a las seleccionadas para este trabajo.

Una de las razones más importantes por las que el empleo del ADNr es útil en estudios taxonómicos y filogenéticos, es la desigual evolución que presentan las diferentes regiones que lo componen. Las zonas espaciadoras ITS1 e ITS2 son las más variables y son de utilidad para organismos que se encuentran próximos en la filogenia (Martínez Culebras, 1999; Siboe y col., 2000), permitiendo diferenciar especies si se combina con la técnica de RFLP. Al respecto, Balajee y col. (2009) sostienen que esta combinación de metodologías, se podría emplear para la identificación de especies del gé-

nero *Aspergillus*, así como para la mayoría de las especies de *Mucorales* y para algunas del género *Fusarium*.

Sin embargo, en este trabajo de tesis el alto grado de similitud del fragmento ITS-PCR y de los patrones RFLP observados entre las especies *C. kikuchii* y *C. sojina* aisladas, indicarían una alta homología en la secuencia de la región ITS; resultados semejantes fueron obtenidos por Okori y col. (2004) cuando aplicaron RFLP-PCR en aislamientos de *Cercospora sorghi*.

En cuanto a la secuenciación del fragmento ITS amplificado por PCR, solo permitió confirmar que los hongos analizados, pertenecían al género *Cercospora*, no encontrándose diferencia entre las dos especies en estudio (*C. kikuchii* y *C. sojina*), ya que los porcentajes de identidad entre ellas y las depositadas en la base de datos GenBank fueron del 99-100%. La diferencia de nucleótidos del fragmento ITS del operón ribosomal entre todas las secuencias estudiadas, varió entre 0 y 2.

Resultados similares fueron informados por Goodwin y col. (2001) donde el número de nucleótidos diferentes entre especies, para 12 taxones del grupo monofilético de *Cercospora*, estuvo comprendido entre 0 y 14, de los cuales 5 taxones (*Cercospora apii*, *C. beticola*, *C. hayi*, *C. nicotianae* y *C. sorghi* var. *maydis*) presentaron secuencias ITS idénticas. Además, encontró que el promedio de nucleótidos diferentes entre tres aislamientos de *C. kikuchii* fue de 2 a 7, mientras que otros autores detectaron en 12 aislamientos de *C. kikuchii* entre 0 y 3 nucleótidos diferentes en sus secuencias (Goodwin y col., 2001).

Estos estudios, al igual que lo reportado por Somai y col. (2002), han revelado que la mayoría de las especies de *Cercospora*, en particular de los miembros del complejo *Cercospora apii* son idénticos o están estrechamente relacionados (Groenewald y col., 2005).

Una posible explicación para estos resultados, es que todas las especies de *Cercospora* comparten un ancestro común, relativamente reciente, que adquirió la capacidad de producir cercosporina. Esta capacidad le permitió adaptarse rápidamente y expandir su rango de hospedantes, lo que explicaría la aparición de un gran número de especies estrechamente relacionadas, algunas de ellas con su secuencia idéntica en hospedantes muy divergentes (Goodwin y col., 2001; Joshi y col., 2006).

En su revisión del género *Cercospora*, Crous y Braun (2003) se refirieron a 281 especies morfológicamente indistinguibles para el complejo *C. apii* “sensu lato”. Los análisis genéticos recientes de *Cercospora* spp. se han basado principalmente en secuencias de los ITS y del gen 5.8S del ARN ribosomal. Estos estudios han revelado que la mayoría de las especies de *Cercospora*, en particular los miembros del complejo *C. apii*, son idénticas o están fuertemente relacionadas. A juzgar por su similitud morfológica, así como por su demostrada infectividad cruzada, es probable que deban ser consideradas sinónimos (Groenewald y col., 2005).

Los métodos tradicionales para la discriminación entre especies de *Cercospora* se han basado principalmente en la morfología, analizando características tales como tamaño y forma de conidios y color de la colonia. Sin embargo, como se explicó en el capítulo III, los hongos pertenecientes a este género, así como otros géneros similares, presentan una gran dificultad para esporular en medios de

cultivo artificial (Yeh y Sinclair, 1980; Cadwell, 1994; Ávila de la Calle y col., 2004), lo cual constituye un problema para la identificación de los mismos.

La aplicación de los marcadores moleculares en la taxonomía de los hongos promete aclarar las relaciones entre los distintos taxones que se encuentran muy relacionados a causa de los estudios morfológicos. Esto es de especial importancia debido a que, de esta manera, se puede entender la identidad y complejidad genética de una población de patógenos que afecta un hospedante en particular y asimismo es esencial para formular estrategias efectivas de manejo de enfermedades.

CAPÍTULO V

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN PRECOZ

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

Las enfermedades de las plantas tienen una notable importancia en la agricultura moderna, no sólo porque poseen el potencial de destruir enteramente las cosechas, sino porque aún en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen, en forma crónica, el rendimiento de la mayoría de los cultivos y obligan a tomar medidas de control que aumentan los costos de producción además de afectar la calidad y durabilidad de los productos cosechados (Macias Figueroa y col., 2006).

Tradicionalmente los programas de control de las diversas enfermedades en los distintos entornos agroecológicos, se han desarrollado de forma empírica. Esto ha conllevado a menudo, a ineficacia o a efectos negativos, como por ejemplo, problemas de contaminación por plaguicidas o de inserción en las poblaciones, de patógenos resistentes a aquellos. El desarrollo científico de la Fitopatología y ciencias afines posibilitó, en las últimas tres décadas, el planteo de estrategias de control científicamente correctas y técnicamente eficaces (Macias Figueroa y col., 2006).

Uno de los requerimientos más importantes para el manejo apropiado de una enfermedad es la identificación correcta del agente fitopatógeno, a fin de iniciar un tratamiento adecuado lo más temprano posible (Macias Figueroa y col., 2006).

Se puede decir entonces, que un diagnóstico oportuno detecta al agente causal de un evento patológico y es fundamental para el manejo del problema. Genera medidas de control efectivas, optimización de los recursos, reducción de los efectos negativos en el medio ambiente y a la vez origina información respecto de la interacción patógeno - hospedante. Según Pupiro y Malagón Rodríguez (2003), el diagnóstico de las enfermedades, de forma rápida y precisa, evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos como plaguicidas.

Como ya se comentó en el Capítulo III, en la identificación de las especies fúngicas mediante la taxonomía clásica se utilizan, casi exclusivamente, caracteres morfológicos (Hawksworth y col., 1996). Estos métodos presentan la necesidad de cultivar los hongos en diferentes medios, la observación de características externas macroscópicas (coloración, textura y diámetro de la colonia) y de estructuras microscópicas (ornamentación y tamaño de los conidios, longitud y ancho de las métulas y fialides). Además, son laboriosos, requieren varias semanas para su observación y análisis, son difíciles de estandarizar y han de ser practicado por personal especializado en taxonomía (Crous y col., 2009; González Salgado, 2010). Por todo ello, el uso exclusivo de esta metodología ha sido cuestionado en los últimos años.

Sin embargo, existen hoy en día como producto del avance de la biotecnología, nuevas técnicas que están disponibles para complementar o reemplazar los procedimientos de laboratorio tradicionales, de forma de acelerar la obtención de resultados y permitir un diagnóstico más temprano, ejemplo de ellas son las inmunoquímicas (ELISA) y las moleculares (PCR) (Macias Figueroa y col., 2006). Las enfermedades causadas por microorganismos pueden ser diagnosticadas por medio de la identificación de una característica única del organismo, tales como su material genético o una proteína.

La técnica de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático. Se basa en la detección del antígeno (Ag) o del anticuerpo (Ac), inmovilizado sobre una fase sólida y mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción; la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima, cuyo producto coloreado puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene las propiedades de un inmunoensayo ideal: es robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre (Pérez Pérez y Pérez Sevilla, 2009).

Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA, todas basadas en el principio anteriormente descrito. Cuando el analito es un antígeno puede detectarse uniéndolo a la fase sólida y ser revelado específicamente mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y uno secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto) (Figura V.1).

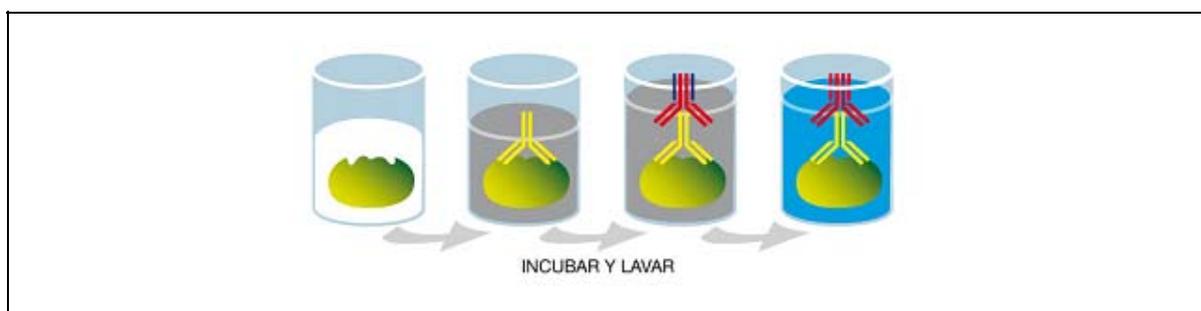


Figura V.1. Ilustración de la técnica de ELISA indirecto

Otra posibilidad es fijar a la fase sólida, un anticuerpo específico que capture el antígeno y luego utilizar un segundo anticuerpo para reconocerlo de manera específica (ELISA “sandwich”). Si este segundo anticuerpo está marcado con una enzima, es revelado en forma directa (ELISA “sandwich” directo), mientras que si este segundo anticuerpo es reconocido mediante un tercer anticuerpo marcado, el ensayo es indirecto (ELISA “sandwich” indirecto) (Figura V.2).

En ambos métodos, la reacción enzimática puede ser detectada espectrofotográficamente con un lector de ELISA (Enriquez Jiménez, 2009).

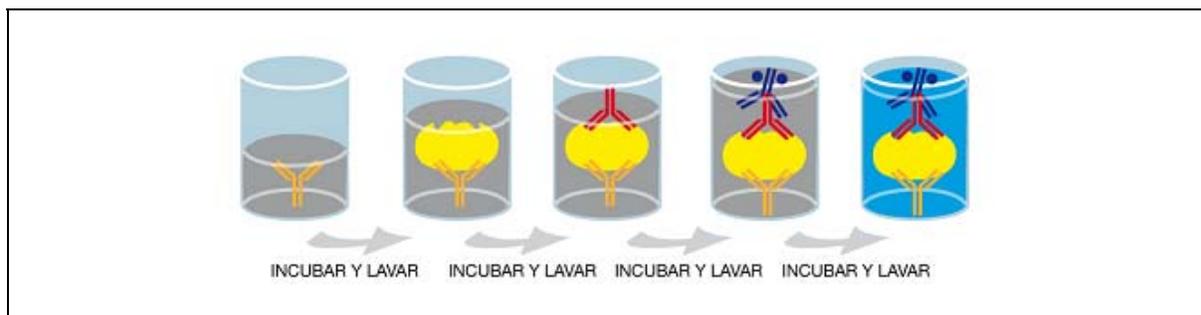


Figura V.2. Ilustración de la técnica de ELISA “sandwich” indirecto

Para hacer el ELISA más versátil y aplicable al diagnóstico de un gran número de muestras se ha desarrollado otro método sobre base sólida, el Dot-ELISA o el Dot blot (Pappas y col., 1983; Ferrer Gual, 2008). Es un ELISA rápido que utiliza como soporte sólido papel de nitrocelulosa, que se caracteriza por su excelente capacidad para adsorber proteínas (Towbin y col., 1979). El antígeno (recombinante o sintético), en general se adsorbe pasivamente (“blotting”) al soporte en forma de gota (“dot”). Este inmunoensayo, es una prueba de diagnóstico económica y de fácil ejecución en laboratorios de baja complejidad (Agudelo-Flórez y Palacio, 2009) ya que genera un precipitado coloreado insoluble que permite una lectura visual de la reacción (Figura V.3).

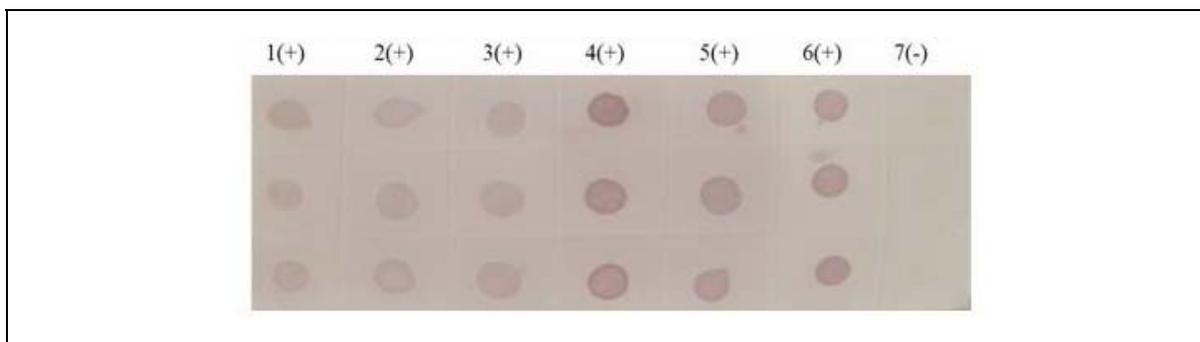


Figura V.3. Resultado del ensayo de Dot-ELISA

Fuente: Wang y col., 2012

Otra variante de la técnica es el ELISA de inhibición. En este tipo de ensayo se realiza una primera fase (fase de inhibición), en la que las proteínas de la muestra se incuban con una cantidad conocida de anticuerpos específicos frente a los antígenos de interés. Al finalizar esta etapa se tienen por una parte, los complejos antígeno-anticuerpo recién formados y por otra, un número determinado de anticuerpos libres y el resto de proteínas de la muestra. Para la segunda fase de este análisis (fase de reacción) se prepara una placa de ELISA donde se inmovilizan moléculas estandarizadas del antígeno correspondiente en una proporción conocida. En sus pocillos se añade la mezcla resultante de la etapa anterior. Los anticuerpos que quedaron libres reaccionan ahora con los antígenos fijados en el soporte. Su presencia se revela con la adición de un segundo anticuerpo ligado a una enzima y del reactivo adecuado para la formación de productos coloreados en el medio de reacción. La cantidad de antígeno en la muestra es inversamente proporcional a la intensidad de color desarrollada. La Figura V.4 representa las etapas descritas anteriormente (García Iglesias y col., 2009).

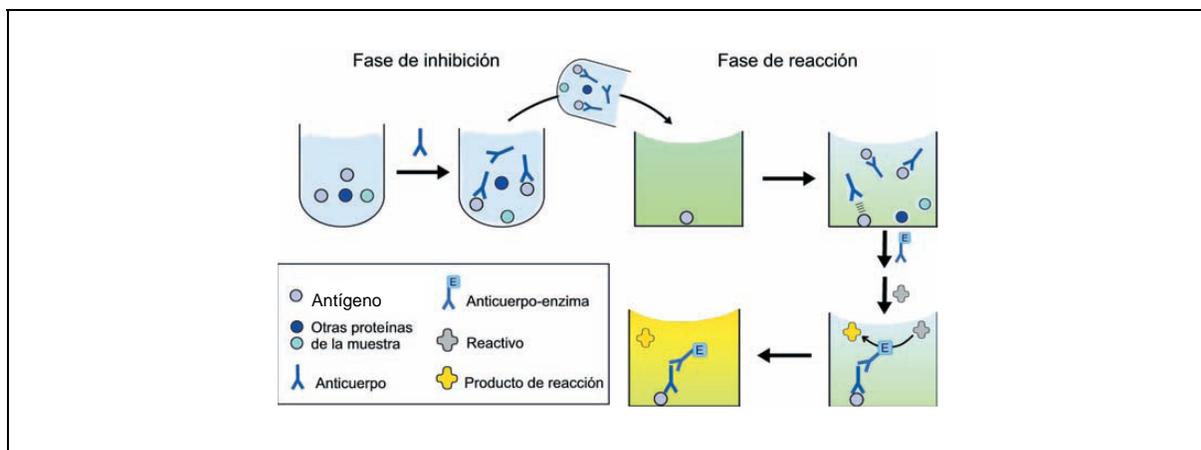


Figura V.4. Ilustración de la técnica del ELISA de inhibición

Fuente: García Iglesias y col., 2009

Los anticuerpos son moléculas producidas por el sistema inmune de mamíferos, que pueden usarse para identificar organismos o sustancias invasivas. Cuando éste puede reconocer a un antígeno específico asociado con un patógeno de planta, entonces puede utilizarse como herramienta de diagnóstico. El empleo de la tecnología de anticuerpos está bien establecido en el diagnóstico médico y el interés en usarla en patologías de plantas se incrementó en la última década.

Existen diferentes vías para la producción de anticuerpos de uso diagnóstico. Una de ellas es la de los anticuerpos policlonales, que se originan al inyectar un antígeno derivado, por ejemplo de un patógeno, a un animal usualmente un conejo y luego de un tiempo extraerle la sangre.

Aunque los anticuerpos policlonales se han utilizado con éxito para detectar patógenos de plantas, no siempre son lo suficientemente específicos, solo se generan en cantidades limitadas y la especificidad puede variar de un lote a otro. Para superar este problema, muchos autores han propuesto utilizar antígenos recombinantes para mejorar la especificidad y la sensibilidad de la técnica (Aguirre y col., 2006).

La aparición de esta nueva tecnología, ha permitido desarrollar en los últimos años antígenos diseñados y estructuralmente modificados que le otorgan mejores características inmunológicas asegurando, de esta manera, una mayor especificidad de los anticuerpos obtenidos (Rodríguez Rivero y Benito, 2001).

Por otro lado, los avances en las técnicas de análisis de ADN han conducido al desarrollo de nuevos métodos para la caracterización y diferenciación de cepas tanto de hongos filamentosos como de otros organismos. La principal ventaja de los métodos de identificación basados en el ADN sobre los métodos de identificación fenotípica es que no están influenciados por las condiciones ambientales (Ness y col., 1993) y no dependen de la interpretación, a veces subjetiva, de características morfológicas.

Como alternativa a la identificación fenotípica se ha descrito la identificación genotípica. En ese sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una opción importante (Vilchez y

Alonso, 2009). Es una técnica específica que genera ilimitadas copias de cualquier fragmento de ADN, es fácil de realizar y el diagnóstico por PCR resulta más rápido que los métodos tradicionales para aislar el patógeno (Schaad y Frederick, 2002). Además, debido a su alta sensibilidad y especificidad requiere muy poca cantidad de ADN molde, permitiendo detectar moléculas diana en mezclas complejas. Por ello, está siendo utilizada para la detección y en algunos casos cuantificación directa de especies micotoxigénicas (Edwards y col., 2002; Ward y col., 2004; Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2008).

Se espera que en un futuro cercano, el diagnóstico de patógenos enfrente una nueva revolución tecnológica, la que permitirá una detección ilimitada de agentes por ensayo, con gran sensibilidad, exactitud y rapidez. Estos avances serán posibles gracias a los actuales esfuerzos que se desarrollan en el área de la investigación genómica y de la bioinformática (Fernández Olmos y col., 2010).

1.2. MÉTODOS DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Una de las actividades más importantes de la fitopatología es el trabajo en el laboratorio, ahí se realiza la investigación básica, se aíslan e identifican patógenos y se produce el inóculo para inducir la enfermedad en forma artificial en el campo o invernadero, en apoyo a los programas de mejoramiento genético.

El desarrollo de métodos de inoculación artificial bajo condiciones controladas ha sido una de las principales prioridades en las investigaciones con hongos fitopatógenos, ya que evita las fluctuaciones típicas de los ambientes naturales aún cuando, en éstos, se favorezcan las condiciones óptimas de infección (Bernal y col. 2009).

Esta metodología se lleva a cabo con diferentes propósitos, como ser: demostración de los postulados de Koch, incrementos de inóculo, caracterización de sintomatología, pruebas de selección genética y estudios de epidemiología. Generalmente se realiza en plántulas, pero también puede llevarse a cabo en otros estados fenológicos (Gilchrist-Saavedra y col. 2005).

Se deben tener en cuenta ciertos aspectos, como por ejemplo: el cultivo artificial del patógeno, las condiciones de aplicación en función de los ciclos del hospedante y del parásito, momento de dicha aplicación (planta joven o adulta, hora del día, con o sin riego, con resto de cosecha o solo cultivo artificial del parásito) y número de tratamientos (Cubero, 2003).

Entre las ventajas que presenta, permite un mejor control en el manejo del organismo, seguridad en la evaluación de los síntomas, certeza de que no ocurra interferencia con otros microorganismos como sucede en el campo y rapidez en evaluar el material.

2. OBJETIVOS

- Desarrollar métodos de detección precoz de especies de *Cercospora* en plantas de soja.

- Implementar un modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*.
- Evaluar las técnicas de diagnóstico desarrolladas utilizando las plantas del modelo experimental.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES

3.1.1 CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES PLASMÍDICOS

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* DH5 α y *E. coli* BL21(DE3). Los cultivos líquidos de las bacterias se realizaron en medio Luria-Bertani (LB), a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y en agitación a 180 rpm (Sambrook y col., 1989).

Para periodos cortos de conservación de las bacterias, se realizaron cultivos en estrías en cajas de Petri que contenían medio LB-agar 2% y se mantuvieron a 4°C . Para conservar las cepas durante periodos mayores de tiempo, se hizo crecer un cultivo a partir de una colonia aislada en caldo LB durante toda una noche a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Se transfirieron 500 μL del cultivo a un tubo Eppendorf de 1,5 mL que contenía un volumen igual de LB-glicerol 30% (v/v). Se mezcló y conservó a -80°C (Sambrook y col., 1989).

El vector plasmídico utilizado para el clonado del producto de PCR en la cepa *E. coli* DH5 α fue pGEM-T Easy (Figura V.5) y el usado como sistema de expresión en la cepa *E. coli* BL21(DE3) fue el pET-32a (Figura V.6). Las características y referencia de los mismos se detallan en la Tabla V.1.

Tabla V.1: Características y referencia de los vectores plasmídicos

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T Easy	3018 pb, resistencia Am, promotor T7, linealizado, extremos 3' con agregado de T. Este vector fue utilizado para el subclonado de productos de PCR en la cepa <i>E. coli</i> DH5 α .	Promega®, EE.UU.
pET-32a	5900 pb, resistencia Am, promotor T7lac, produce proteínas fusionadas a 6 histidinas y a la proteína tiorredoxina (TRX), de 20,4 KDa, lo que permite su purificación en columna de NTA-Ni $^{2+}$. Este vector fue utilizado como sistema de expresión en la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3).	Novagene, EE.UU.

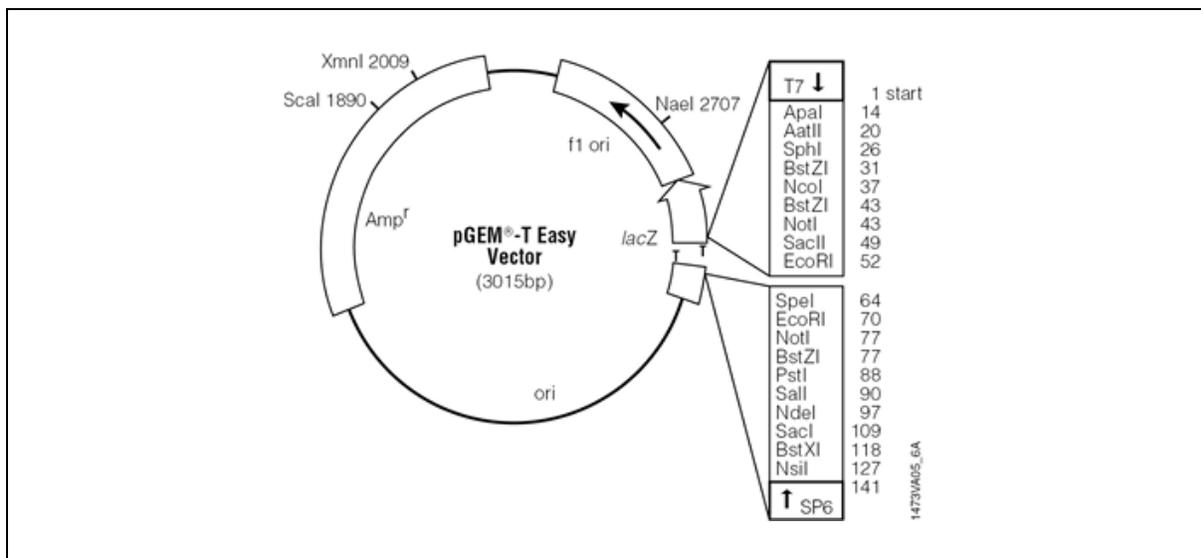


Figura V.5. Vector de clonado pGEM-T Easy

Fuente: <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cloning/>

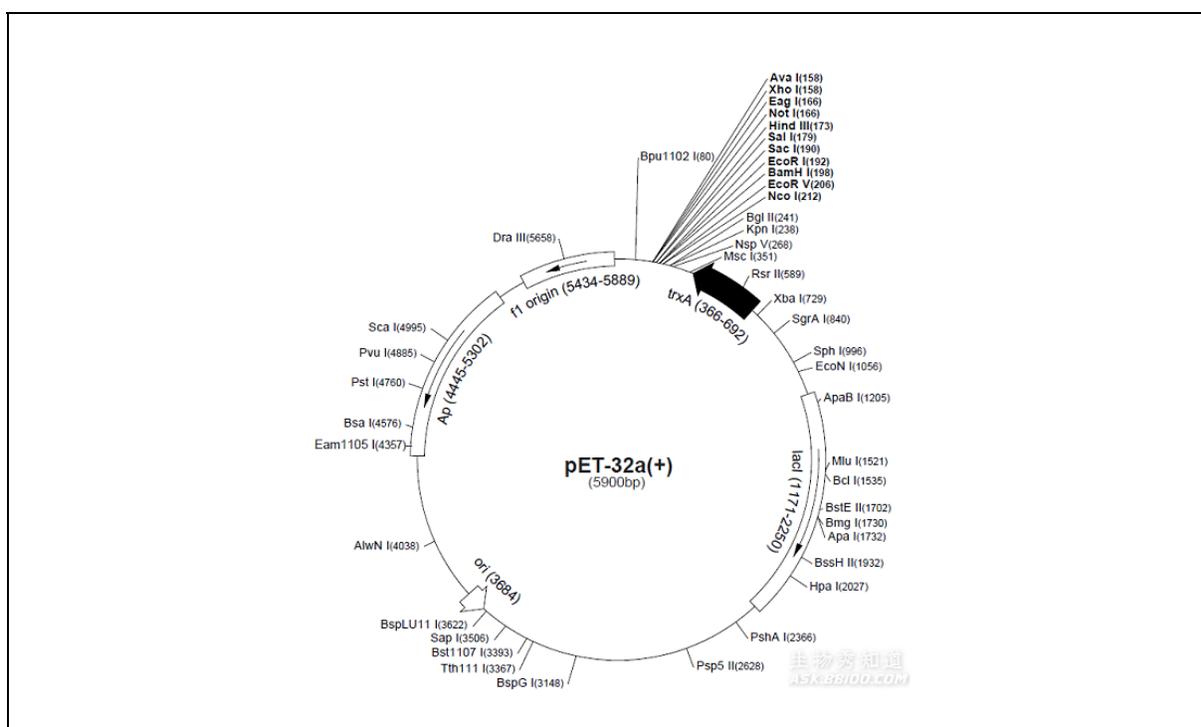


Figura V.6. Vector de Sistema de expresión pET-32a

Fuente: http://www.nordichardware.com/skrivelsen_img/506/vektor.jpg

3.1.2. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE PARA LA PORCIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA CFP (“CERCOSPORIN FACILITATOR PROTEIN”)

