

# ***Exserohilum turcicum* patógeno del maíz: Caracterización fenotípica y detección de metabolitos secundarios**

**Joana Macagno**

Cátedra de Microbiología General<sup>1</sup>. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Área: Ciencias Biológicas. Sub-Área: Biología

## **INTRODUCCIÓN**

En la búsqueda de formas de potenciar el desarrollo del país, el presente trabajo se centra en el estudio de un hongo patógeno que afecta el cultivo del maíz. El panorama sanitario de los cultivos de este cereal se ha ido transformando, de ser considerados cultivos prácticamente libres de enfermedades a la situación actual, en la que se presenta a los agentes patógenos como responsables de severas reducciones en el rendimiento y la calidad. En los últimos 30 años se han detectado más de 15 enfermedades que afectan al maíz. En la Argentina, existe un grupo considerable de dolencias, algunas de las cuales son endémicas de la zona maicera y se presentan cada año con diferentes grados de severidad. En las últimas campañas, se detectaron patologías emergentes o re-emergentes, dependiendo su aparición de las condiciones ambientales registradas, la forma de manejo del cultivo y los cultivares utilizados (Formento, 2010).

El tizón foliar por *Exserohilum turcicum* es una de las enfermedades re-emergentes considerada además como prevalente, que afecta el crecimiento de la planta de maíz, la calidad de los granos y reduce su producción (Ferraris y col., 2010). Las primeras lesiones aparecen desde etapas muy tempranas en las hojas inferiores como pequeñísimas manchas aisladas, oblongas, de color pajizo y con halo húmedo. Luego confluyen formando manchas extendidas, pardas, pardo oscuro o gris-verdosas, limitadas por un margen, de color marrón-rojizo oscuro, más o menos definido. En ataques graves, la enfermedad progresa hacia arriba, las hojas se deforman, marchitan y finalmente se secan, y la planta muere. El hongo sobrevive en el rastrojo y se disemina por el viento a grandes distancias (Formento, 2010).

Los síntomas como clorosis y necrosis en plantas son comúnmente asociados a la producción de micotoxinas. Se ha comprobado que *E. turcicum* es productor de un péptido con alta actividad biológica, tanto en su sustrato natural (plantas de maíz) como en medios artificiales, y que es considerado un determinante primordial de su virulencia y patogenicidad (Bashan y col., 1995; Zhang y col., 2007). Esta toxina ha sido identificada como monocerina y estudios de caracterización le han atribuido la inducción de la muerte celular (Cuq y col., 1993).

## **OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de aislamientos a partir de hojas de maíz que presentaban signos y síntomas del tizón foliar, provenientes de distintas localidades de la provincia de Santa Fe, y la posterior aplicación de técnicas clásicas que permitan determinar características poblacionales. La detección y caracterización

---

<sup>1</sup>Proyecto CAI+D "Caracterización fenotípica y genotípica de fitopatógenos re-emergentes en plantas de maíz y detección precoz de especies de *Cercospora* en plantas de soja por métodos moleculares" Director del proyecto: María Gabriela Latorre Rapela. Director Científica: Ludmila N. Turino. Co-Director Científica: María Fernanda Argaraña.

de metabolitos secundarios producidos por cada aislamiento complementará el estudio de la población. Así, la caracterización fenotípica de los aislamientos conducirá a un mayor conocimiento del fitopatógeno, de manera de colaborar con los planes de detección adecuada, gracias a una mayor precisión en la clasificación taxonómica de la especie, y prevención de la patología que produce.

## METODOLOGÍA

La obtención de los aislamientos se basó en el procesamiento de hojas de plantas de maíz con signos y síntomas visibles del tizón de la hoja. La esporulación de los hongos se estimuló en cámaras húmedas. Los trozos de tejido enfermo se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min y, a continuación, se enjuagaron con agua destilada estéril. A continuación, se seccionaron fragmentos de 0,5-1 cm y se colocaron dentro de las cámaras húmedas. El conjunto se incubó a  $26 \pm 0,5$  °C, bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz fría y 8 h de oscuridad)(Salvador y Garrido, 1990;LatorreRapela y col., 2011). Al cabo de 10 días de incubación, se comenzaron a observar bajo lupa estereoscópica. Verificado el crecimiento de las estructuras conidiales,éstas se sembraron en una placa de Petri conteniendo 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 inicialesETy un número correlativo correspondiente.