Con el fin de obtener una proteína recombinante específica del hongo *Cercospora kikuchii*, en una primera instancia se realizó una intensa búsqueda bibliográfica orientada a la identificación de anti-

genos no compartidos con otros microorganismos. La proteína que presentó estas características fue la CFP codificada por el gen *cfp* (*cercosporin facilitator protein*) (Figura V.7) y descrita por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Upchurch (Callahan y col., 1999).

```

1 atcgatgatac tgtgacagc cagcttgctc gtgcacactg gcgaggcagg ctataagata
61 ttgttgctct gcatccaagc aatgcccaga acctgggtgc actcatggca gaggtgtgta
121 agacctaatg gctaatacct gcactacaca ggtggggaga acgcttcggc ctctttcgaa
181 cagcggagtg acagtgcgca ggcttatgtg ctccaccttg ctgggctcga cccatcttct
241 cggagcaaga cccacctcaa tctatcgatg aaagatgtga acagctcga gcccaagatc
301 aagtcgagga cctgtggcac ttttagtgcc aaacgtgcca tcattcctgg aatcaccaga
361 tactgcaaca gtatctcggc cgtgggaacc aaaaggctgt acggatatgt tcggaatact
421 ctgctgtgcc catgcatcac ggcttagagg catccacggt gcgggtctgg ggaccaaggc
481 aaagccagac aataggctcg caggtctcta tcatcatcta cgagccatcc gggatgggag
541 actctttggc gaggtagcgt gaagcagatg atgagcttgg aatcgttggc atgcctaata
601 tgaagcgcg cggttgtgct gtccatatta gcccaacagc taataactcg accatgacag
661 agttactggg cttgataact tgtagcggta tgtcctgcac tgccaacgat cttcctcgcc
721 acacgcttca tttccgaaca tttcttcgct acatctatct tctttggcac acgcaagacg
781 ttgagctctc catgtattcg atcgtaagta cctgtcctga gggcatatat tgcgcccgtc
841 atgctaagc catagacgca tttgaaaacc gtgccattca ttcattgggc gaaaggcttg
901 cggcggggcc acctagctcg caaagcttgg gcccgcgaa catagctcgt atgtcctcga
961 gtgcccgact cagacggcca cgtccgcccgt atactgtttt cgatctacgg caatagggtc
1021 gtcacgaaa aatcgcaggg agatcgttca gttcgcgcaa ttccacgtgg taggtgggcc
1081 gctgatagtc tcagaaaaga aacataaaga ggtaggggccc gtcgaatgag ttcctcata
1141 gcagctgga cgggctactt tccacactt gacaatgacg agcccagcg gatcaacgca
1201 tactgataca gagtctcacg acgtcgtaaa gagcgactcg gaatcgaaac tggaaactgga
1261 gcacagcgat tcggataatc aagatgagaa gtccaacgct aagttggcgg aagctcctga
1321 agccaagcca gaagaagatg aagaactcaa tgatcaaggg gagaggtaca tctgcccgtg
1381 gcctctggta tttctcttgt tagccatggg ctccacagtc ttcatgtcgt ctttgagcaa
1441 caccatcac agcacagcaa tcccggccat cacaacagcg ttcaatagta cccgagatata
1501 tggctggtag aactctggag aagctcttgc agccactgac ttccaactac cttcggggc
1561 agcgtatctc ttgatggacc tgaagtgacc tttcctcgtc tcaactggct tatactgat
1621 cggcagcctg atctgtggtg tggcaaaactc ttctgagctt ctcatttttg gccgatcgat
1681 tgcaggagtt ggcaacgctg gcgtcttcgc tggcgtgttc atcattattg ctcgaaacgt
1741 tcctctggcg aaacgcgcac tttatgctgg attggttggg gogacttttg ccattgtcgc
1801 tgtgctggga cctgtcctgg gtggtatctt tactgaccgt attagctgga ggtgggtgtt
1861 gtacagtaag tctctagaac ccgtgcactt tattccgttc attgacactt ttcaacagtt
1921 aacctgccta tcggagctgt acgtgtcgca atcatcatat tctcctctcc atctcgtcct
1981 ggcgaaaagg cagcagaagt caaggacctg tccctggggc agttcttctt aaagctcaat
2041 ccttttgggt cggctctcct actcggttcc ctgacgtgct ttttctcgc cctacagtg
2101 ggcggcggcg aataaccgtt gagtgcgtgt cgtgtcgttg ctgtaactgg ggtcttcgcc
2161 gtcagcttca tcggatggct ggtctgcaa tacttccaag gcgacgaagc cacactgcca
2221 tttaacgttg caaaacagcg taccgttggg ggtgcctcta tctacactct gcatctgagc
2281 gccgcatctg gactcgtcat atactatctg cctctctggt gagttgattc atgagcatgc
2341 actgggctca cgaactgaca ttatgaaggt ttcaagcagt acgatctgac agtgccgaag
2401 ctgctggtct caagcaactt ggcacgtcga tctcgtcac tctcgtcga atgacagctg
2461 gcgggtgctg tgtaaaaata ggatattact atcctttcat ttacgccgga acggtcttat
2521 gcagatcgg ctctggcttg ctttacacga tcacactcga tacaccgcaa tgggatatgt
2581 aagtaatcga gctccgactg aatttgaaca tttctaacgc atgacagtat cggttattcg
2641 atcgtattcg ccattggaat cggcgtcagt ctgagcaat ccaacgttgc tgtccagact
2701 gtctcggcg atgctcagat accagcagga acaagcttgg ttctgttctg cggactactt
2761 ggatcagcaa tccccggacc catcggacag agtgtactcc agacaacact tgccagtagg
2821 ctagggactg aggtcgcaga gcaagcatat ggtgtaccg gagcaactga aatccgctca
2881 aagctcga caatttttgg agctggcaca cctgaagctc gagatgcctt tgacgctttc
2941 aacgatctc tgacgaagat cttcatggtc gcaatcatag tctcatgtct gaggcgtc
3001 cctcttcccc tcactgagct caagagcgtc aagcgtgaga aacgagacaa cgaagacg
3061 aaagaaggca agaaaactaa tgggacgacg cgtgagatag aagatccaga gaaggggag
3121 agtgacagaga tcgtgggcaa agcagtgatg gatgtggcat cagaccgagc gacgatttta
3181 tagacattgt agcgagctgt tacgactaac gcatgtacct aacagagtggt gtggctcaga
3241 ggcaatagag ctttgacgac ataataaacc aagaatttta atggctacga gtctctcaa
3301 aacctcggcg ga

```

Figura V.7. Secuencia del gen *cfp* de *Cercospora kikuchii* (Nº de acceso en GenBank: AF091042) (Callahan y col., 1999)

3.1.2.1. Extracción del ADN genómico y amplificación por PCR de un fragmento del gen *cfp*

La secuencia aminoacídica de la proteína CFP cuenta con 607 aminoácidos (Callahan y col., 1999) y la región antigénica se encuentra ubicada en la porción C terminal íntegramente codificada en el último exón del gen, por lo que se trabajó con ADN genómico para obtener un fragmento de la secuencia codificante de la misma (451 bp) mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

Se utilizó la cepa de referencia *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. Para la extracción de ADN total, se trabajó de acuerdo al protocolo de Lee y Taylor, (1992) con las modificaciones propuestas por Di Conza y col. (2007) (ver Capítulo IV).

Para diseñar los “primers” específicos que hibridaran sobre la secuencia correspondiente al último exón del gen *cfp* (2628 bp...>3150 bp) se utilizó el programa “DNASTart Sequence Analysis Software”.

Para aumentar las probabilidades de éxito en la obtención de regiones que generen una respuesta inmune humoral adecuada, se decidió clonar el fragmento seleccionado entero y también, en forma separada, las regiones N y C terminal del mismo. Para lograr estos tres fragmentos se hizo uso de un sitio *SacI* que se encontraba dentro de la secuencia elegida y permitía un clonado en fase de lectura en el vector pET-32a que se utilizó para la expresión. Se agregaron por lo tanto, los sitios de restricción *EcoRI* en el oligonucleótido “Forward” (PF) y *SacI* en el “Reverse” (PR). De este modo la secuencia obtenida, luego de ser clonada en el vector pGEM-TEasy vector, debía liberar 3 fragmentos diferentes: *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-SacI* y *SacI-SacI*.

Para la PCR, la mezcla de reacción se preparó para un volumen total de 50 μ L conteniendo: 2,5 mM de Cloruro de Magnesio, 125 μ M de cada uno de los dNTPs (Inbiohighway, Argentina), 1 μ M del “primer” PF, 1 μ M del “primer” PR, 5 U de *taq* ADN polimerasa (Inbiohighway, Argentina) y 20 ng de ADN por reacción. La amplificación fue llevada a cabo utilizando un “MJ Research Thermal Cycler” en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 3 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 53°C, 1 min a 72°C y 1 min a 95°C, 1 ciclo final de 5 min a 72°C.

El fragmento amplificado fue separado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % w/v con TBE 0,5x (Tris-borato 0,089 M, EDTA 0,002 M). El tiempo de corrida fue de 20 min, con un voltaje constante de 100 V. La tinción del gel se realizó con Bromuro de Etidio (Sambrook y col., 1989).

3.1.2.2. Purificación del ADN a partir de la banda específica de la secuencia *cfp*

Para purificar el fragmento de 451 bp, se corrió por electroforesis sumergida horizontal en un gel de agarosa al 1,5 %, 40 μ l del producto de PCR. Una vez identificada la banda, se cortó la porción del gel que la contenía y se purificó el fragmento utilizando un reactivo comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EE.UU), según instrucciones del fabricante.

El ADN purificado se corrió por electroforesis sumergida horizontal en un gel de agarosa al 1,5%, junto al marcador de peso molecular 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina), para determinar visualmente su concentración.

3.1.2.3. Ligación

Para realizar la reacción de ligación se mezcló el fragmento de ADN purificado con el vector plasmídico pGEM-TEasy, en una relación molar 3:1. A la mezcla se le adicionaron 2,5 μ L de buffer 10x de “T4 DNA Ligase” (Promega®, EE.UU.) para un volumen final de 5 μ L y 0,5 μ L de la enzima “T4 DNA Ligase” (Promega®, EE.UU.). El producto de ligación se incubó toda la noche a 4°C.

3.1.2.4. Preparación del cultivo de *Escherichia coli* DH5 α

En 2 mL de medio LB se sembró un inóculo de la bacteria *E. coli* DH5 α conservada y se incubó toda la noche a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Luego se la sembró en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo LB-agar 2% y se incubó a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 24 h.

Se tomó una de las colonias aisladas con la punta de un escarbadiante estéril, se la transfirió a un tubo conteniendo 2mL de caldo LB y se incubó a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ en agitación orbital a 180 rpm, durante toda la noche, hasta saturación.

3.1.2.5. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

El cultivo saturado se diluyó 100 veces en el mismo medio de cultivo y se incubó en las mismas condiciones que las descritas en el punto anterior, hasta lograr una turbidez correspondiente a una $\text{DO}_{550} = 0,5-0,6$. Las células se cosecharon por centrifugación a 4500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 100 μ L de la Solución I de transformación (ver anexo). A la suspensión obtenida se le agregaron 10 μ L de la mezcla de ligación (ver 3.1.2.3) y se incubó durante 30 min en hielo. Luego se adicionaron 900 μ L de la Solución II de transformación (ver anexo) y se incubó a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ en agitación orbital a 180 rpm durante 90 min. Finalmente, las células se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 50 μ L de medio LB y se distribuyeron con espátula de Dri-galsky sobre placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con 0,1 mg/mL de ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Debido a que el vector pGEM-TEasy permite una discriminación de las bacterias transformadas con plásmidos conteniendo insertos mediante el sistema de α -complementación para la actividad β -galactosidasa, se agregó X-gal 0,006% w/v e IPTG (“Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside”) 0,3 mM para reconocer las colonias recombinantes (color blanco).

Después de la transformación, se tomaron las colonias blancas, previamente enumeradas, con un escarbadiante estéril y se colocaron en sendos tubos conteniendo 3 mL de caldo LB suplementado con ampicilina 0,1 mg/mL. Como control negativo se inoculó un tubo con una colonia azul.

Todos los tubos se incubaron a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, en agitación orbital a 180 rpm, durante 24 h.

3.1.2.6. Minipreparación de ADN plasmídico. Protocolo modificado de lisis alcalina/precipitación con polietilenglicol (PEG)

Con el fin de separar el ADN plasmídico del ADN bacteriano, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Los cultivos obtenidos en el punto anterior se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se removió totalmente con micropipeta, apoyando finalmente el tubo invertido, unos segundos sobre papel absorbente.

El “pellet” se resuspendió en 200 μ L de la solución I (ver anexo) mezclando vigorosamente. Luego se agregó 300 μ L de la solución II (ver anexo), se mezcló suavemente y se incubó en hielo 5 min. A continuación, para neutralizar la suspensión se agregó 300 μ L de la solución III (ver anexo), se mezcló suavemente e incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente a fin de remover los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se le agregó 2 μ L RNasa (Biodynamics) a una concentración final de 20 μ g/mL y se incubó a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 30 min.

Luego se adicionó 400 μ L de cloroformo, se mezcló invirtiendo suavemente y se centrifugó 1 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. La fase acuosa (superior) se pasó a un tubo limpio y se repitió la extracción del punto anterior.

Obtenida la nueva fase acuosa se le agregó igual volumen de isopropanol 100%, se mezcló invirtiendo el tubo, se colocó 15 min a -20°C y se centrifugó 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se quitó con micropipeta teniendo la precaución de no remover el “pellet”, el que se lavó con etanol al 70% (200 μ L), se centrifugó a 13000 rpm durante 1-2 min y se secó a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 32-35 μ L de agua bidestilada estéril y se derivó a un centro de mayor complejidad para su secuenciación a fin de verificar la homología con la secuencia deseada del gen *cfp*.

3.1.3. CLONADO DE LA SECUENCIA CODIFICANTE Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.1.3.1. Purificación de los fragmentos de ADN codificante amplificados

El ADN plasmídico seleccionado se digirió con enzimas de restricción, primero con la enzima *SacI* para linealizar y luego con *EcoRI* para liberar.

La mezcla de reacción fue preparada conteniendo: ADN (0,1-1 μ g), BSA (albúmina sérica bovina) 0,1 mg/mL y 3 unidades de enzima y llevada a un volumen final de 20 μ L con solución tampón adecuada. Se incubó durante 90 minutos a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Para aislar los fragmentos de interés (*EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-SacI* y *SacI-SacI*), se corrió el producto de la digestión enzimática en un gel de agarosa al 1% (p/v). Una vez identificadas las bandas, se cortó la porción del gel que las contenía y se purificó el fragmento utilizando un reactivo comercial (“Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”, Promega®, EE.UU), según instrucciones del fabricante.

3.1.3.2. Ligación y transformación

Para realizar la reacción de ligación se mezclaron cada uno de los fragmentos de ADN purificados con el vector plasmídico pET-32a en una relación molar 3:1.

A cada mezcla se le adicionaron:

1 μ L de buffer 10x de “T4 DNA Ligase” (Promega®, EE.UU), 0,5 μ L de la enzima “T4 DNA Ligase” (Promega®, EE.UU) y agua destilada hasta completar los 10 μ L. La mezcla de ligación se incubó, toda la noche a 4°C.

Con el producto de ligación se transformaron bacterias de *E. coli* BL21(DE3) según la técnica previamente descrita en el punto 3.1.2.5.

3.1.3.3. Expresión de la proteína recombinante

Después de la transformación, se seleccionaron colonias con cada una de las distintas construcciones plasmídicas y se repicaron en sendos tubos conteniendo 1 mL de medio LB y 1 μ L de ampicilina 0,1 mg/mL. Se incubaron a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, en agitación orbital a 180 rpm, durante toda la noche. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió de la siguiente manera para cada uno de los tubos: se trasvasó 10 μ L a un tubo conteniendo 1 mL de medio LB más 1 μ L de ampicilina 0,1 mg/mL y se lo incubó 2 h 30 min a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (cultivo en fase exponencial), en agitación orbital a 180 rpm. Luego se agregó 1 μ L de IPTG 0,5 mM y se lo incubó durante 3 h en agitación orbital a 180 rpm, a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Concluido esto y a fin de visualizar la expresión de la proteína recombinante, se colocaron 200 μ L de cada suspensión en sendos tubos Eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se descartó cada sobrenadante y cada uno de los sedimentos se resuspendió en 25 μ L de agua.

Una vez resuspendidas, las muestras fueron tratadas con 1 volumen de buffer de muestra 2x para SDS-PAGE (ver anexo), e incubadas en baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Luego se sembraron 20 μ L aproximadamente de cada una en el gel, y se aplicó una diferencia de potencial de 150 V. El marcador de peso molecular utilizado fue de Bio-Rad Laboratorios (EE.UU.), de amplio rango molecular que incluye las siguientes proteínas: Fosforilasa b, 97,4 KDa; Albúmina sérica, 66,2 KDa; Ovoalbúmina 45,0 KDa; Anhidrasa carbónica, 31,0 KDa; Inhibidor de tripsina, 20,5 KDa y Lisozima, 14,4 KDa. La fijación y tinción de los geles se efectuó por inmersión en solución de azul de Coomassie G-250 y posteriormente se decoloró en baño de agua a ebullición.

Verificadas las colonias con los insertos que expresaron las proteínas de interés, se seleccionaron dos de ellas con las que se procedió del mismo modo al descrito anteriormente pero colocando 500 μ L del cultivo en un erlenmeyer que contenía 50 mL de LB suplementado con ampicilina y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar la turbidez correspondiente a una $\text{DO}_{550} = 0,5-0,6$. Se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG (0,1mM concentración final) y se continuó incubando a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, en agitación orbital a 180 rpm, durante 3 h. El cultivo se trasvasó a un tubo Falcon grande y se centrifugó a 3900 rpm durante 15 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó 3 veces con PBS 1x, luego las células se resuspendieron en

40 mL de buffer de imidazol 20 mM. La suspensión se sonicó mediante pulsos de 50 % durante 2 min a 600 W, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se sembró en un gel con 15% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970).

Las proteínas recombinantes se identificaron con las siglas del inserto seguido del número correspondiente a la colonia de la bacteria de la cual provino.

La identidad de los clones obtenidos fue verificada por secuenciación.

3.1.3.4. Purificación de la proteína recombinante en columna de pseudoafinidad a níquel

El sistema consistió en una columna de 1 mL de IDA-Sepharosa (Novagen, U.S.A) sobre la cual se inmovilizó Ni^{+2} . La misma se lavó con 10 volúmenes de la solución de buffer de imidazol 20 mM y luego se sembró con el sobrenadante obtenido con la proteína recombinante, recirculándolo 2 veces. Se realizaron lavados con la solución de buffer de imidazol 20 mM y luego se eluyó, utilizando las soluciones de buffer de imidazol de 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM. Se colectaron las fracciones a las que se les determinó la presencia de proteínas mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). La pureza de las mismas se analizó por SDS-PAGE al 15% (Laemmli, 1970), según lo descrito en 3.1.3.3.

3.1.3.5. Dosaje de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). La lectura se efectuó en un espectrofotómetro a 590 nm. Se utilizó una curva de calibrado trazada con un patrón de BSA, abarcando un rango de concentraciones desde 0,01 hasta 0,1 mg/mL.

3.1.4. OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO POLICLONAL

3.1.4.1. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales de ratón

La inmunización de los ratones se llevó a cabo en uno de los bioterios pertenecientes a la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL) bajo condiciones ambientales controladas. Los animales dispusieron de alimento balanceado comercial y agua “ad libitum”.

Para la obtención de antisuero de ratón específico contra la proteína CFP de *C. kikuchii* (anticuerpos policlonales), se realizó el siguiente esquema de inmunización:

El grupo experimental estuvo conformado por 4 ratones Rockland (2 por cada una de las proteínas en estudio). Los mismos fueron inoculados por primera vez con una dosis intraperitoneal de 20 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ de PBS (“phosphate buffered saline”) 1x de las proteínas recombinantes previamente purificadas (antígeno, Ag), en presencia de adyuvante completo de Freund.

Después de 15 días de la primera inmunización se realizó otra inmunización utilizando el antígeno inoculado en la primera inmunización junto con adyuvante incompleto de Freund. Esta inmunización se reiteró dos veces más con intervalos de 15 días entre cada una de ellas.

Finalizado el tratamiento se extrajo la sangre por punción cardíaca, estas maniobras se realizaron bajo anestesia general. Una vez formado el coágulo se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min y se extrajo el suero que fue congelado a -20°C hasta su empleo. Las muestras se rotularon con el nombre del Ag y la fecha de extracción.

3.1.4.2. Titulación de los sueros obtenidos de los ratones

Se trabajó con cada uno de los Ags de la siguiente manera:

El ensayo se realizó en microplaca de poliestireno (COSTAR, EE.UU), la que fue sensibilizada con $0,5\ \mu\text{g/pocillo}$ del Ag suspendido en buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 nM, pH: 9,6. Luego se bloqueó con $200\ \mu\text{L}$ de PBS-leche descremada 5%. A continuación se enfrentó a $100\ \mu\text{L}$ de los sueros de los ratones, diluidos 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 y 1/32000 en PBS-leche descremada 1% y luego a $100\ \mu\text{L}$ del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1/2000 en PBS 1x. La reacción se puso de manifiesto mediante el agregado del cromógeno tetrametilbenzidina (“TMB single solution”, Invitrogen) y se detuvo con H_2SO_4 2 N. Entre paso y paso la microplaca se incubó a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 60 min, al cabo de los cuales se realizaron 3 lavados de 60 s con PBS-Tween 0,05%. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en un lector de ELISA (“Molecular Devices Emax”).

Los ensayos se realizaron por duplicado y se calculó la línea de corte para cada ensayo utilizando la media + 3 desviaciones estándares (SD) del suero preinmune correspondiente a cada grupo de ratón inoculado con cada proteína.

3.1.4.3. Protocolo de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales de conejo

La inmunización del conejo con la proteína recombinante se derivó para ser llevada a cabo en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (FCV-UNL).

Se utilizó 1 conejo macho, raza neocelandesa de 3,000 Kg, con una semana de cuarentena y aclimatación previa al inicio del procedimiento.

Los ensayos se realizaron en locales que cumplen con la Resolución SENASA 617/02 y la Disposición ANMAT N° 6344. Los mismos cuentan con condiciones ambientales controladas, con presión positiva, 30 renovaciones de aire por h, temperatura estable de 18 a 22°C , ciclo de luz con fotoperíodos e intensidad regulada. Para el mantenimiento del animal se dispuso de libre acceso al agua, alimento balanceado comercial y monitoreo veterinario diario.

Para el procedimiento de inoculación, se mezclaron el inmunógeno y coadyuvante hasta formar una emulsión estable, la cual se inyectó de manera subcutánea en el área dorsal del conejo utilizando una

jeringa de 3 mL con aguja 21GX1”, distribuyendo el volumen total en 4 puntos. Previo a cada inoculación se rasuró y desinfectó la zona. El cronograma de inoculación del conejo se presenta en la tabla V.2.

La extracción total de la sangre se llevó a cabo por punción cardíaca, utilizando jeringas de 20 mL con agujas de 21GX2”. Estas maniobras se realizaron bajo anestesia general (2,4 mg/kg de Acepromazina; 48 mg/kg de Ketamina y 5 mg/kg de Xilacina). La sangre recolectada se colocó a 37°C durante 1 h y luego se refrigeró a 4°C durante 2 h.

Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 20 minutos y se extrajo el suero que fue congelado a -20 °C hasta su envío. Las muestras se rotularon con el número de protocolo y la fecha de extracción.

Tabla V.2. Cronograma de inoculación del conejo

Día	Fecha	Observación
0	20/02/08	Inoculación
16	07/03/08	Inoculación
28	19/03/08	Inoculación
43	03/04/08	Extracción sangre para evaluación del título
48	08/04/08	Extracción Total

3.1.4.4. Titulación del suero obtenido del conejo

Para la titulación del suero del conejo se procedió de igual modo al descrito en el punto 3.1.4.2. utilizando en este caso, el suero anti-IgG total de conejo conjugado con peroxidasa.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE ELISA

3.2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO A PARTIR DEL MICELIO FÚNGICO

Se trabajó con *C. kikuchii* NBRC 6711 (control positivo) y *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. como otros géneros fúngicos.

Con cada uno de los hongos se procedió de la siguiente manera: se sembró sobre estría de APD y se incubó durante 4 días a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz fría y 8 h de oscuridad) (Salvador y Garrido, 1990). A continuación, se le agregó 5 mL de agua estéril y se raspó la superficie de la colonia con un ansa, a fin de desprender los elementos fúngicos. La suspensión (10^5 UFC/mL) se agregó a 100 mL de medio caldo extracto de malta con 30 g de glucosa, a fin de favorecer la producción de cercosporina (Jenns y col., 1989) y por lo tanto, la expresión de la proteína, y se incubó, durante 48 h, manteniendo las condiciones descritas anteriormente, en agitación orbital (Orbital Shaker, Forma Scientific, Inc.) a 180 rpm.

El micelio se recogió sobre un filtro de tela de nylon (200 μm de diámetro de poro). Luego se lo secó con la ayuda de papel absorbente hasta eliminar la humedad. Una vez seco, se estiró formando una capa lo más fina posible. Posteriormente se llevó a sequedad en estufa a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ hasta pesada constante. Una vez seco, el micelio se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Para la extracción de la proteína se pesó 0,150 g del micelio del hongo pulverizado y se le agregó 1 mL del buffer para extracción de proteínas (Upchurch y col., 2002), la mezcla se mortereó a fin de poner en contacto el material con el buffer. Luego se la colocó en un tubo Eppendorf y se le agregó 3 mL de buffer para extracción de proteínas, se sonicó 5 veces mediante pulsos de 50% durante 2 min a 600 W y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se trasvasó a un tubo Eppendorf. El sobrenadante y el sedimento se conservaron a -20°C hasta la realización de la técnica de ELISA indirecto.

3.2.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO A PARTIR DE TROZOS DE TEJIDO VEGETAL

Se trabajó con muestras de plantas que presentaban sintomatología del tizón de la hoja remitidas oportunamente por los integrantes del Programa Riia. Cada una de las muestras se designó con una letra.

Para la extracción de la proteína a partir del tejido vegetal, se pesó 0,150 g del mismo y se procedió de igual manera que con el micelio del hongo pulverizado (ver 3.2.1.).

3.2.3. OPTIMIZACIÓN DEL ELISA INDIRECTO

El ensayo de ELISA indirecto se aplicó para demostrar la presencia de la proteína nativa en los extractos de las plantas con sintomatología del tizón de la hoja. Como control se trabajó en paralelo con extractos de los hongos de referencia (*C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715) y de géneros distintos de *Cercospora* (*Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp.). Se utilizó el suero de conejo luego de la tercera dosis de inoculación.

A los fines de determinar si la proteína se había solubilizado, se aplicó la técnica al sobrenadante y al sedimento de la extracción.

3.2.3.1. ELISA indirecto con el sobrenadante de la extracción

El ensayo se realizó en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (COSTAR, EE.UU.), la que se sensibilizó con 100 µL/pocillo de los extractos proteicos del micelio de los hongos y de los tejidos vegetales, diluidos 1:10, 1:100 y 1:1000 en buffer Na₂CO₃/NaHCO₃ 100 nM, pH: 9,6. La microplaca se incubó 1 h a 37 ± 0,2°C y se realizaron 3 lavados sucesivos con solución salina de PBS 1x con detergente Tween 20 al 0,05% (PBS-T). A continuación se bloqueó colocando en cada pocillo 200 µL PBS-leche descremada 5%, se incubó a 37 ± 0,2°C durante 1 h y se lavó de la misma manera que en el paso anterior. Después se adicionó 100 µL del suero de conejo pre-inmune diluido 1/5000 en PBS-leche descremada 1% y se incubó a 37 ± 0,2°C por 1 h. La placa se lavó nuevamente y se agregó, a cada pocillo, 100 µL del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1/2000 en PBS 1x. Se incubó a 37 ± 0,2°C durante 1 h. Finalmente y luego de los lavados con PBS-T, la reacción se puso de manifiesto mediante el agregado del cromógeno tetrametilbenzidina (“TMB single solution”, Invitrogen) y se detuvo con H₂SO₄ 2 N. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en un lector de ELISA (“Molecular Devices Emax”).

Se realizó un blanco de reactivos para lo cual no se sensibilizó el pocillo con el antígeno y un control positivo sensibilizando el pocillo con la proteína recombinante. En simultáneo, se aplicó idéntica metodología con el suero inmune.

Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.3.2. ELISA indirecto con el sedimento de la extracción

La técnica de ELISA se realizó en microplaca de poliestireno de 96 pocillos (COSTAR, EE.UU.), la que se sensibilizó con 50 μ L del sedimento de los extractos proteicos de los hongos y de los tejidos vegetales diluidos 1/100, 1/1000, 1/10000 en buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 nM pH: 9,6. La microplaca se incubó durante toda la noche a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ a fin de secar el extracto. Posteriormente se realizaron los lavados y se continuó con la misma metodología descrita en el punto anterior.

3.2.4. OPTIMIZACIÓN DEL ELISA DE INHIBICIÓN

Se evaluaron formatos de ensayos y condiciones para su optimización.

3.2.4.1. Determinación del título de anticuerpos policlonales de conejo

Luego de la extracción total de sangre, se tituló nuevamente el suero de conejo, realizándole mayores diluciones que lo indicado en 3.1.4.4.

Se prepararon diluciones al medio del suero de conejo, utilizando PBS 1x-leche descremada 1% como diluyente: 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000, 1:640000 y 1:1280000.

El ensayo se llevó a cabo sobre una placa de poliestireno de 96 pocillos, la que se sensibilizó con 100 μ L de una dilución 1/1000 de la proteína recombinante (diluida en buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 nM pH: 9,6). Dicha placa se incubó durante 1 h a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ y se lavó 3 veces a intervalos sucesivos con PBS-T. A continuación se bloqueó con 200 μ L de PBS-leche descremada 5%, incubando la placa durante 1 h a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Luego se realizaron 3 lavados de la misma manera que en el paso anterior. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de cada una de las diluciones del suero. La placa se incubó a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 1 h y se lavó 3 veces a intervalos sucesivos con PBS-T. Finalmente se agregó a cada pocillo, 100 μ L de una dilución 1/2000 (diluido en PBS 1x) de suero anti-IgG total de conejo conjugado con peroxidasa y se incubó durante 1 h a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Transcurrido el tiempo, se procedió al lavado de la placa con PBS-T. Por último, la reacción se puso de manifiesto mediante el agregado del cromógeno tetrametilbenzidina (“TMB single solution”, Invitrogen) y se detuvo con H_2SO_4 2 N. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en un lector de ELISA (“Molecular Devices Emax”).

Se realizó un blanco de reactivos para lo cual no se sensibilizó el pocillo con el antígeno.

Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.4.2. Determinación de las concentraciones de la proteína soluble detectable mediante ELISA de inhibición

Se prepararon diluciones al décimo de la proteína recombinante en tubos Eppendorf, utilizando como diluyente $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100nM pH 9.6; de manera de obtener las siguientes concentraciones en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} .

En una primera etapa, a cada dilución de la proteína se le agregó 250 μL del suero de conejo diluido 1/160000 en PBS-leche descremada 1%. Las mezclas se incubaron, en agitación suave, durante 60 min a temperatura ambiente.

A continuación, se sensibilizó una microplaca, con 100 μL de una dilución 1/600 de la proteína recombinante diluida en buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100nM pH 9.6. La incubación se realizó durante 1 h a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Posteriormente se realizaron 3 lavados sucesivos con PBS-T. A continuación se bloqueó con 200 μL de PBS-leche descremada 5%, incubando la placa durante 1 h a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ y lavándola 3 veces de la misma manera que en el paso anterior. Luego se adicionaron 100 μL de las mezclas obtenidas en la primera etapa a sendos pocillos los que fueron rotulados con las distintas concentraciones de la proteína. Además se agregó 100 μL de suero 1/160000 (diluido en PBS-leche descremada 1%) a un pocillo que se consideró como 100% de reactividad. La placa se incubó a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 1 h y se lavó 3 veces con PBS-T. Finalmente se agregó, a cada pocillo, 100 μL de una dilución 1/2000 (diluido en PBS 1x) de suero anti-IgG total de conejo conjugado con peroxidasa y se incubó durante 1 h a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se procedió al lavado con PBS-T. Por último, la reacción se puso de manifiesto mediante el agregado del cromógeno tetrametilbenzidina (“TMB single solution”, Invitrogen) y se detuvo con H_2SO_4 2 N. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en un lector de ELISA (“Molecular Devices Emax”).

En esta etapa se utilizaron como soporte placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo en U.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición que se calculó de la siguiente manera:

$$\% I = 100 - \frac{\text{DO}_x \times 100}{\text{DO}_{100\%}}$$

$\text{DO}_{100\%}$ = Densidad óptica de la reacción con 100% de reactividad

DO_x = Densidad óptica de la muestra

3.2.4.3. Determinación de la línea de corte

Para la determinación de una línea de corte del ELISA de inhibición, por encima de la cual las plantas se considerarían positivas, se procesaron plantas libres de signos y síntomas de la enfermedad por *C. kikuchii*, obtenidas de la siguiente manera:

Se utilizaron semillas que no presentaban a simple vista algún daño mecánico, por almacenamiento o enfermedad. Previo a la siembra se realizó el pre-germinado de las semillas, para lo cual se colo-

caron en bandejas plásticas previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5%, conteniendo papel de filtro embebido en agua sobre una capa de algodón, para mantener las condiciones de humedad apropiadas. A continuación, se incubaron en estufa de germinación bajo condiciones de oscuridad continua, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 h (Copati Souza, 2001). Luego, las semillas pre-germinadas se dispusieron en macetas de plástico de 300 mL, conteniendo tierra-arena-vermiculita en proporción 2:1:1. Las plantas continuaron su desarrollo en la cámara de crecimiento (3 x 2m) disponible en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL), bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. A los 45 d se seleccionaron las primeras hojas trifoliadas (correspondientes al estadio V1) a las que se les realizó el ensayo de ELISA de inhibición.

Las plantas fueron designadas con números del 1 al 10.

El punto de corte (“cut-off”) se calculó como el promedio de las DO de las plantas negativas menos 2 desviaciones estándares y teniendo en cuenta estos valores se calculó el porcentaje de inhibición.

3.2.4.4. Desarrollo de la técnica de ELISA de inhibición

La técnica de ELISA de inhibición se aplicó a las plantas de soja con y sin sintomatología de la enfermedad por *Cercospora*.

Se colocó $0,08 \pm 0,005$ g de cada una de las muestras, en sendos tubos Eppendorf de 1,5 mL. Luego se agregó un volumen igual a 1 mL de la dilución 1:160000 del suero de conejo (diluido en PBS-leche descremada 1%). La mezcla se incubó, en agitación suave, durante 60 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se separó y se trasvasó a otro tubo Eppendorf.

A continuación, la sensibilización de la placa y el resto de la técnica se llevaron a cabo según lo descrito en el apartado 3.2.4.2.

Se utilizó como control positivo, micelio en polvo de los hongos de referencia *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715. Como control de especificidad de género se trabajó con el micelio pulverizado de los hongos *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Alternaria* sp. Se consideró como control 100% de reactividad del ensayo (0% de inhibición, 100% de absorbancia) a la reacción entre la proteína recombinante CFP y el suero de conejo.

Tanto las muestras como los controles fueron numeradas en forma correlativa (1-37).

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DOT BLOT PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE *C. KIKUCHII* EN TEJIDOS VEGETALES

3.3.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO

La extracción de la proteína CFP se realizó según el protocolo propuesto por Rollins y col. (1993), para lo cual se pesó 0,1 gr de micelio fúngico pulverizado o de tejido vegetal y se le agregó 1 mL de buffer de extracción, se dejó incubando toda la noche, a 4°C y en oscuridad. Luego se centrifugó a máxima velocidad (13000 rpm) durante 10 min. El sobrenadante se trasvasó a un tubo Eppendorf y

se guardó a -20°C hasta su procesamiento. La determinación de proteínas totales se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976).

3.3.2. PREPARACIÓN DEL SUERO ADSORBIDO

Con el objeto de adsorber los anticuerpos inespecíficos desarrollados en el conejo inmunizado, se procedió de la siguiente manera:

Se cortaron tiritas de membrana de nitrocelulosa, se colocaron en un tubo Eppendorf y se embebieron con extracto proteico del hongo CK15 productor de baja concentración de cercosporina. Luego se retiraron del tubo y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las membranas así tratadas se colocaron en otro tubo Eppendorf y se pusieron en contacto con 1 mL de suero de conejo, se dejaron en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a cambiar las tiritas y se continuó la agitación. El procedimiento se repitió por lo menos 5 veces. Finalmente el suero adsorbido se recogió en otro tubo Eppendorf, se fraccionó y guardó a -20°C hasta su uso.

Posteriormente se utilizó la técnica de Western blot para determinar la presencia de anticuerpos específicos, en el suero adsorbido, para la proteína nativa en la cepa de referencia CK6711, procediéndose de la siguiente manera:

Se llevó a cabo una electroforesis en gel con 15% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970) del extracto proteico del hongo sembrado por triplicado. La muestra se trató previamente con un volumen de buffer de muestra 2x para SDS-PAGE (ver anexo). Luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La misma se cortó en tiras, según cada uno de los tres puntos de siembra y cada una de ellas se colocó en un vial. Se bloqueó con PBS-leche descremada 5% durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Luego se realizaron 3 lavados sucesivos con PBS-T. A cada vial se le adicionó distintas diluciones del suero adsorbido (1/100, 1/500 y 1/1000 en PBS-leche descremada 1%), se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se lavó con PBS-T. Finalmente se agregó una dilución 1/500 en PBS 1x de suero anti-IgG total de conejo conjugado con peroxidasa. Posteriormente a una nueva etapa de lavado (tres veces), las membranas se trataron con peróxido de hidrógeno 0,4% - 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.) durante 20 min en PBS. La reacción se detuvo con una etapa de lavado con agua. Todos los pasos de incubación se realizaron en agitación moderada. El marcador de peso molecular utilizado fue el descrito previamente en el punto 3.1.3.3 (Bio-Rad Laboratorios).

3.3.3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA

La técnica de Dot blot se llevó a cabo según el diseño previamente descrito por Spessot y col. (2004). Este se basó en fijar el antígeno en concentraciones decrecientes sobre la membrana de nitrocelulosa y luego de finalizar la reacción con el suero y el revelador, se visualizó el color de la misma y se estableció un “score” asignando valores a las señales obtenidas y multiplicándolos entre sí. Para calcular el “score”, se sembró de cada extracto proteico una fracción pura y diluciones al 1/2, 1/8, 1/32 y 1/64 del mismo.

A los fines de poner a punto la metodología se utilizaron extractos proteicos de CK6711 y CS6715 y como controles negativos, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. y *Alternaria* sp., para lo cual sobre cada tira de membrana de nitrocelulosa se depositó 1 µL del extracto soluble puro seguido de cantidades decrecientes del mismo (1/2, 1/8, 1/32 y 1/64). Las tiras se secaron a temperatura ambiente y se bloquearon durante 1 h con PBS-leche 5%. Después de tres ciclos de lavado con PBS-T, durante 5 min, se incubaron en un vial con 1 mL de suero de conejo adsorbido diluido 1:500 en PBS-leche al 1% durante 1 h. Luego de una nueva etapa de lavado (tres veces), las tiras se incubaron durante 1h con 1 ml de suero anti-IgG total de conejo conjugado con peroxidasa, diluido 1/500 con PBS 1%. Posteriormente a una nueva etapa de lavado (tres veces), las membranas se trataron con peróxido de hidrógeno 0,4% - 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.) durante 20 min en PBS. La reacción se detuvo con una etapa de lavado con agua. Todos los pasos de incubación se realizaron en agitación moderada.

Una vez que las condiciones de ensayo fueron determinadas y con el fin de permitir una mejor discriminación de extractos positivos y negativos, se definió un criterio para la evaluación del “score”. Cada señal obtenida sobre la membrana se consideró que tenía una base numérica igual a 4, 2 ó 1, dependiendo de si la señal era muy fuerte, tenue o baja o no visible. Luego, las 5 observaciones correspondientes a cada muestra se multiplicaron, y el resultado se consideró el “score” de la muestra. El uso de este sistema facilitó la lectura visual disminuyendo la subjetividad de las observaciones.

Con el fin de obtener la mejor discriminación entre las muestras reactivas y no reactivas se definió una línea de corte a través de la curva ROC (“Receiver Operating Characteristic curves”) utilizando el programa MedCalc. Para esto se trabajó con 8 plantas con sintomatología del tizón por *Cercospora* y 7 plantas sanas. Se incluyó además CK6711 como control positivo.

3.4. OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE ESPECIES DE *CERCOSPORA*, EN TEJIDOS VEGETALES

Otra estrategia de detección del hongo, fue la amplificación por PCR del fragmento del gen *cfp* de 451 pb.

3.4.1. EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL DEL HONGO Y DE LA PLANTA

La extracción del ADN total fue realizada a partir de micelio fúngico y de tejido vegetal según el protocolo de Lee y Taylor (1992), modificado por Di Conza y col. (2007). La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y col., 1989).

3.4.2. AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN *CFP*. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLÉOTIDOS. CONDICIONES DE LA PCR

En un primer ensayo, los “primers” que se utilizaron fueron PF y PR, diseñados previamente. Se evaluaron diferentes condiciones de reacción con el ADN del hongo CK6711, obteniéndose los mejores resultados con las expresadas a continuación:

La mezcla de reacción, con un volumen final de 50 μ L, consistió en aproximadamente 20 ng de ADN y 5 μ L de buffer de reacción 1x (InbioHighway, Argentina), 1,25 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTPs (InbioHighway, Argentina), 2 μ M de c/ oligonucleótido y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (InbioHighway, Argentina). Al final de la reacción se agregó aceite mineral (15 μ L).

La reacción de amplificación se realizó en un “MJ Research Thermal Cycler” programado de la siguiente manera: un ciclo de 3 min a 95°C seguido de 35 ciclos de 1 min a 53°C, 1 min a 72°C y 1 min a 95°C. Finalmente la temperatura de extensión fue de 72°C durante 5 min.

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis sumergida horizontal en geles de agarosa de 1,5 % w/v con TBE 0,5x (Tris-borato 0,089 M, EDTA 0,002 M) (Sambrook y col., 1989). El tiempo de corrida fue de 180 min, con un voltaje constante de 100 V. La tinción del gel se realizó con Bromuro de Etidio. El marcador de PM utilizado fue 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina).

El perfil de bandas obtenido fue fotografiado con el Gel Doc XR System (BIORAD-Life Science Cat. # 170-8170) usando el Quantity one Software.

Posteriormente, esta técnica se llevó a cabo con ADN de plantas con sintomatología de la enfermedad, de plantas sin sintomatología de la enfermedad y del hongo puro CK6711 como control positivo.

Para aumentar la especificidad con los tejidos vegetales se diseñaron nuevos oligonucleótidos. Para el diseño de los mismos se utilizó la secuencia correspondiente al último exón del gen *cfp* que se encuentra depositada en el GenBank (N° de acceso AF091042) (Figura V.8). Luego se aplicó el programa “DNASTart Sequence Analysis Software” y se seleccionaron los de mayor “score” (CFP-1 y CFP-2) (Tabla V.3).

```

2581 aagtaatcga gctccgactg aatttgaaca tttctaacgc atgacagtat cggttattcg
2641 atcgatttcg ccattggaat cggcgtcagt ctcgagcaat ccaacgttgc tgtccagact
2701 gtctgtcccg atgctcagat accagcagga acaagcttgg ttctgttctg cgcactactt
2761 ggatcagcaa tccccggacc catcggacag agtgtactcc agacaacact tgccagtagg
2821 ctagggactg aggtcgcaga gcaagcatat ggtggtaccg gagcaactga aatccgctca
2881 aagctcgaca acatttttgg agctggcaca cctgaagctc gagatgccct tgacgctttc
2941 aacgattctg tgacgaagat cttcatggtc gcaatcatag tctcatgtct gagtgcgctg
3001 cctcttcccc tcatcgagct caagagcgtc aagcgtgaga aacgagacaa cgaagacgcc
3061 aaagaaggca agaaaaactaa tgggacgacg cgtgagatag aagatccaga gaagggggcag

```

Figura V.8. Secuencia de cDNA correspondiente al cuarto exón del gen *cfp*. En color amarillo se distingue la región de unión de los “primers”

Tabla V.3. Oligonucleótidos específicos para el género *Cercospora*

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Gen	Tamaño del amplicón (bp)
CFP-1	tgaggtcgcagagcaagcat	<i>cfp</i>	264
CFP-2	cgcgtcgtccattagtttct		

Asimismo, las condiciones para la PCR se fijaron en base a las temperaturas sugeridas por los algoritmos que utilizan los programas de “primers”.

La mezcla de reacción, con un volumen final de 50 μ L, consistió en aproximadamente 20 ng de ADN y 5 μ L de buffer de reacción 1x (InbioHighway, Argentina), con 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTPs (InbioHighway, Argentina), 0,2 μ M de c/ oligonucleótido y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (InbioHighway, Argentina). Al final de la reacción se agregó aceite mineral (15 μ L).

La amplificación se llevó a cabo utilizando el equipo “MJ Research Thermal Cycler” bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización de 3 min a 95°C; 35 ciclos comprendiendo 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y 1 min a 95°C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C.

El producto de amplificación se separó y analizó de igual modo al descrito para la primer PCR.

Este ensayo se aplicó a ADN de plantas con y sin sintomatología del tizón por *Cercospora*; CK6711 y CS6715 se utilizaron como controles positivos y *Cladosporium* sp. como control de especificidad de género.

3.5. OPTIMIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN DE PLANTAS DE SOJA POR ESPECIES DE *CERCOSPORA*

3.5.1. CRECIMIENTO DE PLANTAS DE SOJA BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Para la puesta a punto del modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*, se optimizó el cultivo de las mismas bajo condiciones controladas y su infección por el fitopatógeno. El ensayo se llevó a cabo en la cámara de crecimiento disponible en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL), bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Se utilizaron semillas de muy buena calidad y maduración y se procedió según lo descrito en el punto 3.2.4.3.

3.5.2. HONGOS UTILIZADOS PARA LA INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS

Se trabajó con los aislamientos regionales de *C. kikuchii* para lo cual se seleccionaron hongos productores de cercosporina que, según estudios efectuados por el grupo de trabajo, la producían en concentraciones alta, mediana y baja (González y col., 2008); con las cepas pertenecientes a la colección NITE Biological Resource Center (Japón): *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 y *Cercospora sojina* NBRC 6715 y con un aislamiento de *Cladosporium* sp. para el estudio de especificidad de género (Moreno y Agudelo-Flórez, 2010).

3.5.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para la preparación del inóculo, cada uno de los hongos se sembró en 5 tubos conteniendo APD (agar papa dextrosa) y se incubaron durante 4 días a $25 \pm 0,2^\circ C$, bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Transcurrida la incubación, se agregó 5 mL de agua destilada estéril a cada tubo y se procedió a desprender las estructuras fúngicas con el ansa, mediante un raspado sua-

ve de la superficie del cultivo. La suspensión de las mismas se cuantificó efectuando recuentos en cámara de Neubauer y microbiológico (recuento en placa en superficie).

Para el recuento microbiológico se realizaron diluciones del inóculo (10^{-1} , 10^{-2}). Un volumen igual a 0,1 mL de cada dilución se sembró en la superficie de una placa conteniendo medio APD y se distribuyó homogéneamente con espátula de Drigalski, previamente flameada con alcohol etílico al 70%. Luego de 72-96 h de incubación se seleccionaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias y se calculó la concentración del inóculo (CLSI, 2008).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

3.5.4. INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS

Se trabajó con plantas en estado fenológico V3. Las mismas se dispusieron por grupos:

- Plantas sanas, como control negativo
- Plantas tratadas con agua, como control de inóculo
- Plantas inoculadas con aislamientos regionales de *C. kikuchii* con distintas capacidades de producción de cercosporina⁷:
 - CK15, cepa productora de baja concentración de cercosporina ($3,93 \pm 0,39$ nmol $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$)
 - CK23, cepa productora de mediana concentración de cercosporina ($85,07 \pm 14,88$ nmol $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$)
 - CK32, cepa productora de alta concentración de cercosporina ($148,51 \pm 3,98$ nmol $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$)
- Plantas inoculadas con *C. kikuchii* NBRC 6711, cepa de referencia productora de cercosporina ($243,30 \pm 11,60$ nmol $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$)⁷
- Plantas inoculadas con *C. sojina* NBRC 6715, cepa de referencia productora de cercosporina ($553,08 \pm 5,36$ nmol $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$)⁷
- Plantas inoculadas con *Cladosporium* sp. como control de especificidad de género.

Se seleccionaron las hojas trifoliadas correspondientes al primer y segundo par de hojas completamente desplegadas. Se asperjaron con un volumen de 2 mL del inóculo por planta, humedeciendo ambas caras de las hojas. Luego las plantas se cubrieron con bolsas de nylon perforadas, previamente humedecidas en su interior, para proveer las condiciones de humedad y mojado foliar adecuadas para estimular el proceso de infección (Layrisse y Borges, 1984).

3.5.5. CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA SINTOMATOLOGÍA

Se realizó el seguimiento de los cultivos, a diferentes intervalos de tiempo, evaluando visualmente la aparición de lesiones (Camacho de Torres y Subero Martínez, 1992).

Una vez detectadas se inspeccionaron bajo lupa estereoscópica (10-40x), a fin de corroborar la presencia del agente infeccioso.

⁷ Según estudios efectuados y publicados por el grupo de trabajo González y col., 2008

Ante casos sospechosos, se realizaron observaciones directas bajo microscopio óptico (100-400x), o bien se colocaron folíolos con síntomas sospechosos en “cámaras húmedas” incubadas a $26 \pm 0,5$ °C, bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz fría y 8 h de oscuridad) a fin de confirmar el crecimiento de las estructuras conidiales (Salvador y Garrido, 1990).

3.6. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DOT BLOT Y PCR PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE ESPECIES DE *CERCOSPORA*

Una vez verificado el éxito del modelo experimental de infección de las plantas se procedió a evaluar las técnicas de Dot blot y PCR para la detección precoz de especies de *Cercospora*.

Para este ensayo se utilizaron 56 plantas. Ocho se inocularon con *C. kikuchii* productora de alta concentración de toxina (CK32), 12 con *C. kikuchii* productora de baja concentración de toxina (CK15), 12 con la cepa de referencia CK6711 y 8 con CS6715. Como control de inóculo se procesaron 8 plantas tratadas con agua estéril y como control negativo se procesaron 8 plantas sanas.

Para determinar la precocidad en la detección del hongo, se probaron distintos tiempos de muestreos: 4 y 24 h y 2, 4 y 6 d.

Una vez recolectadas, las hojas trifoliadas se observaron a simple vista en busca de lesiones macroscópicas y con lupa estereoscópica en busca de lesiones no visibles a simple vista. Posteriormente se las lavó, 3 veces, con agua estéril para eliminar el resto de inóculo que quedó pegado a la superficie foliar. Luego se las secó con papel absorbente y se las guardó entre papeles metálicos a -20°C hasta su procesamiento.

Para evaluar ambas técnicas (Dot blot y PCR) se trabajó como se describiera en los puntos 3.3. y 3.4., respectivamente. En todos los casos se trabajó por duplicado.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE PARA LA PORCIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA CFP

La búsqueda de identidad en la base de datos GenBank, utilizando el programa BLAST permitió corroborar la homología de la secuencia *cfp* con especies del género *Cercospora* no presentando homología con secuencias de genes de otras especies fúngicas, indexadas hasta el momento (Figura V.9.).

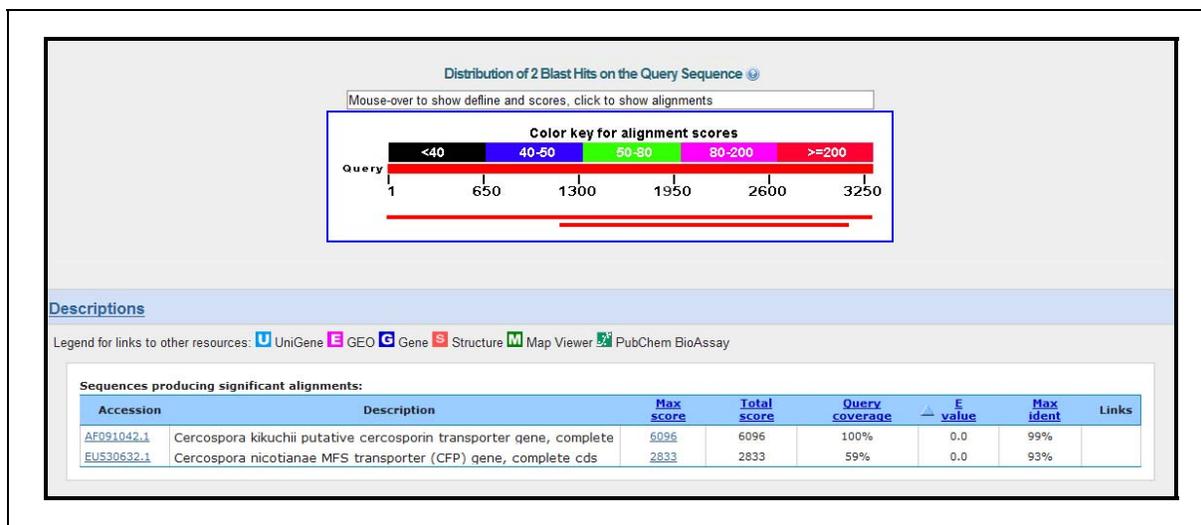


Figura V.9. Homología de la secuencia *cfp* con aquellas depositadas en la base datos del GenBank

En la Tabla V.4 se muestran las secuencias de los “primers” PF (“Primer Forward”) y PR (“Primer Reverse”) seleccionados que presentaron el mayor “score”, unidas a los sitios de restricción *EcoRI* y *SacI*, respectivamente.

Tabla V.4. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de amplificación por PCR del gen *cfp* unidos a los sitios de restricción

“Primer”	Sitio de restricción-Secuencia 5’-3’
PF	gaattc-gtctgcccgatgctca
PR	gagctc-tcacactgcttgcccac

PF: “Primer Forward”; PR: “Primer Reverse”; gaattc: sitio de restricción *EcoRI*; gagctc: sitio de restricción *SacI*

En la Figura V.10 se representa la ubicación de las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos PF y PR dentro del último exón del gen *cfp* (2628 bp...> 3150 bp).

```

2581 aagtaatcga gctccgactg aatttgaaca tttctaacgc atgacagtat cggttattcg
2641 atcgtattcg ccattggaat cggcgtcagt ctcgagcaat ccaacgttgc tgtccagact
2701 gtctgcccg atgctcagat accagcagga acaagcttgg ttctgttctg ccgactactt
2761 ggatcagcaa tccccggacc catcggacag agtgactcc agacaacact tgccagtagg
2821 ctagggactg aggtcgcaga gcaagcatat ggtggtaccg gagcaactga aatccgctca
2881 aagctcgaca acatttttgg agctggcaca cctgaagctc gagatgcctt tgacgctttc
2941 aacgattctg tgacgaagat cttcatggtc gcaatcatag tctcatgtct gagtgcgctg
3001 cctcttccc tcatcgagct caagagcgtc aagcgtgaga aacgagacaa cgaagacgcc
3061 aaagaaggca agaaaactaa tgggacgacg cgtgagatag aagatccaga gaaggggacg
3121 agtgcagaga tctgtgggcaa agcagtgctga gatgtggcat cagaccgagc gacgatttta
3181 tagacattgt agcgagctgt tacgactaac gcatgtatcc aacagagtgt gtggctcaga

```

Figura V.10. Secuencia codificante del último exón del gen *cfp*, (*cercosporin facilitador protein*) disponible en el GenBank (AF091042)

En amarillo: Secuencia correspondiente al oligonucleótido PF sin el sitio de restricción: 5’-gtctgcccgatgctca-3’. En rojo: Secuencia correspondiente al oligonucleótido PR sin el sitio de restricción: 5’-tcacactgcttgcccac-3’

Como consecuencia de la amplificación con los oligonucleótidos seleccionados se obtuvo un fragmento de 450 bp aproximadamente (Figura V.11.)

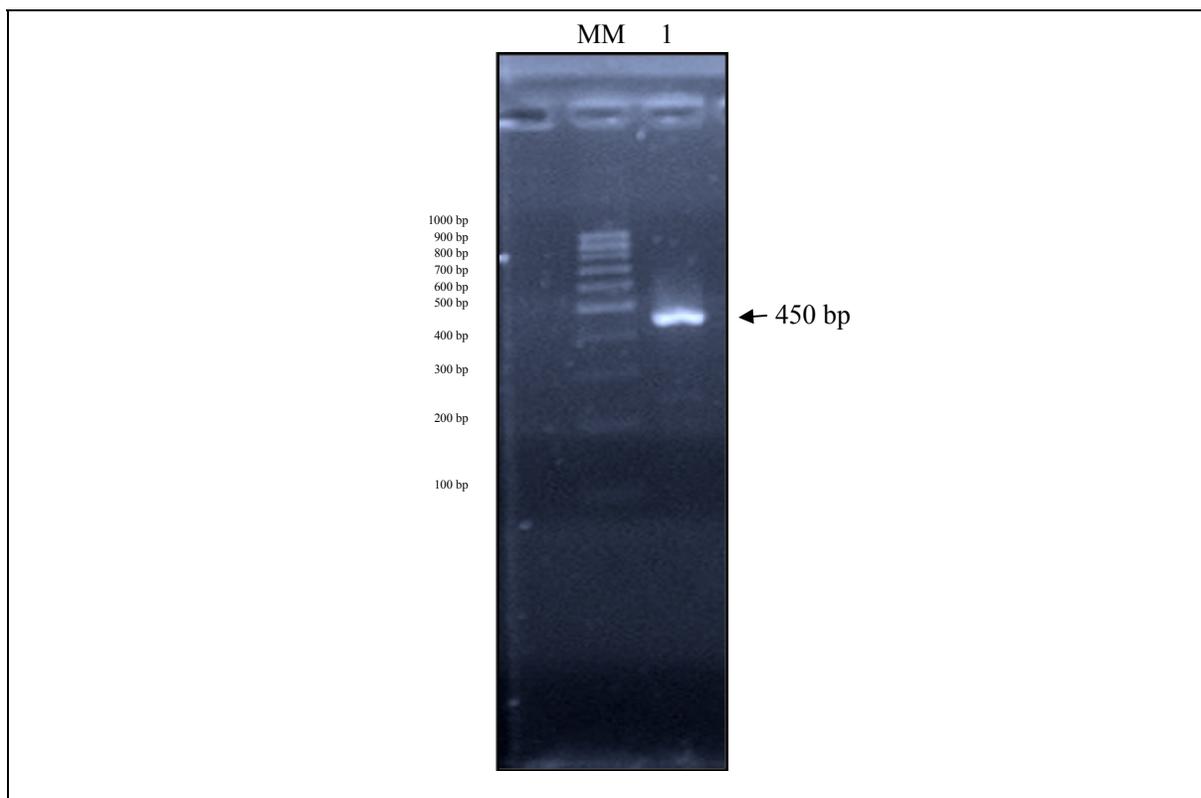


Figura V.11. Fragmento amplificado de 450 bp aproximadamente, correspondiente a la secuencia codificante del último exón del gen *cfp*, (*cercosporin facilitador protein*)

Calle MM: 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); Calle 1: Producto de PCR de *Cercospora kikuchii* NBRC 6711

Una vez purificado el fragmento y transformadas las células de *E. coli* DH5 α y obtenidas las secuencias del ADN plasmídico, se seleccionó el clon cuya secuencia presentó 100% de identidad con la del gen *cfp* depositado en la base de datos del GenBank (Figura V.9.).