Para la caracterización fenotípica, cada uno de los aislamientos se sembró en superficie con un toque en una placa de Petri conteniendo 15 mL de APD y se incubó de igual modo al descrito anteriormente. Las observaciones macroscópicas se efectuaron a los 10 días por examen directo. También se observaron las características microscópicas de los conidios (estructuras fúngicas de valor taxonómico). La identificación se hizo con la ayuda de claves taxonómicas de los géneros *Bipolaris*, *Drechslera* y *Exserohilum* (Lutrell, 1963; Alcorn, 1983).

Para evaluar la capacidad de los diferentes aislamientos fúngicos de producir metabolitos secundarios se sembraron dos estrías de APD de cada uno, y fueron incubadas por 14 días de igual modo al descrito anteriormente. Posteriormente se agregaron 5 mL del medio Czapek-Docx modificado y se raspó la superficie de la colonia con un ansa estéril. La suspensión obtenida se agregó a 145 mL del mismo medio, y se incubó en idénticas condiciones durante 28 días. Al término de la incubación, se filtró el medio de cultivo y se le realizaron extracciones con cloroformo (3 x 1/3 del volumen filtrado). A continuación el cloroformo se evaporó hasta sequedad. Con el extracto obtenido de cada aislamiento, se realizó una TLC utilizando la mezcla Cloroformo:Metanol (25:1).El perfil de bandas se determinó bajo lámpara de 254 y 366 nm.En estas condiciones el *Rf* reportado para la monocerina es de 0,65 (Robeson y Strobel, 1982; Cuq y col., 1993; Zhang y col., 2007).

## RESULTADOS

Se obtuvieron 10 aislamientos provenientes de diferentes localidades de la provincia de Santa Fe. Los resultados obtenidos luego de la caracterización macro y microscópica se encuentran detallados en la Tabla 1. Todos los aislamientos estudiados mostraron exudado y bordes desflecados. Las colonias de 3 de los aislamientos invadieron la placa a los 10 días, mostraron una consistencia compacta y aterciopelada y tonalidad más oscura que el resto: ET21, ET23 y ET24. Teniendo en cuenta la caracterización microscópica, los aislamientos ET23 y ET24 presentaron características conidiales diferentes al resto: conidios cilíndricos y rectos, con sus polos claramente marcados por septos completos y de color marrón oscuro. Además

Tabla 1. Descripción de las observaciones macro y microscópicas para cada uno de los aislamientos obtenidos

Aislamiento (procedencia)	Caracterización Macroscópica				Caracterización Microscópica de los conidios				
	Diámetro (cm)	Consistencia	Tonalidad de la colonia		Dimensiones (µm)	Forma	Color	Nº de Septos	Hilo Basal
			Anverso	Reverso					
<b>ET15</b> (Angélica)	5,58	Laxa Algodonosa	Gris y blanco	Gris Verdoso	95,58 x 14,74	Fusiformes, rectos o curvos	Marrón	5-9	Protuberante
<b>ET16</b> (San Guillermo)	6,50		Gris	Gris Verdoso	86,86 x 14,82	Fusiformes, rectos		5-8	Protuberante
<b>ET17</b> (Angélica)	7,80		Gris	Gris Verdoso	94,12 x 15,77	Fusiformes, rectos o curvos		4-9	Protuberante
<b>ET18</b> (San Guillermo)	1,98		Gris y blanco	Gris Verdoso	91,25 x 13,43	Fusiformes, rectos		5-8	Protuberante
<b>ET19</b> (San Guillermo)	6,05		Gris y blanco	Gris Verdoso	77,91 x 13,51	Fusiformes, rectos		4-8	Protuberante
<b>ET20</b> (San Vicente)	3,98		Gris	Gris Verdoso	91,60 x 15,32	Fusiformes, rectos		5-8	Protuberante
<b>ET21</b> (San Vicente)	IP	Compacta Algodonosa	Verde oscuro y gris	Negro	22,24 x 8,64	Fusiformes, extremos romos		3-5	Truncado
<b>ET22</b> (San Guillermo)	5,00	Laxa Algodonosa	Gris medio	Gris Verdoso	85,06 x 14,53	Fusiformes, rectos		4-8	Protuberante
<b>ET23</b> (Esperanza)	IP	Compacta Aterciopelada	Verde oscuro y gris claro	Negro	63,08 x 14,18	Cilíndricos y rectos. Polos marcados por septos completos	Marrón oscuro	6-10	Protuberante
<b>ET24</b> (Esperanza)	IP		Verde oscuro	Negro	82,28 x 17,00		Marrón oscuro	6-14	Protuberante