Luego de la digestión de la minipreparación plasmídica del clon con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI*, se obtuvieron 3 fragmentos amplificados de 478 bp, 327 bp y 141 bp, correspondientes a los cortes *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-SacI*, *SacI-SacI*, respectivamente. Para dichos fragmentos codificantes se dedujeron las siguientes secuencias aminoacídicas de la región C terminal de la CFP (Figura V.12).

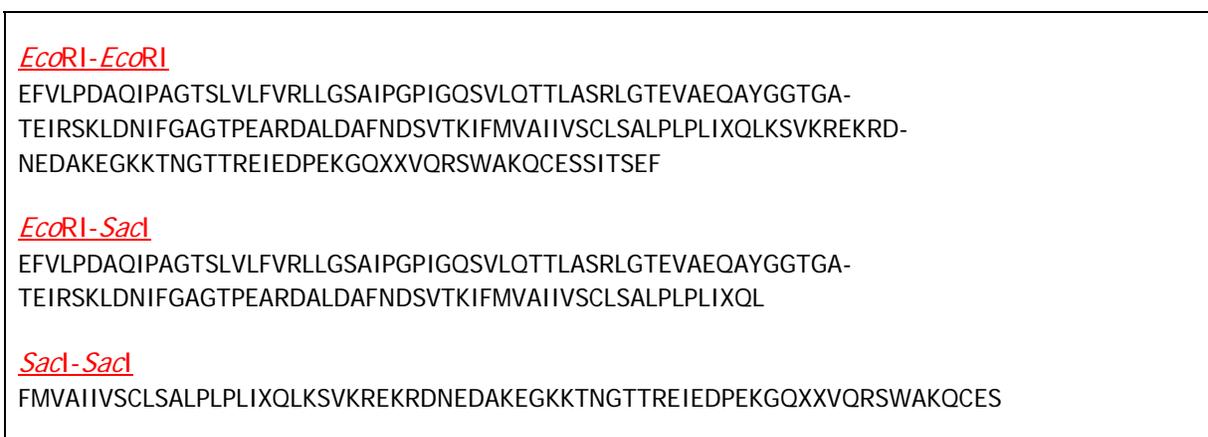


Figura V.12. Secuencias aminoacídicas de la región C terminal de la CFP

4.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Se obtuvo inducción de proteínas con las bacterias transformadas con los insertos *EcoRI-EcoRI* y *SacI-SacI*. Para el caso de las bacterias transformadas con el inserto *EcoRI-SacI* no se obtuvieron clones inductores, si bien se confirmó que la secuencia insertada en pET-32a estaba correctamente clonada para su expresión (Figura V.13).

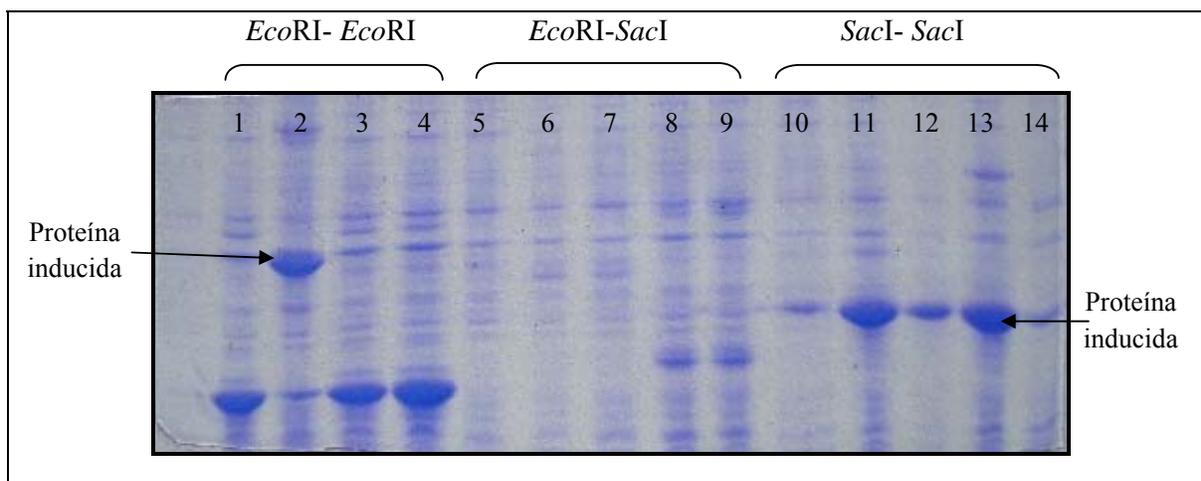


Figura V.13. Evaluación de la inducción de las proteínas para las transformaciones realizadas con las distintas ligaciones. Se muestra un gel de poliacrilamida con clones inducidos correspondientes a las distintas transformaciones

Calle 1 a 4: colonias transformadas con los insertos *EcoRI-EcoRI*; calle 5 a 9: colonias transformadas con los insertos *EcoRI-SacI*; calle 10 a 14: colonias transformadas con los insertos *SacI-SacI*

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron dos proteínas recombinantes a las que se denominó EE2 y SS4.

El resultado de la purificación de las diferentes fracciones colectadas fue evaluado por SDS-PAGE (Figura V.14). La mayor cantidad de las proteínas recombinantes EE2 y SS4 eluyó al pasar la solu-

ción de Imidazol 250 mM, obteniendo una concentración final de proteínas de 6 mg/mL y 4 mg/mL respectivamente.

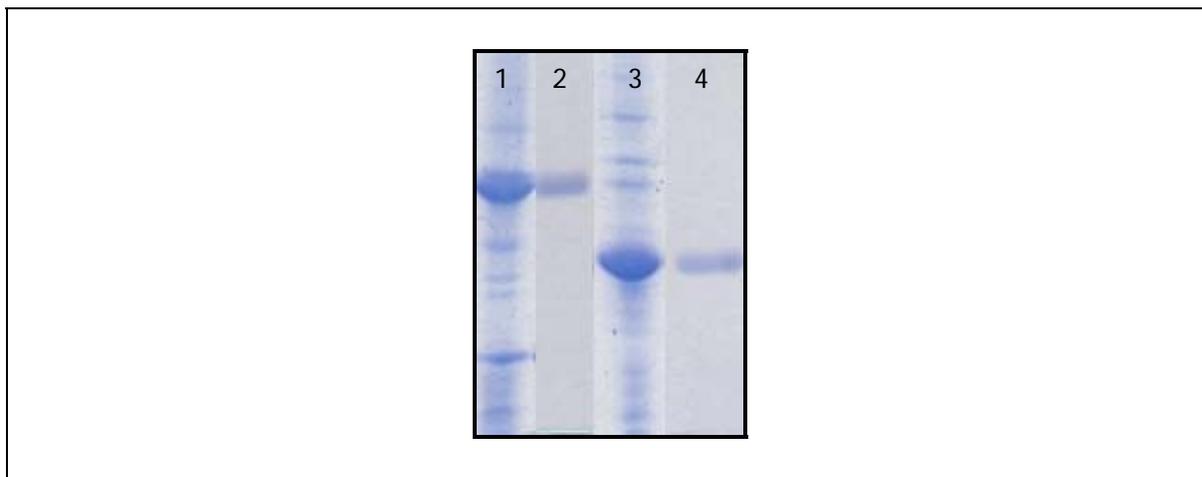


Figura V.14. Inducción y purificación de las proteínas. Gel que muestra la inducción y purificación de las proteínas EE2 y SS4

Calle 1: proteína EE2 inducida; Calle 2: proteína EE2 purificada; Calle 3: proteína SS4 inducida; Calle 4: proteína SS4 purificada.

4.3. OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO POLICLONAL

4.3.1. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS EN RATÓN

Los títulos de los anticuerpos obtenidos en ratón correspondiente a la fracción de la CFP de los clones SS4 y EE2 se observan en la Tabla V.5.

Tabla V.5. Títulos de los anticuerpos séricos de ratón

Diluciones del suero de ratón	Densidad óptica Promedio Ac-SS4	Densidad óptica Promedio Ac-EE2
1:100	1,469	1,404
1:500	1,340	1,307
1:1000	1,168	1,197
1:2000	1,023	0,981
1:4000	0,739	0,861
1:8000	0,550	0,692
1:16000	0,400	0,499
1:32000	0,282	0,369

Ac-SS4: anticuerpos en ratón correspondiente a la fracción de la CFP del clon SS4

Ac-EE2: anticuerpos en ratón correspondiente a la fracción de la CFP del clon EE2

Los anticuerpos que se produjeron fueron reactivos para la proteína heteróloga. Teniendo en cuenta la absorbancia del suero pre-inmune se consideró como título tanto para la proteína del clon EE2

como para la del SS4, el valor 1/8000. Sin embargo, no permitió la detección del antígeno nativo del hongo en ensayos preliminares de ELISA indirecto.

4.3.2. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS EN CONEJO

Si bien, ambas proteínas presentaron la misma antigenicidad, se seleccionó la correspondiente al clon EE2 para inmunizar al conejo, ya que incluía a todos los aminoácidos de SS4 más otros adyacentes y por lo tanto contaba potencialmente con más determinantes antigénicos.

Los títulos obtenidos después de la tercera dosis de inoculación fueron superiores a los de ratón (Tabla V.6).

Tabla V.6. Título de los anticuerpos séricos de conejo después de la tercera dosis de inoculación

Diluciones del suero de conejo	Densidad óptica Promedio
1:100	3,229
1:500	3,399
1:1000	3,258
1:2000	3,345
1:4000	2,919
1:8000	2,825
1:16000	2,018
1:32000	1,702

Dados los elevados títulos obtenidos con este antisuero, se decidió evaluarlo en los ensayos de ELISA indirecto para la detección del antígeno nativo.

4.4. ELISA INDIRECTO

4.4.1. ELISA INDIRECTO CON EL SOBRENADANTE DE LA EXTRACCIÓN

Con el sobrenadante de la extracción no se observó reactividad en ninguna de las plantas estudiadas como así tampoco en los hongos ensayados.

4.4.2. ELISA INDIRECTO CON EL SEDIMENTO DE LA EXTRACCIÓN

El ensayo de ELISA indirecto aplicado al sedimento de los extractos de plantas y hongos arrojó los siguientes resultados: la planta E y el hongo *C. kikuchii* NBRC 6711 presentaron reactividad en la dilución 1:100 del extracto enfrentado al suero inmune, pero esta no se observó, en el hongo, en la dilución 1:1000. La planta O, a pesar de mostrar sintomatología de la enfermedad, presentó valores de absorbancia por debajo de la línea de corte (0,350)⁸. No se observó reacción cruzada con hongos de otros géneros (*Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp.) (Tabla V.7.)

⁸ La línea de corte corresponde a la media + 2SD de un triplicado del suero pre-inmune contra la proteína recombinante, siendo este valor de 0,350 para la dilución 1/100 del suero preinmune.

Tabla V.7. Ensayo de ELISA indirecto aplicado al sedimento de los extractos de plantas y hongos

Muestras	Suero Pre-inmune Dil. 1:5000			Suero Inmune Dil. 1:5000		
	Dil.1:100 D.O	Dil. 1:1000 D.O.	Dil. 1:10000 D.O.	Dil. 1:100 D.O	Dil. 1:1000 D.O.	Dil. 1:10000 D.O.
Planta E	0,147	0,153	0,192	1,032	0,770	0,214
Planta O	0,155	0,155	0,216	0,152	0,112	0,124
CK6711	0,213	0,223	0,162	0,404	0,160	0,101
<i>Cladosporium sp.</i>	0,249	0,305	0,187	0,201	0,216	0,134
<i>Penicillium sp.</i>	0,187	0,234	0,170	0,192	0,132	0,109
Blanco	0,036	0,058	0,030	0,033	0,032	0,035

DO: densidad óptica; E y O: extractos de plantas con sintomatología del tizón de la hoja; CK6711: extracto del hongo *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (control positivo); extractos de hongos pertenecientes a géneros diferentes de *Cercospora*: *Cladosporium sp.* y *Penicillium sp.*

Al repetir el ensayo no se pudieron reproducir los resultados obtenidos previamente. Por otro lado, al aplicar la técnica de ELISA indirecto al resto de las plantas con sintomatología de la enfermedad, conservadas en el laboratorio, no se obtuvieron resultados positivos. Por lo tanto la técnica careció de reproducibilidad y sensibilidad.

Para explicar estos resultados se plantearon dos hipótesis: que el problema se debía a una extracción deficiente de la proteína o que la misma no se pegaba correctamente a la fase sólida.

Sobre esta base, se propusieron dos nuevas estrategias para resolver alternativamente uno u otro inconveniente. Por un lado se trabajó con un ELISA de inhibición para evaluar la unión de los anticuerpos específicos anti-CFP a los tejidos vegetales no solubles, y por otro con la técnica de Dot blot sobre membrana de nitrocelulosa, utilizando el extracto soluble antes evaluado en el ensayo de ELISA. Esta última estrategia se utilizó ya que la nitrocelulosa cuenta con mayor capacidad adsorbente que las placas de poliestireno, como se comentara previamente.

4.5. ELISA DE INHIBICIÓN

4.5.1. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO

Los valores obtenidos en la titulación se observan en la Tabla V.8. La dilución elegida fue de 1/160000, la cual arrojó un valor de absorbancia intermedio dentro del rango de DO, lo que aseguró condiciones de no saturación del anticuerpo en esta dilución.

Tabla V.8. Determinación del título de anticuerpos policlonales

Dilución	Densidad Óptica
1/5000	*
1/10000	*
1/20000	*
1/40000	2,507
1/80000	1,827
1/160000	1,417
1/320000	0,795
1/640000	0,599
1/1280000	0,380

*valores fuera del rango de lectura

4.5.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LA PROTEÍNA SOLUBLE DETECTABLE MEDIANTE ELISA DE INHIBICIÓN

El 100% de reactividad (0% de inhibición) correspondió al valor de absorbancia igual a 1,376. En base a este valor se detectó la proteína soluble dentro de las concentraciones comprendidas entre 1 y $1 \cdot 10^{-6}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla V.9.; Figura V.15.).

Tabla V.9. Lectura de las distintas concentraciones de la proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y porcentajes de inhibición

Concentración de la proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Densidad Óptica	% de inhibición
1	0,082	94,040
10^{-1}	0,146	89,390
10^{-2}	0,383	72,166
10^{-3}	1,020	25,873
10^{-4}	0,990	28,053
10^{-5}	1,098	20,204
10^{-6}	1,348	2,035
10^{-7}	1,451	

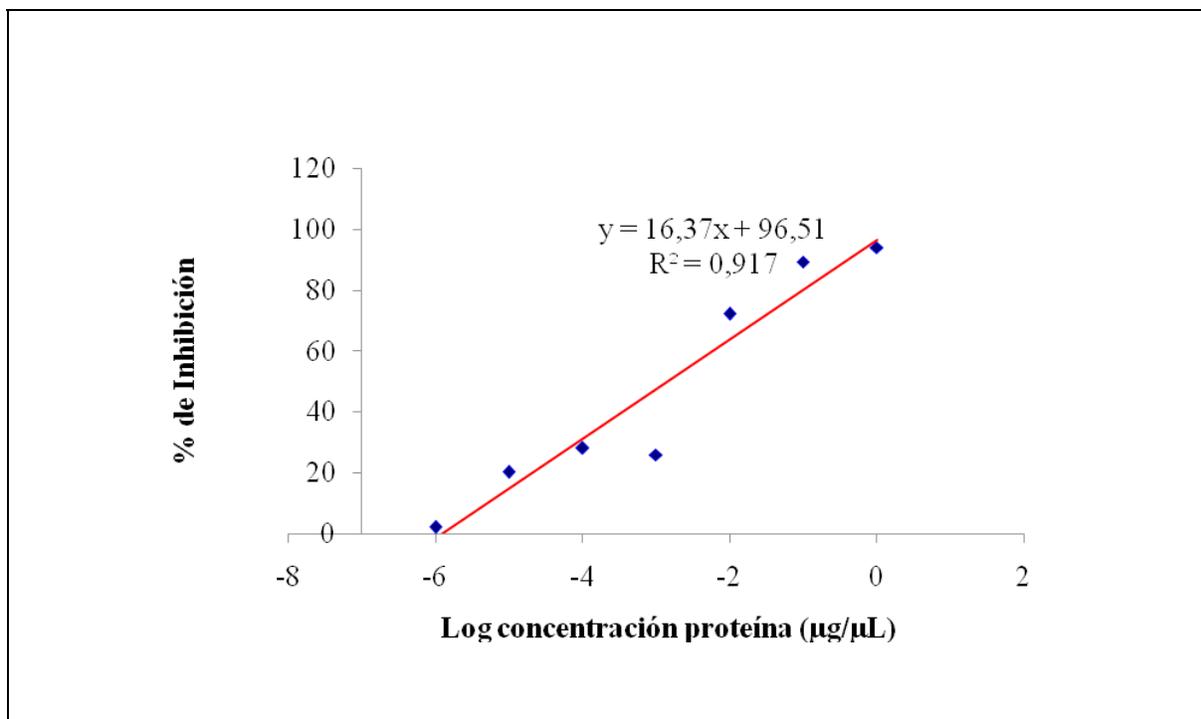


Figura V.15. Inhibición expresada en porcentaje según las diferentes concentraciones de la proteína soluble, detectada mediante el ELISA de inhibición

4.5.3. DETERMINACIÓN DE LA LÍNEA DE CORTE

El valor de la línea de corte fue 1,414. Como ya se comentó en el punto 3.2.4.3 se consideró como criterio de línea de corte al promedio de las densidades ópticas $- 2$ SD, que en este caso correspondió a un valor de 1,34 (Tabla V.10).

Tabla V.10. Lectura de las absorbancias obtenidas con la técnica de ELISA de inhibición en plantas sanas

Muestra	D.O.
Planta 1	1,404
Planta 2	1,445
Planta 3	1,410
Planta 4	1,433
Planta 5	1,369
Planta 6	1,488
Planta 7	1,374
Planta 8	1,363
Planta 9	1,418
Planta 10	1,433
Promedio	1,414

DO: densidad óptica

4.5.4. DESARROLLO DE LA TÉCNICA

En la Tabla V.11 se muestran los resultados del ELISA de inhibición. El valor de DO en ausencia de tejido fue de 1,597 (M 37). Habiendo efectuado el cálculo del porcentaje de inhibición correspondiente al valor de corte igual a 1,34, se consideró como marcador de ausencia de CFP en el tejido foliar un valor menor al 16%.

De la observación de la tabla surge que tanto las plantas con y sin sintomatología y las cepas de referencias, CK6711 y CS6715, mostraron porcentajes de inhibición superiores al 32%. Además se detectó reactividad cruzada con los géneros *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Alternaria* sp. que mostraron porcentajes de inhibición del 17,5%, 40,9% y 63,9%, respectivamente.

Tabla V.11. Determinación del ELISA de inhibición a plantas de soja con sintomatología de la enfermedad por *Cercospora*

M	D.O.	% de inhibición	M	D.O.	% de Inhibición
1	0,720	55,0	20	1,060	34,0
2	0,554	65,0	21	0,869	45,6
3	0,607	62,0	22	0,706	55,8
4	0,336	79,0	23	0,396	75,2
5	0,520	67,5	24	0,553	65,4
6	0,488	69,4	25	0,779	51,2
7	0,477	70,1	26	0,500	68,7
8	0,771	51,7	27	0,584	63,4
9	0,745	53,4	28	0,656	59,0
10	0,716	55,2	29	0,869	45,6
11	0,801	49,9	30	0,656	59,0
12	0,903	43,5	31	0,923	42,2
13	1,194	25,2	32	0,868	45,6
14	0,899	43,7	33	0,944	40,9
15	0,813	49,1	34	0,577	63,9
16	1,222	23,5	35	1,318	17,5
17	0,698	56,3	36	0,526	67,1
18	0,626	60,9	37	0,554	65,3
19	0,768	52,0		1,597	0,00

DO: densidad óptica; Muestras: 1-29: plantas con sintomatología del tizón de la hoja; 30 y 31: plantas sin sintomatología del tizón de la hoja; 32: micelio de *Penicillium* sp.; 33: micelio de *Alternaria* sp.; 34: micelio de *Cladosporium* sp.; 35: micelio de *Cercospora kikuchii* NBRC 6711; 36: micelio de *Cercospora sojina* NBRC 6715; 37: 100% de reactividad del ensayo.

4.6. TÉCNICA DE DOT BLOT

La otra estrategia planteada fue la técnica de Dot Blot sobre membrana de nitrocelulosa utilizando extractos solubles de las plantas.

El suero adsorbido reconoció una banda antigénica de 45 KDa que fue reconocida, contrariamente a las demás, en todas las diluciones y correspondería a la proteína CFP. De las 3 diluciones séricas que se probaron (1/100, 1/500 y 1/1000), 1/500 fue la que mostró mayor sensibilidad y especificidad (Figura V.16).

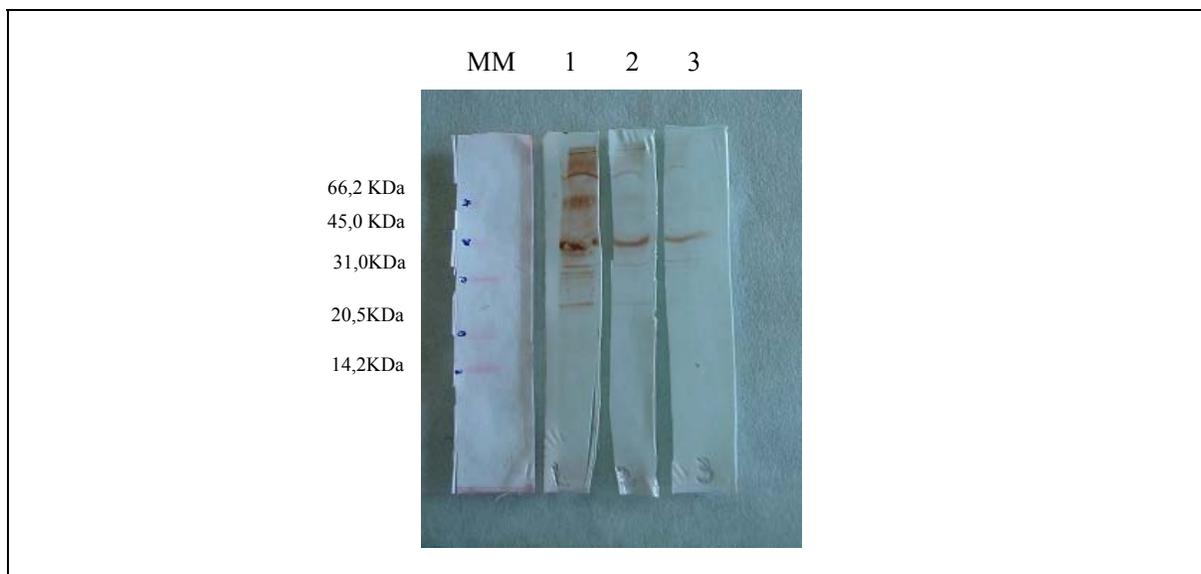


Figura V.16 Detección de la proteína CFP en un extracto del hongo *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 mediante “Western blot”, utilizando distintas diluciones del suero de conejo
Calle MM: marcador de peso molecular en Kilodaltons (kDa) (BioRad); calle 1- dilución del suero 1/100; calle 2- dilución del suero 1/500; calle 3- dilución del suero 1/1000.

En la Figura V.17 se visualizan los resultados de la técnica de Dot blot observándose señales de diferente intensidad según se tratara de plantas sanas o de las plantas enfermas.

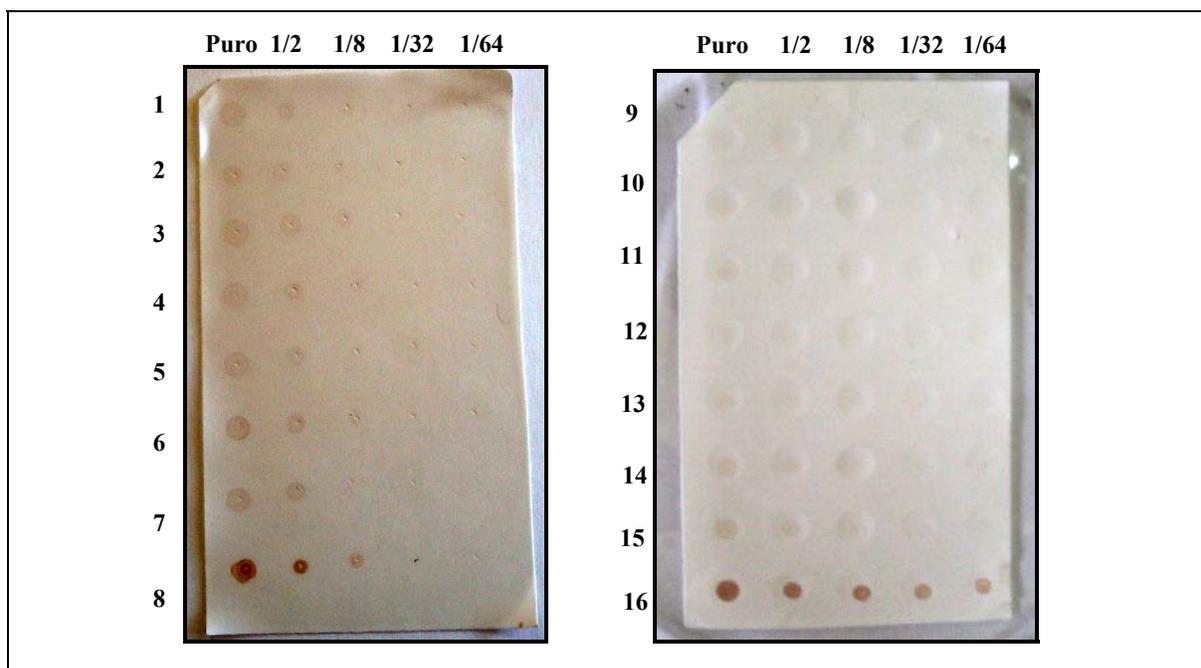


Figura V.17. Dot blot de los extractos solubles de las plantas y control positivo
1-8: plantas con sintomatología de la enfermedad; 9-15: plantas sanas; 16: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 (control positivo)

El “score” de cada una de las muestras se presenta en la Tabla V.12

Tabla V.12. Determinación de los valores de “score” para los extractos de las plantas y control positivo

Muestra	Intensidad de los “dot blot” y cálculo del “score”	“Score”	Muestra	Intensidad de los “dot blot” y cálculo del “score”	“Score”
1	2x2x2x1x1	8	9	1x1x1x1x1	1
2	2x2x2x1x1	8	10	2x1x1x1x1	2
3	2x2x2x1x1	8	11	2x1x1x1x1	2
4	2x2x2x1x1	8	12	1x1x1x1x1	1
5	2x2x2x1x1	8	13	1x1x1x1x1	1
6	2x2x2x1x1	8	14	2x1x1x1x1	2
7	2x2x2x1x1	8	15	2x1x1x1x1	2
8	4x4x2x1x1	32	16	4x4x4x4x4	1024

Muestras 1-8: plantas con sintomatología de la enfermedad; Muestras 9-15: plantas sin sintomatología; Muestra 16: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711

La línea de corte obtenida con el programa MedCalc, se observa en la Figura V.18. Para la mejor discriminación entre positivos y negativos se consideró menor o igual a 2 para las plantas sanas y mayor o igual a 4 para las plantas con sintomatología del tizón por *Cercospora*, por lo que el valor de “score” igual o menor a 2 fue considerado como marcador de ausencia de CFP en el tejido foliar.

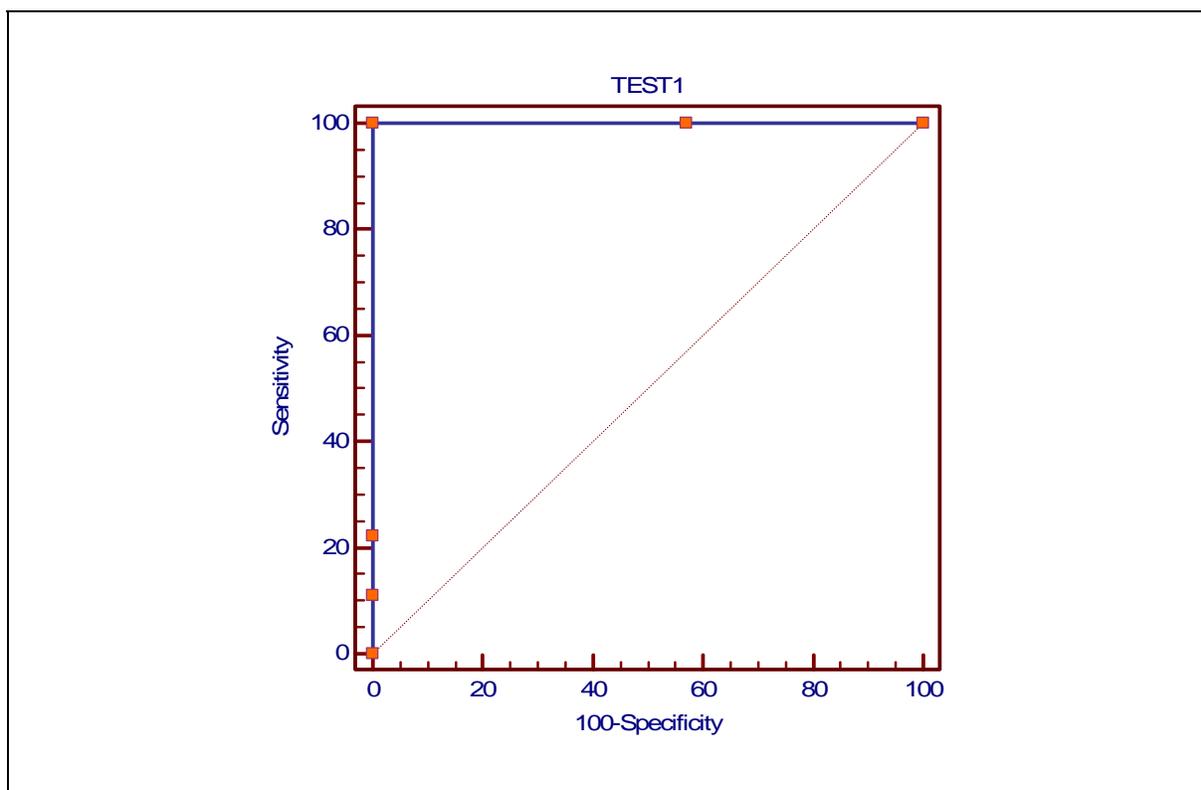


Figura V.18. Construcción de la curva ROC para la determinación de la línea de corte para diferenciar entre plantas sanas y con sintomatología del tizón por *Cercospora*

A manera de ejemplo se presentan algunos resultados de los Dot blot en las Figuras V.19, V.20 y V.21.

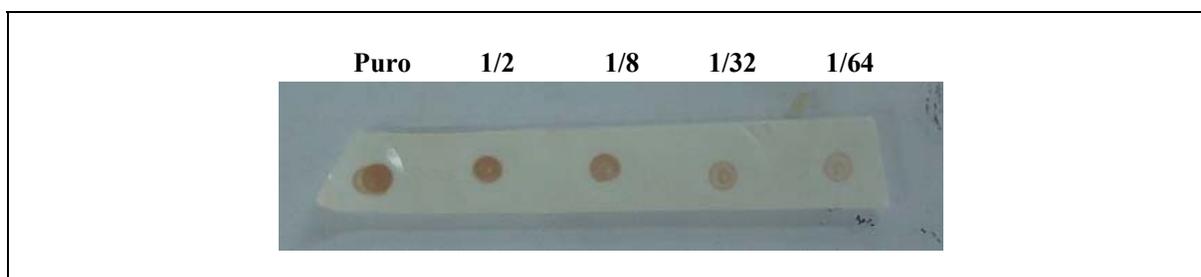


Figura V.19. Imagen de Dot blot aplicado al extracto de *C. kikuchii* NBRC 6711

“Score”= $4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 2 = 512$

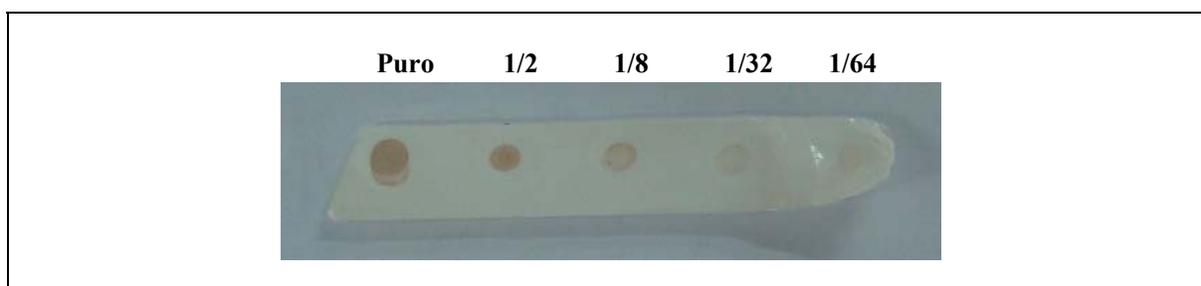


Figura V.20. Imagen de Dot blot aplicado al extracto de *C. sojina* NBRC 6715

“Score”= $4 \times 4 \times 2 \times 1 \times 1 = 32$

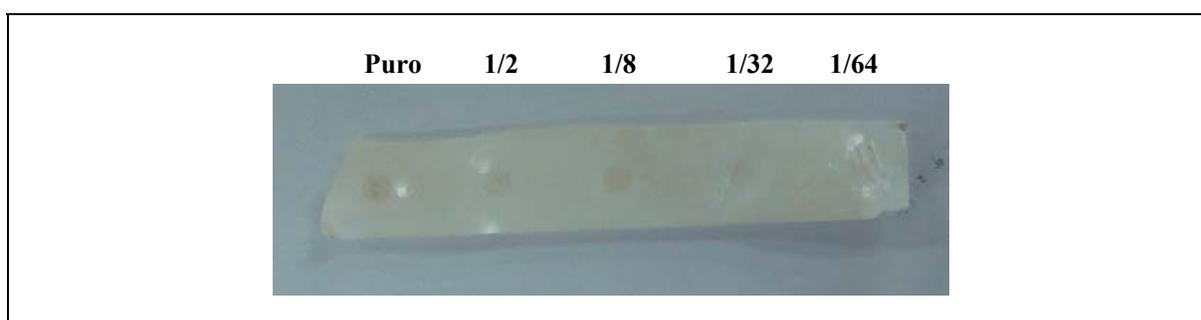


Figura V.21. Imagen de Dot blot aplicado al extracto de *Penicillium* sp

“Score”= $1 \times 1 \times 1 \times 1 \times 1 = 1$

Según el criterio adoptado, los extractos de las cepas de referencia *C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715 presentaron valores de “score” superiores a 4 mientras que el extracto de *Penicillium* sp. (control negativo) presentó un valor menor a 2.

4.7. DETECCIÓN DE ESPECIES DE *CERCOSPORA* POR PCR

Al separar los productos de amplificación obtenidos al utilizar los oligonucleótidos PF y PR, se pudo observar que el hongo correspondiente a la cepa de referencia daba una banda nítida en 450 bp aproximadamente, sin embargo las plantas tanto enfermas como sanas mostraban bandas inespecíficas.

La utilización de los oligonucleótidos CFP-1 y CFP-2 permitió amplificar una porción interna del fragmento *cfp*, de aproximadamente 290 bp. En la Figura V.22 se observa la banda obtenida para las muestras de las plantas con sintomatología del tizón de la hoja y en las cepas de referencia.

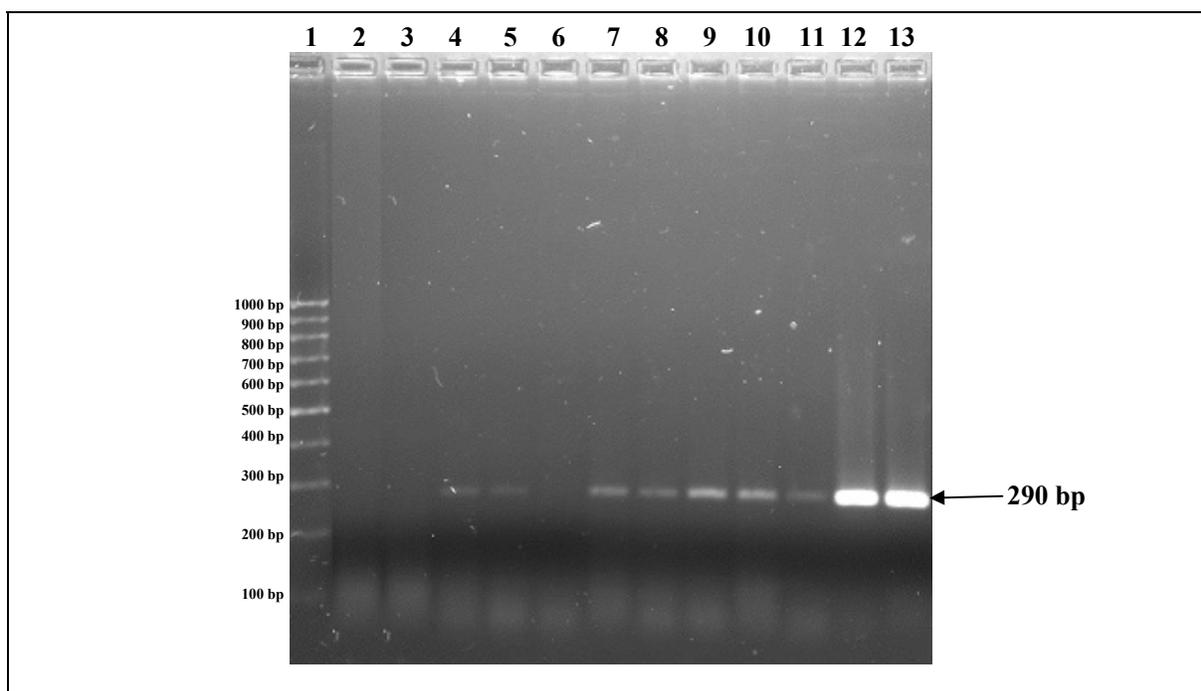


Figura V.22. Ensayo de PCR para la detección del gen *cfp*. Se muestra el gel de agarosa donde se observa la banda de 290 bp correspondiente a la amplificación con los oligonucleótidos CFP-1 y CFP-2. Calles: 1: Marcador de PM 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); 2: *Cladosporium* sp.; 3 y 6: plantas sin sintomatología; 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11: Plantas con sintomatología del tizón de la hoja; 12: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711; 13: *Cercospora sojina* NBRC 6715.

4.8. MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN DE PLANTAS DE SOJA POR ESPECIES DE *CERCOSPORA*

En la Figura V.23 se observan plantas de soja incubadas bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento.



Figura V.23. Plantas de soja incubadas en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas

Durante el ensayo preliminar efectuado para establecer el período de incubación, es decir el tiempo que transcurre desde la inoculación del patógeno hasta la aparición de los primeros síntomas visibles de la enfermedad, se trabajó con 16 plantas agrupadas de a dos para los distintos tratamientos descritos en el punto 3.5.4.

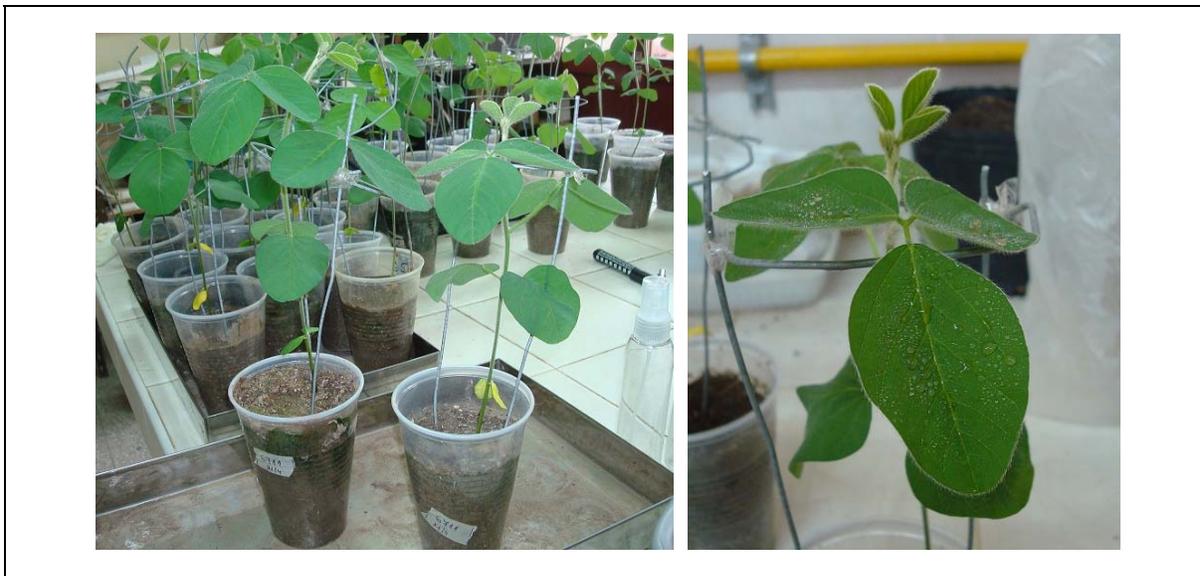


Figura V.24. Plantas de soja en estadio V3. a-Plantas sin inocular b-Planta inoculada

Fuente: Observación personal

Los tres aislamientos regionales (CK15, CK23 y CK32) y las cepas de referencia (*C. kikuchii* NBRC 6711 y *C. sojina* NBRC 6715) con distintas capacidades de producción de cercosporina fueron capaces de infectar las plantas (Figura V.24).

A los 5 días post-inoculación, tanto la cepa patrón de CK6711 como los aislamientos regionales de esta especie (CK23 y CK32), produjeron lesiones compatibles con el tizón de la hoja, al observarlas visualmente. Con la lupa estereoscópica se pudo ver que los hongos productores de alta concentración de cercosporina presentaron, en ambas caras de la hoja, lesiones angulares o irregulares, que coalescieron formando áreas necróticas con un halo rojo debido a la presencia de la toxina cercosporina (Figura V.25. 3a y 3b, 4a y 4b, 5a y 5b). Mientras que CK15, productor de baja concentración de cercosporina mostró lesiones pequeñas sobre la hoja sin presencia de halo rojo (Figura V.25. 2a y 2b).

La planta inoculada con CS6715 presentó manchas de color castaño rojizo o grisáceas oscuras, rodeada de un delgado margen marrón rojizo (Figura V.25. 6a y 6b). A mayor aumento se pudieron distinguir, sobre la lesión, los conidióforos (Figura V.26).

Por su parte, *Cladosporium* sp. produjo una lesión diferente a las anteriores (Figura V.25. 7a y 7b).

Con respecto a la planta tratada con agua (control negativo) no se observó ningún tipo de lesión.

Efectuadas las observaciones macro y microscópicas se corroboró que el modelo experimental arrojó resultados satisfactorios, ya que todas las plantas que se inocularon se infectaron, lo que permitió aplicarlo posteriormente para evaluar la precocidad de la detección del patógeno al utilizar las técnicas propuestas.

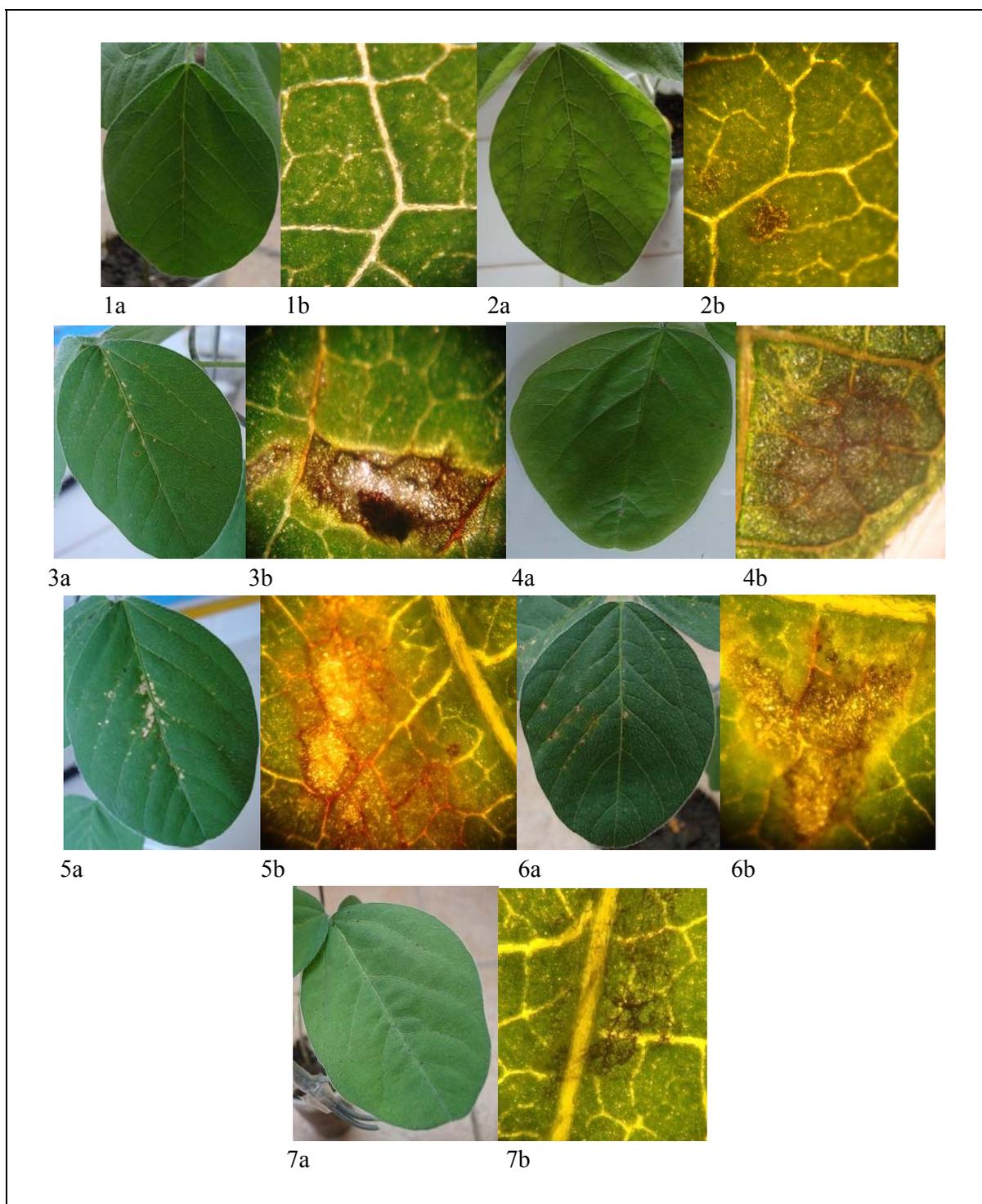


Figura V.25. Plantas de soja a los 5 días post-inoculación

a: Observación de la hoja a simple vista; b: Observación de la hoja con lupa estereoscópica

1a y 1b-planta tratada con agua, 2a y 2b-planta inoculada con CK15, 3a y 3b-planta inoculada con CK23, 4a y 4b-planta inoculada con CK32, 5a y 5b- planta inoculada con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711, 6a y 6b-planta inoculada con *Cercospora sojina* NBRC 6715, 7a y 7b-planta inoculada con *Cladosporium* sp.



Figura V.26: Planta inoculada con *Cercospora sojina* NBRC 6715. Se observan los conidióforos sobre la lesión

4.8.1. EVALUACIÓN DE LA PRECOCIDAD DE LA INFECCIÓN EN EL MODELO POR DETECCIÓN DE LA LESIÓN

A las 4 y 24 h post-inoculación no se observaron a simple vista pero si mediante lupa estereoscópica, lesiones en el tejido foliar de las plantas inoculadas, tanto con las cepas de referencia como con el aislamiento regional productor de alta concentración de cercosporina, CK32. Las plantas inoculadas con CK15 también presentaron lesiones en el tejido foliar al observarlas con la lupa estereoscópica.

A partir de los 4 d de efectuada la inoculación, se observaron lesiones a simple vista en las plantas infectadas con las cepas de referencia y CK32. Por el contrario no se detectaron daños en las plantas tratadas con CK15, con agua y las sin inocular.

En las Figuras V.27 y V.28 se muestran, a modo de ejemplo, dos de los ensayos de inoculación realizados.

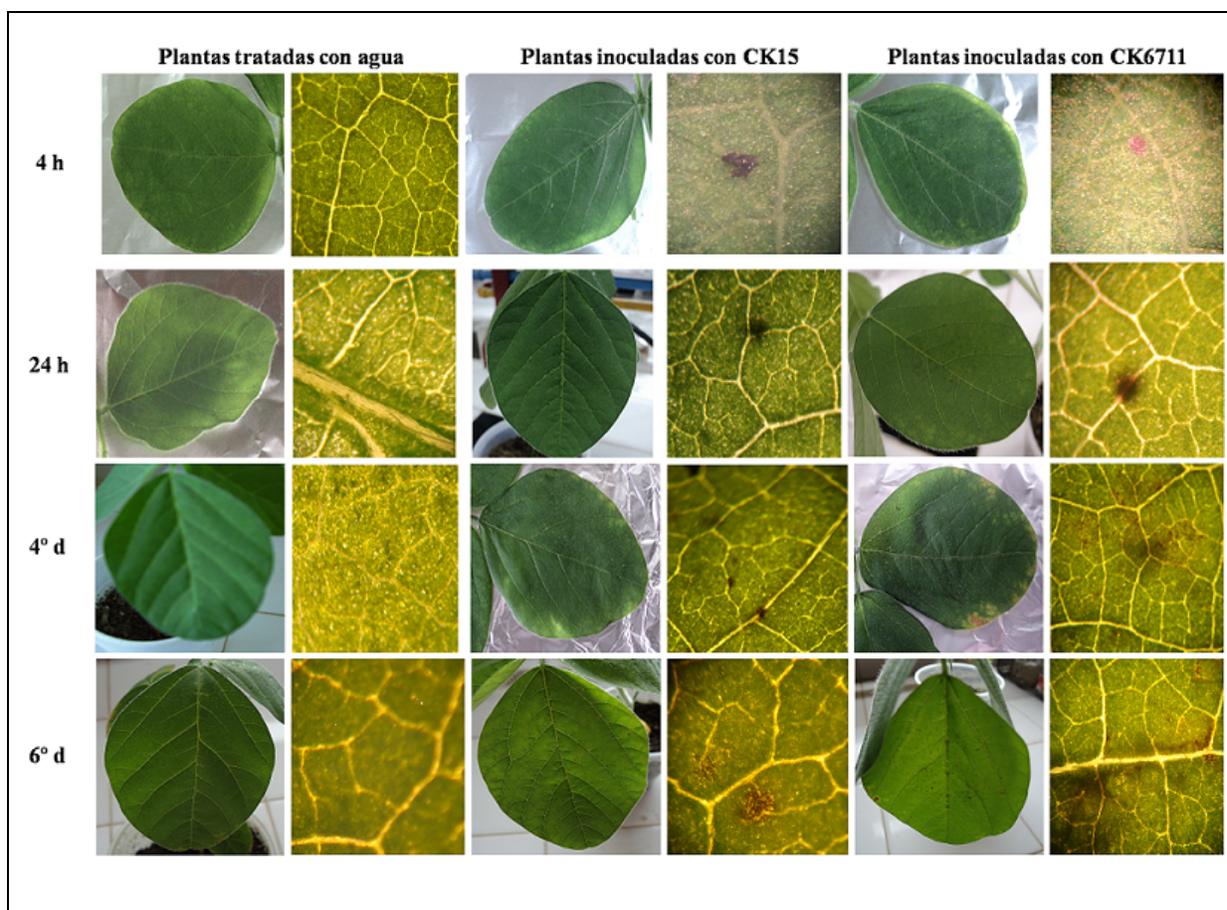


Figura V.27. Ensayo de inoculación de plantas. Observación macroscópica (columna izquierda) y con lupa estereoscópica (columna derecha) del tejido foliar de las plantas de soja inoculadas y recolectadas a distintos intervalos de tiempo post-inoculación
 CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711

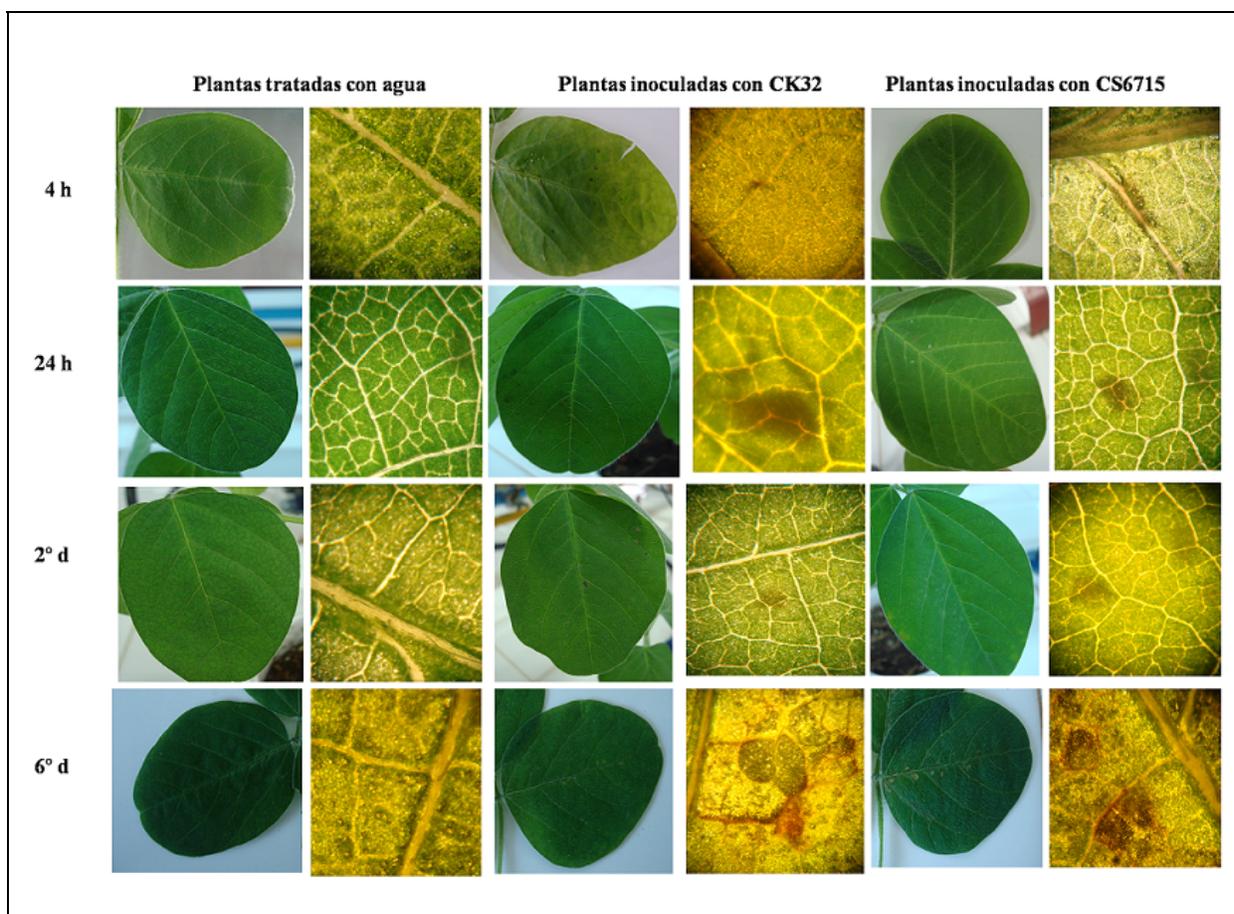


Figura V.28. Ensayo de inoculación de plantas. Observación macroscópica (columna izquierda) y con lupa estereoscópica (columna derecha) del tejido foliar de las plantas de soja inoculadas y recolectadas a distintos intervalos de tiempo post-inoculación CS6715: *Cercospora sojina* NBRC 6715

4.9. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DOT BLOT PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA INFECCIÓN

A los 4 d de la inoculación, los extractos de las plantas mostraron un valor de “score” de 32 lo que indica, teniendo en cuenta la línea de corte, la presencia de la proteína CFP en el tejido foliar. Las plantas recolectadas a las 4 y 24 h y 2 d post-inoculación presentaron valores por debajo de 2 al igual que las plantas tratadas con agua estéril y las sin inocular.

El control positivo presentó valores de “score” comprendidos entre 128 y 512, mientras que el control negativo un valor igual a 1.

A manera de ejemplo, se muestran las imágenes representativas de los Dot blot a distintos tiempos post-inoculación (Figuras V.29, V.30 y V.31).