IP= invade la placa

el rango de la cantidad de distoseptos fue más amplio que para el resto de los aislamientos. ET21 se diferenció del resto por poseer un hilo basal truncado y una mediana menor de número de septos. De acuerdo a las claves taxonómicas, ET21 podría tratarse de un aislamiento del género *Bipolaris*. El resto de los aislamientos, con hilo basal protuberante característico, pertenecerían al género *Exserohilum*, sin descartar que se traten de especies diferentes del mismo género.

Con respecto a la producción de metabolitos secundarios, todos los extractos fúngicos mostraron un perfil de bandas amplio al ser analizados por TLC, con valores de *Rf* entre 0.05 y 0.75. La producción de monocerina por parte de los aislamientos del género *Exserohilum*, excepto para ET24, se pudo corroborar por la presencia de una banda con  $Rf = 0.65 \pm 0.01$  (Robeson y Strobel, 1982). Un análisis más exhaustivo se necesita para confirmar la identidad de la toxina.

## CONCLUSIONES

La utilización de taxonomía clásica resulta controvertida, debido a que el género *Exserohilum* pertenece a un complejo de hongos con características morfológicas muy similares entre sí, sin embargo se han podido establecer algunas diferencias macro y microscópicas entre los aislamientos. La detección de la producción o no de monocerina también permitirá estudiar la ocurrencia de aislamientos con diferentes grados de patogenicidad.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Alcorn J.**, 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. Mycotaxon 17, 1-86.
- Bashan B., Levy R.S., Cojocarú M., Levy Y.**, 1995. Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. Physiol Mol Plant Pathol. 1995, 47, 225-235.
- Cuq F., Henmann-Gorline S., Kläbe A., Rossignol M., Petitprez M.**, 1993. Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. Phytochemistry, 34, 1265-1270.
- Dunkle L., Levy M.**, 2000. Genetic relatedness of african and United States populations of *Cercosporazeae-maydis*. Phytopathology 90: 486-490.
- Ferraris G., Couretot L.**, 2010. Caracterización y evaluación comparativa de cultivares de maíz en la localidad de Colón (Bs As). Campaña 2009/10. INTA. Accesible por Internet: <http://www.engormix.com/MAagricultura/maiz/articulos/culti-vares-de-maiz-t3197/417-p0.htm> Acceso: Septiembre 2015.
- Formento N.**, 2010. Enfermedades foliares reemergentes del cultivo de maíz: Royas (*Pucciniasorghy* y *Pucciniapolysora*), Tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) y Mancha ocular (*Kabatiellazeae*). INTA. Estación Experimental Agropecuaria Paraná. Actualización Técnica, 2, 89-100.
- Latorre Rapela M., Colombini M., González A., Vaira S., Maumary R., Mattio, M., Carrera E., Lurá M.**, 2011. Phenotypic and genotypic variability in *Cercosporakikuchi* isolates from Santa Fe province, Argentina. Soybean – Genetics and Novel Techniques for Yield Enhancement. Croacia, 97-112.
- Lutrell E.**, 1963. Taxonomic criteria in *Helminthosporium*. Mycologia 55, 643-674.
- Salvador D., Garrido M.**, 1990. Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo. Fitopatol. Venez. 3, 11-15.
- Robeson D., Strobel G.**, 1982. Monocerin, a Phytotoxin from *Exserohilum turcicum*. Agric. Biol. Chem., 46 (11), 2681-2683.
- Zhang L., Dong J., Wang C., Li Z.**, 2007. Purification and Structural Analysis of a Selective Toxin Fraction Produced by the Plant Pathogen *Setosphaeria turcica*. Agricultural Sciences in China 6(4), 452-457.