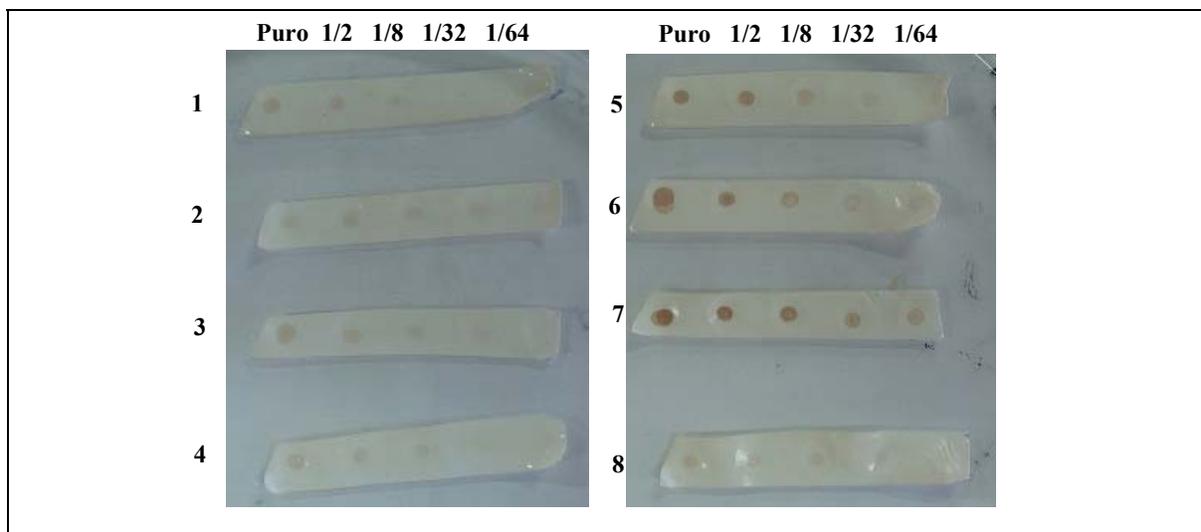


Figura V.29. Imágenes de Dot blot aplicado a extractos de plantas infectadas con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 a diferentes tiempos post-inoculación

1: planta inoculada con agua; 2: planta sin inocular; 3, 4, 5 y 6: Plantas inoculadas con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 y recolectadas a 4 h, 24 h, 4 d y 6 d, respectivamente. 7: Control positivo (extracto de *C. kikuchii* NBRC 6711). 8: Control negativo (extracto de *Penicillium* sp.).

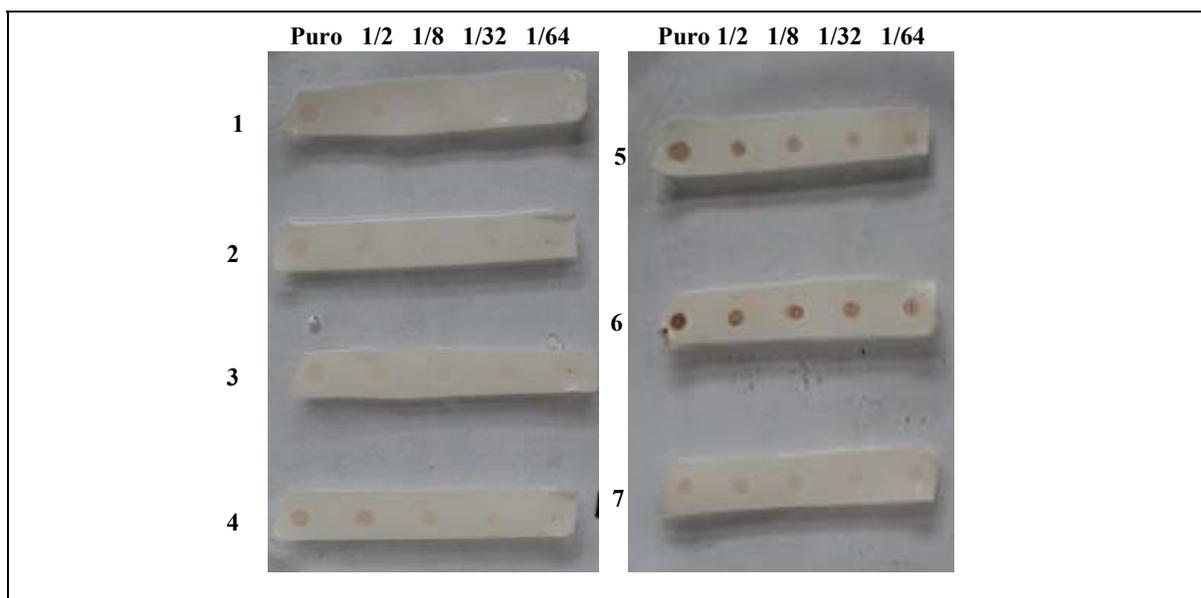


Figura V.30. Imágenes de Dot blot aplicado a extractos de plantas infectadas con *Cercospora sojina* NBRC 6715 a diferentes tiempos post-inoculación

1: planta inoculada con agua. 2, 3, 4 y 5: plantas inoculadas con *Cercospora sojina* NBRC 6715 y recolectadas a las 4 h, 24 h, 2 d y 6 d, respectivamente. 6: control positivo (extracto de *Cercospora kikuchii* NBRC 6711). 7: control negativo (extracto de *Penicillium* sp.).

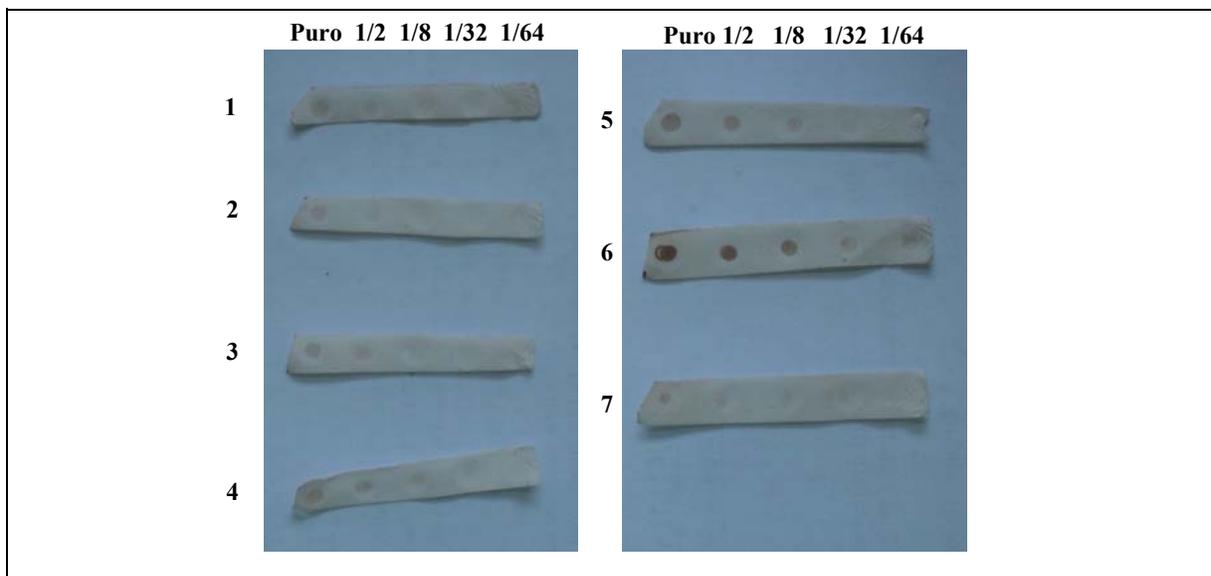


Figura V.31. Imágenes de Dot blot aplicado a extractos de plantas infectadas con CK32 a diferentes tiempos post-inoculación

1: planta inoculada con agua. 2, 3, 4 y 5: plantas inoculadas con el aislamiento regional CK32 y recolectadas a las 4 h, 24 h, 2 d y 6 d, respectivamente. 6: control positivo (extracto de *Cercospora kikuchii* NBRC 6711). 7: control negativo (extracto de *Penicillium* sp.).

4.10. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA INFECCIÓN

La amplificación por PCR con los “primers” CFP-1 y CFP-2 y las condiciones de reacción expresadas en el punto 3.4.2., mostró un fragmento de 290 bp aproximadamente, a partir de las 4 h de la inoculación de las plantas con las cepas de referencia CK6711 y CS6715, y CK32. La señal se fue intensificando en el tiempo.

No se detectó amplificación para ninguno de los tiempos de muestreo cuando se trató de plantas inoculadas con CK15, con agua estéril y las sin inocular (Figuras V.32 y V.33).

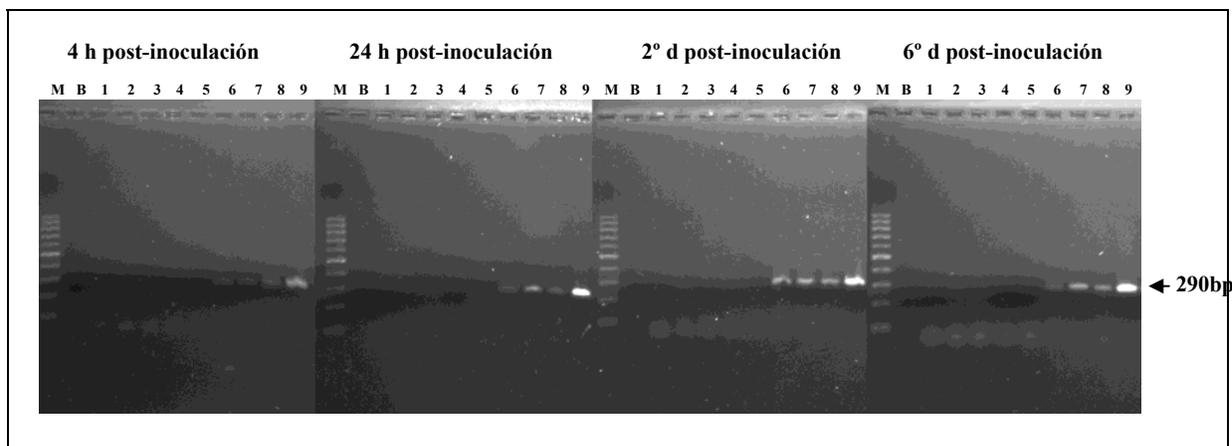


Figura V.32. Amplificación del fragmento *cfp* mediante PCR en plantas de soja, a distintos tiempos post-inoculación

M: marcador 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); B: blanco de reactivos; 1: planta sin inocular; 2: planta tratada con agua; 3, 4 y 5: plantas inoculadas con CK15; 6, 7 y 8: plantas inoculadas con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711; 9: control positivo (*Cercospora kikuchii* NBRC 6711)

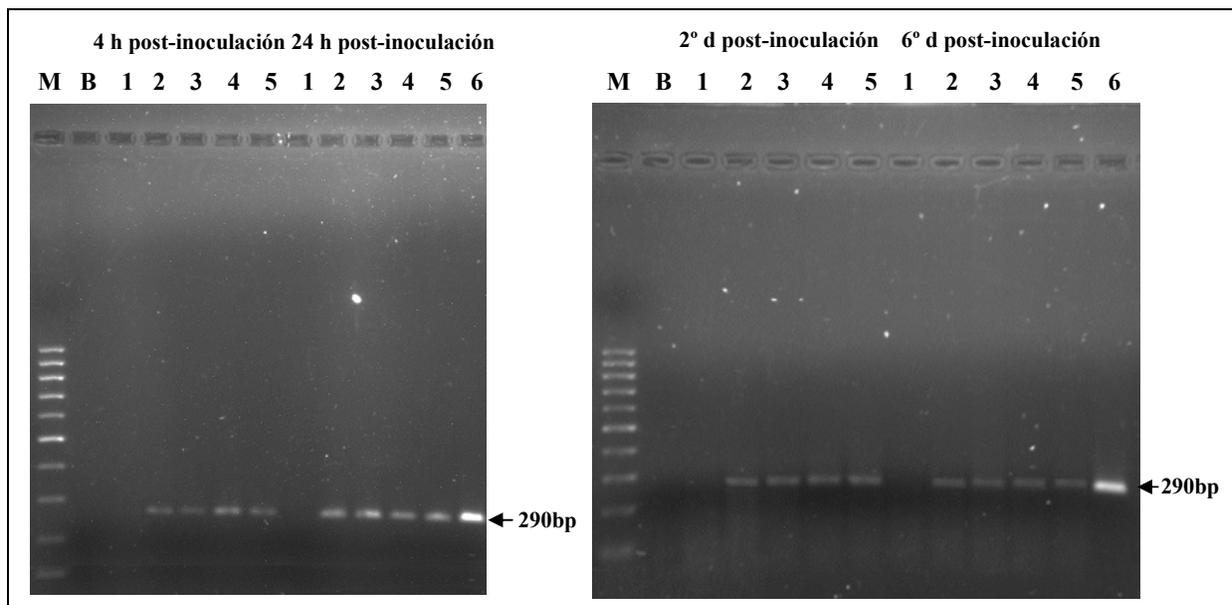


Figura V.33. Amplificación del fragmento *cfp* mediante PCR en plantas de soja, a distintos tiempos post-inoculación

M: marcador 100-bp DNA Ladder (InbioHighway, Argentina); B: blanco de reactivos; 1: planta tratada con agua; 2 y 3: plantas inoculada con CK32; 4 y 5 plantas inoculada con *Cercospora soja* NBRC 6715; 6: control positivo (*Cercospora kikuchii* NBRC 6711)

La técnica de PCR permitió detectar la proteína CFP en etapas tempranas de la infección por especies de *Cercospora*, aún cuando no se visualizaban síntomas de enfermedad.

5. DISCUSIÓN

El diagnóstico exacto de una enfermedad y la identificación precisa del patógeno involucrado son requisitos esenciales para entender las enfermedades de las plantas y poder tomar medidas efectivas

para el manejo de los cultivos. Se realizan siguiendo una serie de pasos que comienzan por identificar la planta afectada, examinar el área de cultivo, determinar los síntomas primarios y los signos de la enfermedad para concluir con el aislamiento e identificación del agente causal (Sillón e Ivancovich, 2004).

Los síntomas no siempre ofrecen un diagnóstico seguro ya que diferentes agentes pueden producir síntomas similares. Por el contrario, los signos, que son las estructuras que el patógeno produce como parte de su crecimiento, permiten realizar un diagnóstico más seguro al ser correctamente identificados (Sillón e Ivancovich, 2004).

Sin embargo, muchas veces la observación de los síntomas y/o de los signos suele ser insuficiente para alcanzar un resultado certero y se requieren técnicas de laboratorio para la identificación del agente causal. Los métodos tradicionales de identificación de fitopatógenos pueden ser lentos y poco concluyentes, lo que ha llevado a la búsqueda de técnicas de diagnóstico alternativas (Ward y col., 2004).

Para evitar las grandes pérdidas económicas que ocasionan las enfermedades producidas por *Cercospora*, en especial *C. kikuchii* y *C. sojina*, es que se requieren técnicas de detección del agente causal que sean específicas, sensibles y rápidas.

A los fines de contribuir al diagnóstico de la enfermedad por especies de *Cercospora* se desarrollaron y evaluaron, en este trabajo de tesis, diferentes metodologías para la detección del patógeno en plantas de soja.

La primera de las técnicas aplicadas fue un procedimiento inmunoenzimático, tipo ELISA, caracterizado por su sencillez y bajo costo (Pérez Pérez y Pérez Sevilla, 2009).

Esta técnica fue difundida en la década de los setenta y aún hoy, sigue teniendo vigencia y aplicación para el diagnóstico rápido y masivo de enfermedades en humanos, animales y plantas en todo el mundo, así como también para la detección de micotoxinas. Las diferentes variantes de esta metodología, se utilizan desde hace varios años con resultados satisfactorios para la detección del virus de la tristeza de los cítricos (Batista y col., 2008). También se aplicó esta técnica para demostrar la presencia de *Cercospora beticola* en lesiones en cártamo (Reinhardt y col., 2001; Arboleda y col., 2004; Lartey y col., 2005; Rangel y col., 2006)

Para lograr el objetivo propuesto se seleccionó como antígeno, una proteína específica del género *Cercospora*, cuya detección en el tejido vegetal indicara la presencia del hongo. Luego de una búsqueda de identidad en la base de datos GenBank, utilizando el programa BLAST se pudo corroborar que el gen que codifica la proteína CFP no presentaba homología con genes de otras especies indexadas hasta el momento. Esto coincide con el hecho ya comentado de que *Cercospora* produce una toxina denominada cercosporina, la cual ha sido aislada “in vitro” de al menos 34 especies de *Cercospora* entre las que se encuentran *C. kikuchii* y *C. sojina* (Jenns y col., 1989; Almeida y col., 2005) y cuya producción y secreción está regulada por dicho gen (Callahan y col., 1999; Upchurch y col. 2001). Además la función de esta proteína es la de transportar la toxina hacia el exterior de la célula fúngica confiriéndole resistencia a su actividad.

Los resultados obtenidos al aplicar la técnica de ELISA indirecto, no fueron satisfactorios ya que no se pudo detectar la proteína en el sobrenadante tanto del extracto vegetal como del micelio del hongo. Esto se interpretó como un problema en la solubilización de la misma a pesar de haber utilizado un buffer de extracción similar al informado por Upchurch y col. (2002) quienes sí lograron extraerla del micelio de *C. kikuchii*. Justamente, una de las desventajas que se plantea sobre dicha técnica es que la preparación de los extractos antigénicos resulta laboriosa y genera problemas de contaminación entre muestras, así como la posibilidad de liberar inhibidores vegetales (Batista y col., 2008).

Para resolver el inconveniente de la solubilización y teniendo en cuenta que la proteína podía estar presente en el tejido vegetal, se ensayó una técnica de ELISA de inhibición. Esta metodología permite detectar en una solución, tanto antígenos solubles como particulados. En los ensayos de optimización se demostró que se podía determinar un rango muy amplio de concentraciones de proteínas. Al trabajar con tejidos vegetales o micelio del hongo, esta metodología permitió detectar la proteína presente aunque mostró reactividad cruzada con hongos de géneros diferentes a *Cercospora* (Ward y col., 2004). Un problema similar de reactividad cruzada fue descrito por Larrey y col. (2005) quienes desarrollaron un ensayo de ELISA para demostrar lesiones de *C. beticola* en plantas de cártamo y encontraron reactividad cruzada del ensayo con hongos de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*.

Una de las causas que explicaría la baja especificidad de esta técnica es el uso de anticuerpos policlonales. El desarrollo de los mismos con el grado de especificidad requerido es difícil debido a que al constituir una mezcla de inmunoglobulinas existen mayores probabilidades de reactividad cruzada con antígenos o moléculas relacionadas (Martín de Santos, 2010).

En el caso del presente trabajo, se inoculó a los animales con una proteína recombinante, lo que en principio debía reducir potenciales reactividades cruzadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta posibles impurezas que contaminan a la proteína recombinante luego de su purificación por una columna de pseudoafinidad de níquel y que se deben a la presencia de una mezcla proteica del lisado de bacterias, que presentan afinidad por el níquel resultando el producto no homogéneo, a pesar de que en el PAGE no se detectaron, pero, al no conocerse los antígenos copurificados podría haber existido reactividad cruzada incluso contra componentes no proteicos. Además, la utilización del material insoluble de los tejidos vegetales y micelios de hongos, podría estar concentrando la disponibilidad de determinantes antigénicos que presentaban reactividad cruzada hacia los anticuerpos policlonales obtenidos.

Otra de las hipótesis que se planteó para la continuidad del trabajo fue que la proteína CFP se solubilizaba pero no se adhería adecuadamente a la superficie de inmovilización utilizada para este tipo de ELISA.

En concordancia con el razonamiento mencionado, se evaluó el extracto soluble pero utilizando membrana de nitrocelulosa como superficie de adsorción para mejorar la detección del fitopatógeno mediante Dot blot o Dot-ELISA (Ferrer Gual, 2008). Justamente, la principal diferencia entre el ELISA y el Dot blot se encuentra en la superficie usada para la unión del antígeno elegido. Se sustituyó la placa de plástico por una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se aplicó un pequeño vo-

lumen de la muestra. La diferencia entre ambas superficies de adsorción es que la nitrocelulosa permite la inmovilización de un rango mayor de características fisicoquímicas de los antígenos que la placa de ELISA (Spessot y col., 2004; Ferrer Gual, 2008).

Para optimizar la técnica de Dot blot y a fin de maximizar la solubilización del extracto antigénico, se profundizó la búsqueda bibliográfica tendiente a lograr la extracción de proteínas fúngicas y se optó por la metodología propuesta por Rollins y col. (1993), donde tanto la planta como el micelio del hongo se dejaban en contacto con el buffer de extracción a 4°C, en oscuridad, durante toda la noche, obteniendo muy buenos resultados.

También y de manera similar a lo informado por Lartey y col., (2005), se decidió eliminar los anticuerpos inespecíficos presentes en el suero de conejo adsorbiéndolos con el extracto de un hongo no productor de la proteína CFP. Para esto se utilizó el aislamiento regional CK15 productor de baja concentración de cercosporina, que al desarrollar sobre APD no difundió pigmento rojo al medio y que causó lesiones cloróticas pequeñas en el tejido foliar de la planta de soja sobre la cual se inoculó. La adsorción permitió eliminar las reactividades inespecíficas observadas en los Western blot.

El cambio de la superficie de pegado junto con la optimización en la preparación del extracto antigénico permitió obtener la sensibilidad necesaria para la detección del antígeno. Por otro lado, la adsorción del suero con CK15 disminuyó las inespecificidades. Sumado a esto, la incorporación de un “score” facilitó la interpretación de los resultados logrando una técnica fácil de usar, rápida, económica y que podría ser utilizada en el campo como un método de screening (Ndao, 2009).

Además del desarrollo de técnicas inmunoquímicas, se decidió evaluar la utilización de una técnica molecular. Esta idea surgió a partir de lo exitoso que resultó la obtención del fragmento codificante de la CFP en *C. kikuchii*, cuando el mismo se extrajo para ser clonado en un vector de expresión. Lartey y col. (2003) presentaron un protocolo de PCR en tiempo real para la detección rápida de *C. beticola* en tejidos de remolacha azucarera pero a diferencia de lo planteado en este trabajo de tesis, amplificaron un fragmento correspondiente al gen actina de *Cercospora*. Este tipo de metodología también fue aplicada por otros autores, en la detección de *Phytophthora capsici* en plantas de Chile con síntomas de marchitez utilizando oligonucleótidos dirigidos contra secuencias específicas del gen de cutinasa (Rico-Guerrero y col., 2004), y por Pavón Moreno y col. (2008) quienes detectaron *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *Alt a 1* que codifica el principal alérgeno de *A. alternata*.

Los resultados obtenidos mostraron que los oligonucleótidos CFP-1 y CFP-2, diseñados para amplificar una porción interna del fragmento *cfp*, fueron altamente específicos para detectar especies de *Cercospora*, a una temperatura de alineamiento de 58°C durante los 35 ciclos de PCR, tanto a partir de extracciones de ADN del micelio del hongo desarrollado “in vitro”, como de plantas inoculadas con el hongo aún cuando no se observaba sintomatología de la enfermedad.

La PCR es una técnica que presenta grandes ventajas en la identificación de los hongos. Es un método rápido, ya que el proceso de extracción de ADN, amplificación del mismo y electroforesis pueden ser llevados a cabo dentro de las 24 h, lo que disminuye en forma sustancial el tiempo que insume el realizar un diagnóstico mediante los métodos tradicionales; examen directo de colonias y

cultivo (Cabezas Vergara y col., 2006). La sensibilidad es alta, porque permite detectar bajas concentraciones del ADN que se desea amplificar en casi cualquier tipo de muestras y con una especificidad elevada, determinada especialmente por la secuencia de los oligonucleótidos utilizados y por las condiciones del templado del ADN (Rico Guerrero y col., 2004; Saavedra Rodríguez y col., 2004). No obstante, requiere de un laboratorio con infraestructura, equipamiento costoso y personal entrenado, que no siempre se encuentra disponible (Notomi y col., 2000).

Una alternativa de esta metodología interesante de probar en futuros estudios, es el llamado método LAMP, “loop-mediated isothermal amplification”, que amplifica el ADN con alta especificidad, eficacia y rapidez en condiciones isotérmicas. Este método es simple y fácil de realizar ya que no necesita de un termociclador para la amplificación del ADN, sino que utiliza un baño de agua caliente (Notomi y col., 2000). Se lo ha utilizado también para el diagnóstico molecular de virus y parásitos (Ndao, 2009).

El desarrollo de métodos de inoculación artificial bajo condiciones controladas ha sido una de las principales prioridades en las investigaciones con hongos fitopatógenos, pues permite valorar cualitativa y cuantitativamente la expresión de la resistencia sobre un determinado hospedante; así como mejorar y simplificar los procedimientos de selección en los programas de mejoramiento genético (Bernal y col., 2009)

Los ensayos “in vitro” son un complemento necesario e imprescindible de las pruebas a campo. En el laboratorio se pueden efectuar evaluaciones en condiciones controladas, de modo de minimizar los efectos del ambiente frente a los efectos de los genotipos. La optimización de dichas condiciones requiere el desarrollo de un modelo de infección reproducible. Cuando esto se logra, además de obtener condiciones de infección estandarizadas, los resultados se obtienen en un periodo de tiempo mucho más corto que en el caso de los ensayos de campo (Villegas Fernández, 2012).

En el presente trabajo, el desarrollo de un método de inoculación artificial bajo condiciones controladas permitió reproducir los síntomas de la enfermedad al aplicar el patógeno en tejidos de plantas sanas, determinar el tiempo de aparición de las lesiones observadas a simple vista, evaluar las técnicas de Dot blot y PCR optimizadas previamente, para la detección del hongo en la planta y determinar la correlación entre la virulencia del patógeno y la producción de la toxina.

Coincidiendo con lo observado por Almeida y col. (2005), en las experiencias llevadas a cabo durante el desarrollo de este trabajo de tesis, los síntomas comenzaron a hacerse visibles sobre las hojas de las plantas a los 5 d después de la inoculación. En cuanto a las lesiones observadas en las plantas inoculadas, los resultados fueron semejante a los obtenidos en otros trabajos cuando inocularon plantas de soja con aislamientos de *C. kikuchii* productores de distintas concentraciones de cercosporina (Almeida y col., 2005). Upchurch y col. (1991) fueron los primeros que consideraron que la cercosporina era un factor de patogenicidad de *C. kikuchii* al observar que mutantes de este hongo que carecían de la capacidad de sintetizarla, no eran capaces de causar infección cuando se inoculó sobre las hojas de soja.

Hay que destacar que, cuando se realizó la PCR para las plantas inoculadas con el aislamiento regional CK15, no se detectó la banda de 290 bp correspondiente al gen *cfp*. Cabe recordar que este

hongo producía cercosporina en concentraciones muy bajas y provocaba lesiones pequeñas, lo que podría deberse a un hecho similar a lo informado por Daub y col. (2005) quienes observaron que mutantes de *C. kikuchii* que presentaban una disrupción del gen *cfp*, producían una reducción significativa tanto en la producción de cercosporina como en el desarrollo de los síntomas en la soja. Esto sugiere que dicho gen cumple un rol fundamental en la regulación de la producción de la toxina. Por lo tanto, el hecho de detectarlo en una planta enferma indicaría la presencia de un hongo capaz de producir cercosporina y por consiguiente capaz de enfermar dicha planta.

La sensibilidad de la técnica de PCR quedó demostrada al detectar el hongo en la planta a partir de las 4 h de inoculada, aún cuando no se observaban los síntomas macroscópicamente, mientras que el Dot blot lo hizo a partir de los 4 d.

Es importante señalar que ambas cepas de referencia fueron coincidentes en los resultados obtenidos con las técnicas utilizadas. Esto se debe a que ambas especies elaboran cercosporina (Agarwal y Sinclair, 1997) y la proteína que la transporta. Además, como se comentó en el capítulo IV, la alta homología en la secuencia de la región ITS de ambas especies indicaría que las mismas se encuentran fuertemente relacionadas. Tanto el Dot blot como la PCR son técnicas útiles para detectar ambas especies.

La detección de estos fitopatógenos adquiere importancia si se tiene en cuenta que *C. kikuchii* es uno de los hongos prevalentes en la zona central de la provincia de Santa Fe y *C. sojina* ha incrementado su prevalencia, incidencia y severidad, debido a las condiciones climatológicas imperantes en la actualidad en la misma zona, generando pérdidas incalculables y merma en la productividad (Carmona y col., 2010).

CONCLUSIONES

Las enfermedades de las plantas reducen significativamente el rendimiento de los cultivos impactando sobre la producción agroalimentaria. De hecho, en numerosas ocasiones, en la historia de la agricultura, se ha relatado que enfermedades de diversas etiologías han conmocionado a las sociedades porque han devastado los cultivos originando, entre otros efectos, hambruna en la población, elevada pérdidas económicas y desastres ecológicos.

El primer objetivo planteado en este trabajo de tesis, fue la caracterización fenotípica de especies de *Cercospora* aisladas de diferentes regiones de la provincia de Santa Fe. Los datos obtenidos a partir de este estudio revelaron que:

- Tanto la población de *C. kikuchii* como de *C. sojina* presentaron un alto grado de variación fenotípica. Los aislamientos fúngicos mostraron colonias con diferentes aspectos tanto en el color como en el tamaño de las mismas, por lo cual no se pudieron establecer caracteres macroscópicos que permitieran distinguir entre ambas especies.
- Las diferencias entre ellas estuvieron dadas por las características morfológicas de sus conidios y por el tipo de lesión que produjeron sobre el tejido foliar de la soja.
- El pigmento rojo observado en torno a algunas colonias o difundido en el medio, fue causado por la toxina cercosporina, cuya producción fue altamente variable entre especies y entre aislamientos de una misma especie a pesar de que se respetaron las condiciones de luz y temperatura para su incubación.
- La mayoría de los aislamientos fructificaron cuando desarrollaron en AJV8, a pesar de que los hongos pertenecientes al género *Cercospora* presentan una gran dificultad en esporular cuando se cultivan sobre medio artificial.

El segundo objetivo a resolver fue la caracterización molecular de las especies aisladas. El estudio de la variabilidad genética de la población de *Cercospora* se llevó a cabo mediante la amplificación de las regiones entre microsatélites (ISSR-PCR) y RAPD-PCR. Los resultados obtenidos permitieron concluir que:

- Ambas técnicas empleadas (ISSR-PCR y RAPD-PCR) fueron de gran utilidad para el estudio de la variabilidad genética entre los aislamientos de *Cercospora*.
- La población fúngica estudiada presentó un alto grado de diversidad genética tanto dentro de una misma región como entre regiones diferentes. Este hecho corroboró la variabilidad fenotípica observada y puso de manifiesto una escasa asociación entre el origen geográfico de los aislamientos y la diversidad genética detectada. También es importante señalar la baja similitud que presentaron las cepas de referencia con relación a los aislamientos regionales.

A los fines de estudiar la variabilidad interespecífica se llevó a cabo la amplificación, por PCR, de las regiones intergénicas (ITS) del ADNr, su posterior análisis mediante RFLP (RFLP-PCR) y su secuenciación.

- El alto grado de similitud del fragmento ITS y de los patrones RFLP observados entre las especies *C. kikuchii* y *C. sojina* aisladas, indicaron una alta homología en la secuencia de la región ITS.
- La secuenciación del fragmento ITS permitió confirmar que los aislamientos analizados, pertenecían al género *Cercospora*, no encontrándose diferencia entre las dos especies en estudio, ya que los porcentajes de identidad, entre ellas y las depositadas en la base de datos GenBank, fueron del 99-100%. La diferencia de nucleótidos del fragmento ITS del operón ribosomal entre todas las secuencias analizadas, varió entre 0 y 2.
- Estos estudios confirmaron que ambas especies se encuentran fuertemente relacionadas.

El tercer objetivo planteado consistió en el desarrollo de métodos de detección precoz de especies de *Cercospora* en plantas de soja, evaluándose diferentes metodologías para la detección del patógeno en plantas de soja infectadas experimentalmente. De los resultados obtenidos se pudo concluir que:

- El método ELISA indirecto mostró baja sensibilidad para detectar la proteína CFP en el tejido foliar.
- La técnica ELISA de inhibición confirmó la presencia de la proteína CFP en el extracto insoluble, pero el ensayo resultó poco específico para discriminar las plantas sintomáticas de las no sintomáticas.
- La técnica de Dot blot permitió detectar la proteína CFP en el extracto del hongo. Aplicada a las plantas inoculadas experimentalmente, permitió la detección de la CFP 4 días después de la inoculación experimental y cuando aún no se visualizaban síntomas de enfermedad.
- Los oligonucleótidos diseñados para amplificar, por PCR, una porción interna del fragmento del gen *cfp*, fueron específicos para detectar especies de *Cercospora*, a las 4 h de efectuada la inoculación experimental y cuando aún no se visualizaban síntomas de enfermedad.
- El desarrollo de un método de inoculación artificial bajo condiciones controladas permitió reproducir los síntomas de la enfermedad al aplicar el patógeno en tejidos de plantas sanas, ya que se observaron, a simple vista, lesiones compatibles con tizón de la hoja y MOR a partir de los 5 días de efectuada la inoculación. Este modelo de infección controlada permitió evaluar las técnicas de diagnóstico antes mencionadas.

Finalmente, se considera que los resultados de esta tesis doctoral contribuyen al conocimiento de dos de los fitopatógenos de soja más frecuentes y al fortalecimiento de los programas específicos de monitoreo y control de plagas en vegetales que se cultivan en la provincia de Santa Fe.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abonyi, J. y Feil, B. (2007) *Cluster analysis for data mining and system identification*. Birkhäuser Verlag AG, Berlín, Germany.
- Agarwal, V.K. y Sinclair, J.B. (1997) *Principles of seed pathology* (2nd Edition) CRC Lewis Publishers, Boca Ratón, USA.
- Agrios, G.N. (1997) *Plant Pathology* (4th Edition) Academic Press, San Diego, USA.
- Agrios, G.N. (2007) *Fitopatología* LIMUSA, D.F., México.
- Agudelo-Flórez, P. y Palacio, L.G. (2009) *Dot blot para el diagnóstico de la cisticercosis porcina*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 28: 1077-1084.
- Aguirre, S.; Silber, A.M.; Brito, M.E.F.; Ribone, M.E.; Lagier, C.M. y Marcipar, I.S. (2006) *Design, construction and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection*. J. Clin. Microbiol. 44: 3768-3774.
- Alaggia, F.; Angelino, L.; Badano Perez, M.; Batistella, A.; Busquet, C.; Raggi, S.; Sabattini, J. y Waigand, C. (2010) *Mancha ojo de rana en cultivo de soja* (*Cercospora sojina* H. – *Glicine max* L.). Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNER). Oro Verde.
[Http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/mancha-ojo-rana-cultivo-soja-cercospora-sojina-h/mancha-ojo-rana-cultivo-soja-cercospora-sojina-h.pdf](http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/mancha-ojo-rana-cultivo-soja-cercospora-sojina-h/mancha-ojo-rana-cultivo-soja-cercospora-sojina-h.pdf)
- Almeida, A.M.R.; Piuga, F.F.; Marin, S.R.R.; Binneck, E.; Sartori, F.; Costamilan, L.M.; Teixeira, M.R.O. y Lopes, M. (2005) *Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of Cercospora kikuchii*. Fitopatol. Bras. 30: 594-602.
- Alvarez Gil, M. (2011) *La selección asistida por marcadores (MAS, "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genético del tomate* (*Solanum lycopersicum* L.). Cultrop. 32: 46-58.
- Arboleda, J.W.; Delgado F. y Valencia, A. (2004) *Detección de beauvericina en el hongo entomopatógeno Beauveria bassiana mediante el uso de anticuerpos policlonales*. Rev. Colombiana Entomol. 30: 125-130.
- Arias, N. y Andrian, M. (2009) *Control de enfermedades en el cultivo de soja*. Agrolluvia.com. Portal informativo para el productor agropecuario.
[Http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/03/inta-concepcion-del-uruguay-control-de-enfermedades-en-cultivo-de-soja.pdf](http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/03/inta-concepcion-del-uruguay-control-de-enfermedades-en-cultivo-de-soja.pdf)
- Arnedo, M. y Carranza, S. (2011) *Eines moleculars per a l'estudi de la diversitat biològica*. Els cursos naturalistes de la ICHN. Can Jordà (Santa Pau).
- Assante, G.; Locci, R.; Camarda, L.; Merlini, L. y Nasini, G. (1977) *Screening of the genus Cercospora for secondary metabolites*. Phytochemistry 16: 243-247.

- Ávila de la Calle, A.; Benali, A. y Trapero Casas, A. (2004) *Variabilidad morfológica y cultural de Pseudocercospora cladosporioides, agente del emplomado del olivo*. Bol. Sanid. Veg. Plagas 30: 369-384.
- Ayra, L.; Cabrera, I.; Gómez, M. y Hernández, D. (2001) *Empleo de marcadores bioquímicos y de ADN en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos*.
[Http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1056/cuf0019s.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1056/cuf0019s.pdf)
- Azofeifa-Delgado, A. (2006) *Revisión bibliográfica. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico*. Agron. Mesoam. 17: 221-242.
- Balajee, S.A.; Borman, A.M.; Brandt, M.E.; Cano, J.; Cuenca Estrella, M.; Dannaoui, E.; Guarro, J.; Haase, G.; Kibbler, C.C.; Meyer, W.; O'Donnell, K.; Petti, C.A.; Rodríguez Tudela, J.L.; Sutton, D.; Velegriaki, A. y Wickes, B.L. (2009) *Sequence-based identification of Aspergillus, Fusarium, and Mucorales in the clinical laboratory: Where are we and where should we go from here?*. J. Clin. Microbiol. 47: 877-884.
- Batista, L.; Peña, I.; López, D.; Pérez, J.M. y Llauger, R. (2008) *Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos*. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba.
[Http://www.concitur.com/manualdesaneamientoydiagnostico/T%C3%89CNICAS%20DE%20DIAGN%C3%93STICO%20DE%20ENFERMEDADES%20QUE%20AFECTAN%20A%20LOS.pdf](http://www.concitur.com/manualdesaneamientoydiagnostico/T%C3%89CNICAS%20DE%20DIAGN%C3%93STICO%20DE%20ENFERMEDADES%20QUE%20AFECTAN%20A%20LOS.pdf)
- Becerra, V.V.; Paredes, M.C.; Rojo, C.M. y France, A.I. (2007) *RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de Beauveria bassiana*. Agric. Téc. 67: 115-125.
- Bergamin Filho, A.; Kimati, H. y Amorim, L. (1995) *Manual de fitopatología*. (3ra Edición) Agro-nómica Ceres, Sao Paulo, Brasil.
- Bernal, A.; Martínez, B. e Infante, D. (2009) *Método para evaluar la respuesta de genotipos de tomate inoculados con Passalora fulva (Cooke) u. Braun y Crous en invernadero*. Rev. Protección Veg. 24: 102-105.
- Bolshakova, N. y Azuaje, F. (2003) *Cluster validation techniques for genome expression data*. Signal Process. 83: 825-833.
- Bonell, M.L. (2000) *Marcadores moleculares de ADN*. Apunte de la Cátedra de Genética y Mejoramiento Vegetal y Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos.
- Bornet, B. y Branchard, M. (2001) *Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting*. Plant. Mol. Biol. Rep. 19: 209-215.
- Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254.

- Bradley, C.A. (2011) *More strobilurin fungicide-resistant strains of the causal agent of Frogeye Leaf Spot of soybean*. The Bulletin.
[Http://bulletin.ipm.illinois.edu/print.php?id=1577](http://bulletin.ipm.illinois.edu/print.php?id=1577)
- Bramardi, S.J. (2007) *Métodos de Análisis Multivariado*. Apunte correspondiente al Curso de Postgrado de la Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas: Análisis Multivariado. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Brunelli, K. (2004) *Cercospora zae-maydis: Esporulação, diversidade morfo genética e reação de linhagens de milho*. Doctoral Thesis, Universidade de Sao Paulo, Brasil.
- Bull Spread (2010) *Soja - Julio 2010*.
[Http://bullspreadblog.blogspot.com/2010/07/soja-julio-2010.html](http://bullspreadblog.blogspot.com/2010/07/soja-julio-2010.html)
- Bundie, A.G.; Martínez Culebras, P.; Bridge, P.D.; Cannon, P.F.; Querol, A.; García, M.D. y Monte, E. (1999) *Molecular characterization of Colletotrichum strains derived from strawberry*. Mycol. Res. 103: 385-94.
- Cabezas Vergara, C.; Parcha, C.; Pineda, J. y Reyes Arenas, E. (2006). *Estandarización de una técnica de amplificación genómica (PCR) para el diagnóstico de Dermatofitos*. Cienc. Trab. 8: 167–171.
- Cabrera, M.G.; Alvarez, R.E.; Raimondo, M.R.; Cúndom, M.A. y Gutiérrez, S.A. (2004) *Importancia de las enfermedades de fin de ciclo de la soja (Glycine max), en el NEA*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste.
[Http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/5-Agrarias/A-027.pdf](http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/5-Agrarias/A-027.pdf)
- Cadwell, V. (1994) *Cercosporioid fungi on Australian native plants*. Doctoral Thesis, University of Melbourne, Australia.
- Cai, G. (2004) *Cercospora leaf blight of soybean: pathogen vegetative compatibility groups, population structure, and host resistance*. Doctoral Thesis. Louisiana State University.
[Http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-12112003-143624/](http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-12112003-143624/).
- Cai, G. y Schneider, R.W. (2008) *Population structure of Cercospora kikuchii, the causal agent of Cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean*. Phytopathology 98: 823 -829.
- Cai, G.; Schneider, R.W. y Padgett, G.B. (2009) *Assessment of lineages of Cercospora kikuchii in Louisiana for aggressiveness and screening soybean cultivars for resistance to Cercospora leaf blight*. Plant. Dis. 93: 868-874.
- Callahan, T.M.; Rose, M.S.; Meade, M.J.; Ehrenshaft, M. y Upchurch, R.G. (1999) *CFP, the putative cercosporin transporter of Cercospora kikuchii, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean*. Mol. Plant Microbe In. 12: 901-910.

- Camacho de Torres, E.F. y Subero Martínez, L.J. (1992) *Histopatología foliar de tres cultivares de maní atacados por Cercospora arachidicola*. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 18: 325-338.
- Cao, Y.P.; Li, H.Y.; Liu, X.M.; Chen, S.J.; Zhang, L.J. y Yang, Q.K. (2003) *Study on Cercospora sojina Hara and its action to soybean*. Acta Phytopathol. Sin. 33, 2.
- Carmona, M.A. y Scandiani, M.M. (2009) *Epidemias de la mancha ojo de rana en la región pampeana: Caracterización y manejo*.
[Http://agro.faua.info/files/carmona_aapresid.pdf](http://agro.faua.info/files/carmona_aapresid.pdf)
- Carmona, M.; Gally, M. y Sautua, F. (2009) *Identificación y manejo de las enfermedades* (1ra Edición). En: Manual de cultivo de soja (Eds.: García, F. O.; Ciampitti, I.A.; Baigorri, H.) International Plant Nutrition Institute, Buenos Aires, Argentina, p. 99-127.
- Carmona, M.A.; Formento, A.N. y Scandiani, M.M. (2010) *Manual mancha ojo de rana*. Ed. Horizonte A. Buenos Aires, Argentina.
- Castillo, N.; Cordo, C. y Simón, M.R. (2010) *Molecular variability among isolates of Mycosphaerella graminicola, the causal agent of Septoria tritici blotch, in Argentina*. Phytoparasitica 38: 379–389.
- Chen, W.; Hoy, J.W. y Schneider, R.W. (1992) *Species-specific polymorphism in transcribed ribosomal DNA of the five Pythium species*. Exp. Mycol. 16: 22–34.
- Chupp, C. (1954) *A monograph of the fungus genus Cercospora*. Ronald Press Co., Ithaca, New York.
- CLSI. (2008) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard* (2nd Edition). CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Copati Souza, L. (2001) *Reação de genótipos de soja ao alumínio em hidroponia e no solo*. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 36: 1255-1260.
- Couretot, L. e Ivancocivh, A. (2009) *Enfermedades de final de ciclo de la soja*. En: *Taller de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Ing. Agr. Walter Kugler. Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimento. Rep. Arg. p. 5-10.
- Couretot, L., Mousegne, F. y Ferraris, G. (2009) *Caracterización de la respuesta a la aplicación de fungicidas foliares para el control de Mancha marrón de la hoja y Mancha ojo de rana en soja bajo un ambiente de stress hídrico*. Campaña 2008/09. INTA. Portal informativo para el productor agropecuario. Agrolluvia.com.
[Http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/01/inta-pergamino-aplicacion-de-fungicidas-para-el-control-de-mancha-marron-y-mancha-ojo-de-rana-en-soja-con-stress-hidrico.pdf](http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/01/inta-pergamino-aplicacion-de-fungicidas-para-el-control-de-mancha-marron-y-mancha-ojo-de-rana-en-soja-con-stress-hidrico.pdf)

Couretot, L.; Moussegne, F. y Ferraris, G. (2010) *Evaluación de diferentes estrategias de control de enfermedades de fin de ciclo en soja. Respuesta a la aplicación de fungicidas foliares en variedades de diferente comportamiento frente a mancha ojo de rana. Campaña 2009/2010*. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino “Ing. Agr. Walter Kugler”. Desarrollo Rural.

[Http://www.elsitioagricola.com/plagas/intapergamino/20100928-control-en-soja.pdf](http://www.elsitioagricola.com/plagas/intapergamino/20100928-control-en-soja.pdf)

Crous, P.W. y Braun, U. (2003) *Mycosphaerella and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Crous, P.W.; Braun, U.; Wingfield, M.J.; Wood, A.R.; Shin, H.D.; Summerell, B.A.; Alfenas, A.C.; Cumagun, C.J.R. y Groenewald, J.Z. (2009) *Phylogeny and taxonomy of obscure genera of microfungi*. *Persoonia* 22: 139-161.

Crous, P.W.; Janse, B.J.H.; Tunbridge, J. y Holz, G. (1995) *DNA homology between Pyrenophora japonica and P. teres*. *Mycol. Res.* 99: 1098-1102.

Cruz, S.M. (2010) *Selección de materiales de Calahuala (Phlebodium pseudoaureum) con fines de mejoramiento genético para la producción de metabolitos secundarios*. Informe Final Proyecto Fodecyt N° 09-2007. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Cuadras, C.M. (2011) *Nuevos métodos de análisis multivariante*. CMC Editions. Barcelona, España.

Cubero, J.I. (2003) *Introducción a la mejora genética vegetal*. (2da Edición). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

Daboussi, M. y Capy, P. (2003) *Transposable elements in filamentous fungi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 275-299.

Daub, M.E. y Chung, K.R. (2009) *Photoactivated perylequinone toxins in plant pathogenesis*. En: *The mycota V* (Ed.: Deising, H.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, p. 201-219.

Daub, M.E. y Ehrenshaft, M. (1993) *The photoactivated toxin cercosporin as a tool in fungal photobiology*. *Plant. Physiol.* 89: 227-236.

Daub, M.E. y Ehrenshaft, M. (2000) *The photoactivated Cercospora toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 461- 490.

Daub, M.E.; Herrero, S. y Chung, K.R. (2005) *Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants*. *FEMS Microbiol. Lett.* 252: 197–206.

Daub, M.E.; Leisman, G.B.; Clark, R.A. y Borden, E.F. (1992) *Reductive detoxification as a mechanism of fungal resistance to singlet-oxygen-generating photosensitizers*. *The Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9588-9592.

- del Pino, A. (2010) *Un mapa de las enfermedades sojeras*. INTA Marcos Juárez.
[Http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=13227](http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=13227)
- Di Conza, J.A.; Nepote, A.F.; González, A.M. y Lurá, M.C. (2007) *(GTG)₅ microsatellite regions in citrinin-producing Penicillium*. Rev. Iberoam. Micol. 24: 34-37.
- Digby, P.G.N. y Kempton, R.A. (1987) *Multivariate analysis of ecological communities*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Distéfano, S. (2009) *Impacto en rendimiento de “mancha ojo de rana” (Cercospora sojina) y susceptibilidad varietal*. INTA Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez. Córdoba.
[Http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/01_Informes/_archivo/090000-Informes%20campa%C3%B1as%202009-2010/000000-Mancha%20ojo%20de%20rana%20-%20Campa%C3%B1a%202008-2009-%20Silvia%20Dist%C3%A9fano.pdf](http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/01_Informes/_archivo/090000-Informes%20campa%C3%B1as%202009-2010/000000-Mancha%20ojo%20de%20rana%20-%20Campa%C3%B1a%202008-2009-%20Silvia%20Dist%C3%A9fano.pdf)
- Distéfano, S. y Gadbán L. (2008) *AACREA- 4/12/08-Panorama fitopatológico del cultivo de soja. Incidencia y severidad de las distintas enfermedades en la última campaña*. Campos 2.0. Susana Merlo.
[Http://www.susanamerlo.com/content/view/96/44/](http://www.susanamerlo.com/content/view/96/44/)
- Distéfano, S.G. y Gadbán, L.C. (2009a) *Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2006 – 2007*. INTA EEA Marcos Juárez.
[Http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=78866&se=12](http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=78866&se=12)
- Distéfano, S.G. y Gadbán, L.C. (2009b) *Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2008-2009*. INTA EEA Marcos Juárez.
[Http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/01/inta-marcos-juarez-panorama-fitopatologico-de-cultivo-de-soja-mancha-ojo-de-rana.pdf](http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/01/inta-marcos-juarez-panorama-fitopatologico-de-cultivo-de-soja-mancha-ojo-de-rana.pdf)
- Dobrowolski, D.C. y Foote, C.S. (1998) *Chemistry of singlet oxygen. Quantum yield of cercosporin-sensitized singlet oxygen formation*. Angew. Chem-Ger. Edit. 95: 729-730.
- Dunkle, L.D. y Levy, M. (2000) *Genetic relatedness of african and United States populations of Cercospora zae-maydis*. Phytopathology 90: 486-490.
- Dunleavy, J.M. (1988) *Bacterial, fungal and viral diseases affecting soybean leaves*. En: *Soybean diseases of the north central region*. (Eds: Willie, T.D. y Scott, D.H.) APS Press. St. Paul, MN, USA, p. 40-46.
- Edwards, S.G.; O’Callaghan, J. y Dobson, A.D.W. (2002) *PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi*. Mycol. Res. 106: 1005-1025.
- EEA INTA Pergamino (2008) *Taller de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino Ing. Agr. Walter Kugler. Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimento. Rep Arg.

- Efron, B. (1987) *Better bootstrap confidence intervals*. J. Am. Stat. Assoc. 82: 171-185.
- Ellis, M.B. (1976) *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB International Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Enriquez Jiménez, K.V.; Novoa Zapot, G.; Cruz Morales, T.D.R.; Sosa Guzman, P.A.; Rojas, G.V.; Beltrán González, M. y Tapia I., Q.F.B.S. (2009) *Técnicas inmunológicas. Inmunohematología*.
[Http://mezzadoz2.blogspot.com.ar/2009/05/tecnicas-inmunologicas%20.%20html](http://mezzadoz2.blogspot.com.ar/2009/05/tecnicas-inmunologicas%20.%20html)
- Everitt, B. y Hothorn, T. (2009) *A handbook of statistical analyses using R* (2nd Edition) Chapman and Hall/CRC, Boca Ratón, USA.
- Fajola, A. (1978) *Cercosporin, a phytotoxin from Cercospora species*. Physiol. Plant Pathol. 13: 157-164.
- Fehr, W.; Caviness, C.; Burmood, D. y Pennington, J. (1971) *Stage of development descriptions for soybeans, Glycine max (L.) Merrill*. Crop Sci. 11: 929-931.
- Felsenstein, J. (1985) *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evol. 39: 783-791.
- Fernández Olmos, A.; García de la Fuente, C.; Sáez Nieto, J.A. y Valdezate Ramos, S. (2010) *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Eds.: Cercenado, E. y Cantón, R.).
[Http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap37.asp](http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap37.asp)
- Ferrer Gual, R.M. (2008) *Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género Fabavirus. Evaluación del BTH como método control*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España
- Fontdevila, A. y Moya, A. (1999) *La variabilidad genética: origen, detección y medida*. En: *Introducción a la genética de poblaciones* Síntesis, Madrid, España, p. 39-82.
- Formento, N. y Daverio, L. (2002) *Enfermedades de fin de ciclo del cultivo de la soja. Campaña Agrícola 2000/01*. Área de Investigación en Producción Vegetal. EEA INTA Paraná.
[Http://parana.inta.gov.ar](http://parana.inta.gov.ar)
- Formento, N. (2012) *Enfermedades de fin de ciclo de la soja en Entre Ríos*. Planeta soja.
[Http://www.planetasoja.com](http://www.planetasoja.com)
- Frana, J.; Astegiano, E.; Villar, J.; Hermann, O.M. e Imvinkelried, H. (2005) *Caracterización de manejo de plaguicidas en la región central de Santa Fe. Experiencia RiiA 2002-2003-2004*. EEA

INTA Rafaela. Información técnica cultivos de verano. Campaña 2005. Publicación Misceláneas N1 104.

[Http://www.riia.unl.edu.ar/InformesPublicos/UsoPlaguicidasRiiA_APLICAR.PDF](http://www.riia.unl.edu.ar/InformesPublicos/UsoPlaguicidasRiiA_APLICAR.PDF)

Gams, W.; van derAa, H.A.; van der Plaats-Niterink; Samsom, R.A. y Stalfers, J.A. (1987) *CBS Course of Mycology*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

García Iglesias, E.; González de Orduña, C.; Rodríguez Rivera, C.; Gago Cabezas, L; González Izquierdo, J.M.; Fernández Nuevo, J.L. y Benito Andrés, J. (2009) *Evaluación de los métodos analíticos actuales para alérgenos del látex*. Asociación Española de Alérgicos al Látex. España.

Gilchrist-Saavedra, L.; Fuentes Dávila, G.; Martínez-Cano, C.; López-Atilano, R.M; Duveiller, E.; Singh, R.P.; Henry, M. y García A., I. (2005) *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. (2º Edición) CIMMYT, D.F., México.

Gilligan, C.A. (2008) *Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Bio.l Sci. 363: 741-759.

González, A. y Aguirre, X. (2007) *Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)*. En: *Ecología molecular* (Eds.: del Pont Lalli, R.M.; Figueroa, A.y Koob, C.C.) Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, Delegación Coyoacán, D.F., México, p. 567-571.

González, A.M.; Turino, L.; Latorre Rapela, M.G. y Lurá, M.C. (2008) *Cercospora kikuchii aislada en la provincia de Santa Fe (Argentina): variabilidad genética y producción de cercosporina in vitro*. Rev. Iberoam. Micol. 25: 237-241.

González Salgado, A. (2010) *Diagnóstico y control de especies de Aspergillus productoras de Ocratoxina A*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

Goodwin, S.B.; Dunkle, L.D. y Zismann, V.L. (2001) *Phylogenetic analysis of Cercospora and Mycosphaerella based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA*. Phytopathology 91: 648-658.

Groenewald, M. (2007) *Molecular characterization of Cercospora beticola and its relatives*. PhD Thesis Wageningen University, Netherlands.

Groenewald, M.; Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. (2005) *Distinct species exist within the Cercospora apii morphotype*. Phytopathology 95: 951-959.

Hair, J.F. (Jr.); Anderson, R.E.; Tatham, R.L. y Black, W.C. (1999) *Análisis multivariante*. (5ª Edición) Prentice Hall Iberia S.R.L., Madrid, España.

Hartman, G.L.; Sinclair, J.B. y Rupe, J.C. (1999) *Compendium of Soybean Diseases*. (4ª Edición) APS, St. Paul, MN, USA, p. 100.

- Hawksworth, D.; Kirk, P.; Sutton, B. y Pegler, D. (1996) *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi*. (8ª Edición) CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Herrera Castellón, E. y Jiménez Fernández, R. (2007) *Componentes de la soja de interés en alimentación, nutrición y salud humana*. En: *La salud y la soja*. (Médicos, S.A.) EDIMSA, Madrid, España, p. 61-92.
- Illanes, E. (2003) *Soja: La invasión Verde*. Zoe Tecno-Campo.
http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/soja/soja_mon.htm
- Imazaki, I.; Iizumi, H.; Ishikawa, K.; Sasahara, M.; Yesuda, N. y Koizumi, S. (2006) *Effects of thiophanate-methyl and azoxystrobin on the composition of Cercospora kikuchii populations with thiophanate-methyl-resistant strains*. J. General Plant Pathol. 72: 292- 300.
- Innis, M.A. y Gelfand, D.H. (1990) *Optimization of PCRs*. En: *PCR protocols. A Guide to methods and applications* (Eds.: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. y White, T.J.) Academic Press, San Diego, USA, p 3-20.
- Ivancovich, A. y Botta, G. (2000) *Enfermedades de fin de ciclo de la soja*. Rev. Tecnol. Agrop. INTA Pergamino 5: 39-40.
- Jenns, A.E.; Daub, M.E. y Upchurch, R. G. (1989) *Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation*. Phytopathology 79: 213-219.
- Johnson, R. (1984) *A critical analysis of durable resistance*. Annu. Rev. Phytopathol. 22: 309–330.
- Johnson, R.A. y Wichern, D.W. (1999) *Applied multivariate statistical analysis* (4th Edition), Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA.
- Joshi, A.; Souframanien, J.; Chand, R. y Pawar, S.E. (2006) *Genetic diversity study of Cercospora canescens (Ellis & Martin) isolates, the pathogen of Cercospora leaf spot in legumes*. Curr. Sci. India. 90: 564-568.
- Kantolic, A.G. y Satorre, E.H. (2004) *Elementos centrales de ecofisiología del cultivo de soja*. En: *Manual práctico para la producción de soja*. (Eds.: Díaz Zorita, M. y Duarte G.) Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, p. 19-37.
- Kaufman, L. y Rousseeuw, P. (2008) *Finding groups in data. An introduction to cluster analysis* (9th Edition), John Wiley and Sons, USA.
- Krimperfort, L. (2007) *La soja, biología y agronomía*. En: *La salud y la soja*. (Eds. Médicos, S.A.) EDIMSA, Madrid, España, p. 19-29.

- Kuyama, S. y Tamura, T. (1957) *Cercosporin. A pigmento of Cercospora kikuchii Matsumoto et Tomoyasu. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment.* J. Am. Chem. Soc. 79: 5725-5726.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227: 680-685.
- Lartey, R.T.; Caesar-TonThat, T.C.; Caesar, A.J.; Shelver, W.L.; Sol, N.I. y Bergman, J.W. (2005) *Safflower: A new host of Cercospora beticola.* Plant Dis. 89: 797–801.
- Lartey, R.; Weiland, J.; Caesar, T, y Bucklin Comiskey, S. (2003) *A PCR protocol for rapid detection of Cercospora beticola in infected Sugar Beet tissues.* J. Sugar Beet Res. 40: 1-10.
- Latorre Rapela, M.G.; Colombini, M.A.; González, A.M.; Vaira, S.M.; Maumary, R.; Mattio, M.C.; Carrera, E. y Lurá, M.C. (2011) *Phenotypic and genotypic variability in Cercospora kikuchii isolates from Santa Fe province, Argentina.* En: *Soybean. Genetics and novel techniques for yield enhancement* (Ed.: Krezhova D.) INTECH Open Access Publisher, Croacia, p. 97-112.
- Layrisse, D.A. y Borges, F.O. (1984) *Evaluación de la resistencia a Cercospora arachidicola Hori, en cultivares de maní en condiciones de campo e invernadero.* Rev. Fac. Agron. (Maracay) 13: 143-149.
- Lee, S.B. y Taylor, J.W. (1992) *Phylogeny of five fungus-like protactistan Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA.* Mol. Biol. Evol. 9: 636–653.
- Longato, S. y Bonfante, P. (1997) *Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions.* Mycol. Res. 101: 425–432.
- Luque, A. (2010) *Características morfológicas y aislamiento de Cercospora sojina.* Simposio Nacional Mancha Ojo de Rana (*Cercospora sojina* Hara).
[Http://www.acsoja.org.ar/simpo_mor/files/Alicia_Luque_CEREMIC_-_Caracteristicas_morfologicas_y_aislamientos_de_MOR.pdf](http://www.acsoja.org.ar/simpo_mor/files/Alicia_Luque_CEREMIC_-_Caracteristicas_morfologicas_y_aislamientos_de_MOR.pdf)
- Lurá, M.C.; Di Conza, J.A.; González, A.M.; Latorre Rapela, M.G.; Turino, L.; Ibáñez, M.M. e Iacona, V. (2007) *Detección de variabilidad genética en aislamientos de Cercospora kikuchii contaminantes de un mismo sembradío de soja.* Rev. Arg. Microbiol. 39: 11-14.
- Lurá, M.C.; Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C.; Maumary, R., Soldano A.; Mattio M.; González, A.M. (2011) *Genetic diversity of Cercospora kikuchii isolates from soybean cultured in Argentina as revealed by molecular markers and cercosporin production.* Mycopathologia 171: 361-371.
- Macias Figueroa, O.L.; Delgado Calvo, Y.; Peña Marrero, E.; Betancourt, R.L. y Barreto, R.E. (2006) *Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos.* Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Matanzas, Cuba, p. 30.

Manzo Sánchez, G. (2001) *Diversidad genética de Mycosphaerella fijiensis Morelet en plátano enano gigante (Musa acuminata AAA) cultivado con diferente manejo*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Área Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.

Marin, S.R.R.; Binneck, E.; Nepomuceno, A.L. y Almeida, A.M.R. (2004) *Direct Submission. Cercospora kikuchii voucher BRCK 179 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*. Laboratory for Biotechnology and Bioinformatics, Embrapa Soybean, Rod. Carlos Joao Strass – Distrito de Warta, Londrina, PR 86001-970, Brazil.

[Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY633838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY633838)

Martín de Santos, R. (2010) *Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos*. Universidad complutense de Madrid.

[Http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1108/1125](http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1108/1125)

Martínez Castilla, L. (2007) *Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres*. En: *Ecología molecular* (Eds.: Eguiarte, L.E.; Souza, V. y Aguirre, X.) Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, D.F., México, p. 87–160.

Martínez Culebras, P.V. (1999) *Caracterización y diagnóstico molecular de las cepas de Colletotrichum patógenas en plantas de fresas*. Tesis Doctoral. Facultat de CC. Biologiques. Universitat de Valencia. España.

Masuelli, R.W. (1999) *Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas*. Av. Hortic. 4: 54-66.

Mattio, M.C.; González, A.M.; Turino, L.; Di Conza, J.A.; Latorre Rapela, M.G.; Vaccari, M.C.; Iacona, V.A. y Lurá, M.C. (2008) *Cercospora patógenas de soja: Influencia de factores ambientales sobre su desarrollo. Degradación biológica de cercosporina*. Rev. FABICIB. 12: 25-32.

McDonald, B.A. (1997) *The population genetics of fungi: Tools and techniques*. Phytopathology 87: 448-453.

Meyer, W.; Mitchell, T.G., Freedman, E.Z. y Vilgalys, R. (1993) *Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 31: 2274-2280.

Moreno, N. y Agudelo-Flórez, P. (2010) *Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiples para la identificación de aislamientos de Leptospira spp. en Colombia*. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública 27: 548-556.

- Moreno, M.V.; Stenglein, S.A.; Balatti, P.A.; Perelló, A.E. (2008) *Pathogenic and molecular variability among isolates of Pyrenophora tritici-repentis, causal agent of tan spot of wheat in Argentina*. Eur. J. Plant Pathol. 122: 239-252
- Mullis, K.; Faloona, E.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. y Erlich, H. (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- Murakishi, H.H. (1951) *Purple seed stain of soybean*. Phytopathology 41: 305-318.
- Mycobank. *Fungal Databases Nomenclature and Species Banks*.
[Http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic)
- Ndao, M. (2009) *Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches*. Interdiscipl. Perspect. Infect. Dis. Volume 2009, Article ID 278246, 15 pages.
- Ness, F.; Lavellee, F.; Dubourdieu, D.; Aigle, M. y Dulau, L. (1993) *Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction*. J. Sci. Food Agriculture 62: 89-94.
- Niessen, L. (2008) *PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi*. Adv. Food Nutr. Res. 54: 81-138.
- Notomi, T; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T; Watanabe, K.; Amino, N, y Hase, T. (2000) *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Res. 28: e63.
- Okori, P.; Rubaihayo, P.R.; Ekwamu, A.; Fahleson, J. y Dixelius, C. (2004) *Genetic characterization of Cercospora sorghi from cultivated and wild sorghum and its relationship to other Cercospora fungi*. Phytopathology 94: 743-750.
- Pappas, M.G.; Hajkowski, R. y Hockmeyer, W. (1983) *Dot enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) a microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis* J. Immunol. Meth. 64: 205-214.
- Pavón Moreno, M.A.; García Lacarra, T. y Martín de Santos, R. (2008) *Utilización del gen Alt a 1 para la detección de Alternaria spp. en productos hortofrutícolas mediante una técnica de PCR*. Rev. Complutense Ciencias Vet. (RCCV) 2: 105-113.
- Peña, D. (2002) *Análisis de conglomerados*. En: *Análisis de datos multivariantes* (Ed: Fernández Madrid, C.) McGraw-Hill S.A./Interamericana, España.
- Pérez, S. (2000) *Métodos para estudios genéticos en poblaciones de hongos fitopatógenos*. Rev. Protección Veg. 15: 137-148.
- Pérez-Nasser, N. y Piñero D. (1997) *Isoenzimas*. Bol. Soc. Bot. Méx. 60: 77-84.

Pérez Pérez, J.M. y Pérez Sevilla, A.B. (2009) *Técnica de ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay)*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Laboratorio de Inmunología L-121, Campus I.

[Http://es.scribd.com/doc/15834994/Tecnica-de-ELISA-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay](http://es.scribd.com/doc/15834994/Tecnica-de-ELISA-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)

Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N. y Carrera, A. (2010) *Parte II: Herramientas Básicas. Capítulo 4: Marcadores moleculares*. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal* (Eds.: Echenique V.; Rubinstein, C.; y Mroginski, L.) INTA, Argentina, p. 61-68.

Povh, J. A.; Lopera Barrero, N.M.; Ribeiro, R.P.; Lupchinski Jr., E; Gomes P.C. y Lopes T. S. (2008) *Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares*. Cien. Inv. Agr. 35: 5-15.

Programa RiiA. Red de Información de interés agronómico.

[Http://www.riia.unl.edu.ar/programa.htm#II](http://www.riia.unl.edu.ar/programa.htm#II)

Pujol Vieira dos Santos, A.M.; Santos Matsumura, A.T. y Van der Sand, S.T. (2002) *Intraspecific genetic diversity of Drechslera tricit-repentis as detected by a random amplified polymorphic DNA analysis*. Genet. Mol. Biol. 25: 243-250.

Pupiro, M.L. y Malagón Rodríguez, L. (2003) *Técnicas del diagnóstico de las enfermedades en las plantas*. Trabajo de patología vegetal. Universidad Agraria de La Habana. La Habana. Cuba.

Quinteros Benítez, J.A.; Apodaca Sánchez, M.A.; Loredó Vega, J.G. y Fierro Corrales, D. (2008) *Manual de Prácticas Micológicas*. Departamento de Parasitología Rama de Fitopatología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Ahome. Sinaloa.

Rangel, E.; Schmidt, A. y Centeno, F. (2006) *Implementación de la técnica de ELISA para la detección de virus y otros patógenos en plantas en Venezuela*. Revista digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela.

[Http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n10/arti/rangel_e/arti/rangel_e.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n10/arti/rangel_e/arti/rangel_e.htm)

Reinhardt, G.; Carrasco, L.; Tadich, N. y Riedemann, S. (2001) *Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I)*. Arch. Med. Vet. 33.

Reuters (2010) *Finaliza cosecha récord de soja en Argentina correspondiente al ciclo 2009/2010*. América economía.

[Http://www.americaeconomia.com/economia-mercados/finaliza-cosecha-record-de-soja-en-argentina-correspondiente-al-ciclo-20092010](http://www.americaeconomia.com/economia-mercados/finaliza-cosecha-record-de-soja-en-argentina-correspondiente-al-ciclo-20092010)

Rico Guerrero, L.; Medina Ramos, S.; Muñoz Sanchez, C.I.; Guevara Olvera, L.; Guevara González, R.G.; Guerrero Aguilar, B.Z.; Torres Pacheco, I; Rodríguez Guerra, R y González Chavira, M.M. (2004) *Detección de Phytophthora capsici Leonian en plantas de Chile (Capsicum annum L.) mediante PCR*. Rev. Mex. Fitopatol. 22: 1-6.

Rodríguez Rivero, C. y Benito, J. (2001) *Informe de actualización. Inmunoterapia en el tratamiento de la alergia al látex*. Círculo de innovación en Biotecnología, Madrid, España, p. 1-15.

Rodríguez Tarduchy, G. y Santiago Martínez, M.C. (2003) *Secuenciación automática de ADN*. Servicio de Secuenciación automática de ADN Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB - CSIC).

Rollins, J.A.; Ehrenshaft, M. y Upchurch, R.G. (1993) *Effects of light- and altered-cercosporin phenotypes on gene expression in Cercospora kikuchii*. Can. J. Microbiol. 39: 118-124.

Rupe, J.C. y Hartman, G. L. (1999) *Sudden death syndrome*. En: *Compendium of soybean diseases* (Eds.: Hartman, G.L.; Sinclair, J.C. y Rupe, J.C.) (4th Edition) APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, p. 37-39.

Russell, R. y Paterson, M. (2006) *Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR*. Process Biochem. 41: 1467-1474.

Saavedra Rodríguez, C.O.; Gómez González, S.J. y Ángel Díaz, J.E. (2004) *Detección de secuencias específicas de ADN de Spongospora subterranea en suelo y tubérculos de papa*. Rev. Colombiana Biotecnol. 6: 14-22.

SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos) (2003) *Soja. Informe general*. Buenos Aires, Argentina.

[Http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/estimaciones/infsoja.php](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/estimaciones/infsoja.php)

Salvador, D. y Garrido, M. (1990) *Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo*. Fitopatol. Venez. 3: 11-15.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, USA.

Sanz Pérez, B. (2007a) *Introducción a la soja como alimento*. En: *La salud y la soja*. (Médicos, S.A.) EDIMSA, Madrid, España, p. 11-16.

Sanz Pérez, B. (2007b) *Alimentos derivados de la soja*. En: *La salud y la soja*. (Médicos, S.A.) EDIMSA, Madrid, España, p. 31-57.

Scandiani, M.M. y Luque, A.G. (2009) *Manual: identificación de patógenos en semilla de soja*. Suplemento especial N° 2. Análisis de Semillas. 148 pp.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) (2003) *Mercado de granos*, En: *Informe diario, (05.12.2003)*.

[Http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/Informe_diario/2003/infogra_2003-12-05.pdf](http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/Informe_diario/2003/infogra_2003-12-05.pdf)

- Schaad, N.W. y Frederick, R.D. (2002) *Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics*. Can. J. Plant Pathol. 24: 250–258.
- Siboe, G.M.; Murray, J. y Kirk, P.M. (2000) *Genetic similarity among Cercospora apii-group species and their detection in host plant tissue by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS)*. J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 69-78.
- Sillón, M.R. e Ivancovich, A. (2004) *II Curso de Actualización en: Diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. Campaña 2003/2004*. Fac. de Cs. Agrarias. UNL. Esperanza.
- Sillón, M. (2007) *Proyecto de asintomáticas: ¿Qué esconden nuestros cultivos de soja?* El Litoral. [Http://www.ellitoral.com/index.php/diarios/2007/04/07/laregion/REG-11.html](http://www.ellitoral.com/index.php/diarios/2007/04/07/laregion/REG-11.html)
- Sillón, M. (2008) *Errores en el manejo de enfermedades de soja: aplicaciones de fungicidas en estados muy avanzados del cultivo*. En: *Taller de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Ing. Agr. Walter Kugler. Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimento. Rep Arg. p. 47-48.
- Sillón, M. (2009) *Alerta por importantes infecciones de mancha en ojo de rana (MOR) en cultivos de soja de Santa Fe y Córdoba*. Boletín de Agricultores Federados Argentinos N°2.
- Sillón, M. (2010) *Efectivo control de mancha en ojo de rana (Cercospora sojina Hara) en Santa Fe en diferentes cultivares*. Buenas tareas.com. [Http://www.buenastareas.com/ensayos/Efectivo-Control-De-Mancha-En-Ojo/926666.html](http://www.buenastareas.com/ensayos/Efectivo-Control-De-Mancha-En-Ojo/926666.html)
- Sinavimo (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas) (2010) *El cultivo de soja en la Argentina*. [Http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/soja](http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/soja)
- Sinclair, J.B. y Backman, P.A. (1989) *A compendium of soybean diseases* (3rd Edition). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Singh, P.K. y Hughes, G.R. (2006) *Genetic Similarity among Isolates of Pyrenophora tritici-repentis. Causal Agent of Tan Spot of Wheat*. J. Phytopathol. 154: 178-184.
- Smith, D. y Onions, A. (1983) *The preservation and maintenance of living fungi*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Commonwealth Mycological Institute, England.
- Soda, L. (2010) *Cercospora kikuchii vs. Cercospora sojina: hongos fitopatógenos de la soja*. Engormix. [Http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/cercospora-kikuchii-cercospora-sojina-t2871/415-p0.htm](http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/cercospora-kikuchii-cercospora-sojina-t2871/415-p0.htm)
- Sollod, C.C.; Jenns, A.E. y Daub, M.E. (1992) *Cell surface redox potencial as photosensitizer defense mechanism in fungi*. Appl. Environ. Microb. 58: 444-449.

- Somai, B.M.; Dean, R.A.; Farnham, M.W.; Zitter, T.A. y Keinath, A.P. (2002) *Internal transcribed spacer regions 1 and 2 and random amplified polymorphic DNA analysis of Didymella bryoniae and related Phoma species isolated from cucurbits*. *Phytopathology* 92: 997-1004.
- Spessot, W.; Ferrari, M. y Marcipar, I.S. (2004) *Desarrollo de un ensayo de lectura visual tipo Dot Blot para determinar anticuerpos anti Toxoplasma gondii con alta confiabilidad*. XX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Protozoología.
- Staskawicz, B.J.; Ausubel, F.M.; Baker, B.J.; Ellis, J.G.; Jones, J.D. (1995) *Molecular genetics of plant disease resistance*. *Sci.* 268: 661-667.
- Staub, T. (1991) *Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use*. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 29: 421-442.
- Stewart, E.L.; Liu, Z.; Crous, P.W. y Szabo, L.J. (2003) *Direct Submission. Cercospora sojae isolate CS42 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence*. Plant Pathology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Matieland, Western Cape 7602, South Africa
[Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY266157](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY266157)
- Stenglein, S. y Ballatti, P. (2006) *Genetic diversity of Phaeoisariopsis griseola in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 68: 158-167.
- Sweets L. (2001) *Frogeye leaf spot of soybean*. Integrated Pest & Crop Management Newsletter, 11, 1. University of Missouri, Columbia, USA.
- Tiago, P.V.; Carneiro-Leão, M.P.; Lima, M.L.A.; Oliveira, N.T. y Luna-Alves Lima E.A. (2011) *Polymorphism in Metarhizium anisopliae var. anisopliae (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intron markers*. *Genet. Mol. Res.* 10: 1565-1575.
- Toledo, R.E. (2009) *Cultivo de soja*. BuscAgro.
[Http://www.buscagro.com/www.buscagro.com/biblioteca/Ruben-Toledo/El-cultivo-de-soja.pdf](http://www.buscagro.com/www.buscagro.com/biblioteca/Ruben-Toledo/El-cultivo-de-soja.pdf)
- Toledo, R.E. (2012) *Fases de desarrollo del cultivo de la soja*.
[Http://agro.uncor.edu/~ceryol/documentos/soja/feno_soja.pdf](http://agro.uncor.edu/~ceryol/documentos/soja/feno_soja.pdf)
- Torgo, L. (2003) *Data Mining with R: learning with case studies*. CRC Press.
[Http://www.math.iupui.edu/~samiran/STAT521f09_files/DataMiningWithR.pdf](http://www.math.iupui.edu/~samiran/STAT521f09_files/DataMiningWithR.pdf)
- Torres Tejeda, A.G. y Baca, B.E. (1995) *Reacción en cadena de la polimerasa*. *Elementos*. 3: 16-21.

- Towbin, A.; Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- Upchurch, R.G.; Rose, M.S. y Eweida, M. (2001) *Over-expression of the cercosporin facilitator protein, CFP, in Cercospora kikuchii up-regulates production and secretion of cercosporin*. FEMS Microbiol. Lett. 204: 89-93.
- Upchurch, R.G.; Rose, M.S.; Eweida, M. y Callahan, T.M. (2002) *Transgenic assessment of CFP-mediated cercosporin export and resistance in a cercosporin-sensitive fungus*. Curr. Genet. 41: 25-30.
- Upchurch, R.G.; Walker, D.C.; Rollins, J.A.; Ehrenshaft, M. y Daub, M.E. (1991). *Mutants of Cercospora kikuchii altered in cercosporin synthesis and pathogenicity*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2940-2945.
- Vaccari, M.C., Mattio, M., González, A.M. y Lurá, M.C. (2010) *Direct Submission. Cercospora kikuchii isolate C14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*. Microbiologia, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Santa Fe, Santa Fe 3000, Argentina
- Vallone, S.D. de; Gadban, L.; Masiero, B. y Pochettino, A. (2007) *Diagnóstico y manejo de enfermedades de fin de ciclo en soja en lotes de productores de Marcos Juárez y su zona de influencia*. Engormix.
[Http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/diagnostico-manejo-enfermedades-fint1278/415-p0.htm](http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/diagnostico-manejo-enfermedades-fint1278/415-p0.htm)
- Vílchez, G. y Alonso, G. (2009) *Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 29: 6-12.
- Villegas Fernández, A.M. (2012) *Mejora de habas (Vicia faba L.) para resistencia a Botrytis fabae Sard*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Wang, Z.; Yu, D. ; Li, X.; Zeng, M.; Chen, Z.; Bi, L.; Liu, J.; Jin, L.; Hu, D.; Yang, S. y Song, B. (2012) *The development and application of a Dot-ELISA assay for diagnosis of southern rice black-streaked dwarf disease in the field*. Viruses 4: 167-183.
- Ward, E.; Foster, S.J.; Fraaije, B.A. y McCartney, H.A. (2004) *Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches*. Ann. Appl. Biol. 145: 1-16.
- Ward, J.H. (1963) *Hierarchical grouping to optimize an objective function*. J. Am. Stat. Assoc. 58: 236-244.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. y Taylor, J. (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Eds.: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. y White, T.J.) Academic Press, San Diego, California, USA, p. 315–322.

Williams, J.; Kubelik, A.; Livak, K.; Rafalski, J. y Tingey, S. (1990) *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 -6535.

Winzer, N.; Di Renzo, M.; Olmos, S. e Ibañez, M. (2010) *Métodos multivariados para estimar variabilidad genética* En: *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte II* (Eds: Levitus, G.; Eche- nique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L.) INTA. ArgenBio p. 283-294.

Yeh, C. y Sinclair, J. (1980) *Sporulation and variation in size of conidia and conidiophores among five isolates of Cercospora kikuchii*. *Plant Dis.* 64: 373–374.

Zhang, G.R.; Newman, M.A. y Bradley, C.A. (2012) *First report of the soybean frog-eye leaf spot fungus (Cercospora sojae) resistant to quinone outside inhibitor fungicides in North America*. *Plant Dis.* 96, p. 767.

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

Agar papa dextrosa (APD)

Papas	250 g
Dextrosa	20 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación: Hervir las papas en 500 mL de agua destilada durante 30-40 min. Filtrar a través de un lienzo, recoger el filtrado y completar el volumen con agua destilada, agregarle dextrosa y agar-agar. Homogeneizar calentando el medio de cultivo en un baño de agua hirviente hasta fundir el agar agar. Fraccionar y esterilizar 15 min a 121°C.

Agar jugo V8 (AJV8)

Jugo V8	200 mL
Carbonato de calcio	3 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	800 mL

Preparación: Mezclar los componentes, fundir el agar-agar en baño maría hirviente. Fraccionar y esterilizar 15 min a 121°C.

Agar extracto de malta (AEM)

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
agar-agar	20 g
agua destilada	1000 mL

Preparación: Mezclar los componentes, fundir el agar-agar en baño maría hirviente. Fraccionar y esterilizar 15 min a 121°C.

Agar extracto de malta (AEM induce mayor producción de cercosporina)

Extracto de malta	15 g
Peptona	3 g
Glucosa	30 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación: Mezclar los componentes, fundir el agar-agar en baño maría hirviendo. Fraccionar y esterilizar 15 min a 121°C. Este medio de cultivo induce mayor producción de cercosporina.

Agar conejarina (AC)

Preparación: Hervir 25 g de conejarina (alimento para conejos) en 1 L de agua destilada y dejar reposar por 30 min. Filtrar a través de gasa. El filtrado se calienta lentamente y se le adiciona 17 g de agar-agar, se continúa calentando hasta fundir el agar-agar. Se ajusta el pH a 6.0 y se esteriliza 15 min a 121°C.

Caldo MLC (Medio de cultivo para *Colletotrichum*)

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Bifosfato de amonio	1 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Solución 0,1% de ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mL
Solución 0,5% de CuSO ₄ .5H ₂ O	1 mL
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar a 115°C (1/2 atm) durante 25 min)

Medio Luria-Bertani (LB)

Peptona	1% (p/v)
Extracto de levadura	0,5% (p/v)
NaCl	1% (p/v)
pH	7,5

LB-agar

Medio LB	
Agar-agar	2%

LB-glicerol

Medio LB	
Glicerol	30% (v/v)

LB-glucosa

Medio LB	
Glucosa	2% (p/v)

SOLUCIONES

Tris-HCl 1 M pH=8,0 (stock para las demás soluciones) (1 litro)

Preparación: Disolver 121,1 g de Trizma –base en 800 ml de agua destilada y añadir 42 mL de HCl. Dejar enfriar la solución y ajustar el pH a 8. Aforar hasta 1 L con agua destinada. Esterilizar a 115°C (1/2 atmósfera de presión) durante 25 min.

EDTA 0,5M pH=8 (stock para las demás soluciones) (1 litro)

Preparación: Disolver 186,1 g de EDTA en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con OH-Na (20 g aproximadamente). Aforar hasta 1 litro con agua destilada. Esterilizar a 115°C (1/2 atmósfera de presión) durante 25 min.

SDS 10% pH=7,2 (stock para las demás soluciones) (1 litro)

Preparación: Disolver 100 g de SDS en 900 mL de agua destilada. Calentar a 65°C hasta su completa disolución. Dejar enfriar y ajustar el pH a 7,2 con HCl. Aforar hasta un litro con agua destilada. Esterilizar a 115°C (1/2 atmósfera de presión) durante 25 min.

Acetato de potasio 5M

Acetato de potasio	58,94 g
Agua destilada	120 mL

Ajustar el pH a 4,8-5,0 con ácido acético glacial. Aforar hasta 200 mL con agua destilada, si es necesario. Esterilizar a 115°C durante 25 min.

Solución de lisis

Tris-HCl	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	3%
2-mercaptoetanol	1%

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar a 115°C durante 25 min.

Fenol-cloroformo-isoamílico

Preparación: Fundir el fenol sólido a 60°C en baño con el tapón parcialmente desenroscado para evitar la acumulación de vapores, hasta que se licúe. Añadir hidroxiquinoleína para incrementar el color amarillo y también como agente antioxidante.

Equilibrar el fenol líquido con Tris-HCl: realizar varios pasos repetidos, el primero consiste en mezclar el mismo volumen de fenol que de Tris-HCl 1M, agitar durante 15-20 min, esperar a que se

separen las fases y eliminar el Tris-HCl (arriba). Esta operación se repite 3 veces con Tris-HCl 0.5M, hasta que el Tris-HCl se encuentre a pH7. Almacenar a 4°C con una fina capa de Tris-HCl. Mezclar los tres componentes, en proporción 25:24:1 volumen.

ClNa 4M

Pesar 23,4 g de ClNa y disolverlo en 100 mL de agua destilada.

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

Buffer TBE (5x). Solución madre

Trizma-base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0.5M	20 mL

Disolver en 800 mL de agua destilada. Aforar a 1000 mL.

Buffer TBE (0,5x). Solución de trabajo

Tomar 100 mL del TBE (5x) y llevar a 1000 mL con agua destilada

Colorante de electroforesis

Glicerol	50 mL
BPB (Azul de bromo fenol)	0,5 g
EDTA 0,1 M	20 mL 0.5M pH8
Agua destilada csp	100 mL

Solución de Bromuro de etidio

Solución madre: 5 mg/mL de agua. Solución de trabajo: diluir la solución madre 1/100.

SOLUCIONES PARA TRANSFORMACIÓN MOPS (ácido 3 (N-morfolino) propanosulfónico)

Solución I de transformación

MOPS	10 mM
KCl	10 mM
pH=7	Ajustar con OHNa 10 M

Solución II de transformación

MOPS	100mM
KCl	10mM
CaCl ₂	50mM

pH=6,5

Ajustar con OHNa 10 M

SOLUCIONES PARA MINIPREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO**Solución I (GTE)**

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH: 8	25 mM
EDTA pH: 8	10 mM

Solución II

OHNa	0,2 N
SDS	1% (p/v)

Solución III (acetato de potasio 3M, pH: 4,8)

Acetato de potasio 5M	30 mL
Ácido acético	5,75 mL
Agua destilada	14,25 mL

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS**Gel de apilamiento**

Tris.HCl pH: 6,8	130 mM
SDS	0,05% (p/v)
Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	4,8% (p/v)
TEMED	0,1% (v/v)
Persulfato de amonio	0,05% (p/v)

Gel de separación

Tris.HCl pH: 8,8	375 mM
SDS	0,1% (p/v)
Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	15% (p/v)
Glicerol	10% (v/v)
TEMED	0,06% (v/v)
Persulfato de amonio	0,05% (p/v)

Buffer de muestra 2x

Tris-HCl pH: 6,8	125 mM
Glicerol	20% (v/v)

SDS	4% (p/v)
β -mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de bromo fenol	0,2% (p/v)

Buffer de corrida

Tris-HCl pH: 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (p/v)

Solución de tinción para geles SDS-PAGE. Azul de Coomasie

Azul de Coomasie G-250	0,5% (p/v)
Metanol	45% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Solución decolorante para geles SDS-PAGE

Etanol	45% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN COLUMNA DE PSEUDOAFINIDAD A NÍQUEL**Buffer de siembra para columna de Níquel**

Na_2HPO_4 pH8	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

Soluciones para la purificación en columna de Níquel

Na_2HPO_4 pH8	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	50 mM

Na_2HPO_4 pH8	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	100 mM

Na_2HPO_4 pH8	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

DOSAJE DE PROTEÍNAS**Reactivo de Bradford**

Azul de Coomasie	0,01% (v/v)
Etanol 95%	4,7% (v/v)
Ácido fosfórico 85%	8,5% (v/v)

Buffer para extracción de proteínas

Tris-Cl (pH 7,0)	100 mM
Sacarosa	250 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
Tritón X-100	0,1%
PMSF	1%
Agua	100 mL

ENSAYO DE ELISA

Buffer carbonato

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM
NaN ₃	3,1 mM
Ph	9,6

PBS 1x

NaCl	137 mM
KCl	2,7 M
Na ₂ HPO ₄	10 M
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH	7,4

PBS-Tween-20 1x

PBS	
Tween-20	0,01% (v/v)