

## Trabajo completo

# Modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*

RECIBIDO: 06/07/2013

ACEPTADO: 13/09/2013

Latorre Rapela, M.G.<sup>1</sup> • Maumary, R.<sup>2</sup> • Marcipar, I.<sup>3</sup> • Lurá, M.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Argentina.

<sup>3</sup> Laboratorio de Tecnología Inmunológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Santa Fe, Argentina.

Email: latorrerapela@gmail.com

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto del modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*.

El ensayo se llevó a cabo en cámara de crecimiento con temperatura y humedad controladas. Las plantas se obtuvieron a partir de semillas de muy buena calidad y maduración. Las mismas, en estado fenológico V3, se inocularon con: *C. kikuchii* NBRC 6711; *C. sojina* NBRC 6715,

tres aislamientos regionales de *C. kikuchii* y un aislamiento de *Cladosporium* sp.

Las plantas se evaluaron visualmente y bajo lupa estereoscópica. A los 5 días post-inoculación, todas las especies *C. kikuchii*, produjeron lesiones compatibles con el tizón de la hoja. Las plantas inoculadas con *C. sojina* NBRC 6715 presentaron

la enfermedad mancha ojo de rana y *Cladosporium* sp. produjo una lesión diferente a las anteriores.

Este método de inoculación artificial permitió reproducir las enfermedades y determinar el período de incubación.

**PALABRAS CLAVE:** Inoculación artificial, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*.

**SUMMARY:** *Experimental infection model of soybean plants with Cercospora species*

The aim of this work was to develop an experimental model in order to infect soy plants with *Cercospora* species.

An assay was carried out in a growth chamber providing temperature and humidity controls.

The plants, obtained from very good quality seeds at phenological stage V3, were inoculated with *C. kikuchii* NBRC 6711, *C. sojina* NBRC 6715, three *C. kikuchii* regional isolates and a *Cladosporium* sp. isolate. Visual and stereoscopic magnifications were used for plant examination. Five days after inoculation, the lesions produced by all *C. kikuchii* species were compatible with soybean leaf blight. Plants inoculated with

*C. sojina* NBRC 6715 presented frog-eye leaf spot and *Cladosporium* sp. produced a different lesion.

This methodology allowed reproducing the symptoms of the diseases by applying the pathogen to healthy plants and determining the time at which injuries occurred.

**KEYWORDS:** Experimental infection, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*

### Introducción

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es uno de los cultivos más importantes en Argentina. En la provincia de Santa Fe, 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 zona, el que contribuye a la aparición de enfermedades con las consecuentes pérdidas en la producción (1, 2). La pérdida de rendimiento, puede llegar a tener una alta implicancia socioeconómica para toda la región (2).

Entre las enfermedades de final del ciclo de la soja, se encuentran el tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla, cuyo agente etiológico es *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner y la mancha en "ojo de rana" (MOR) ocasionada por *Cercospora sojina* Hara (2, 3). La prevalencia de una u otra depende de las condiciones de manejo del cultivo y de las características climáticas de la zona en consideración (1).

Se ha demostrado que uno de los factores de patogenicidad, de los que se valen numerosas especies de *Cercospora* es una toxina de color rojo, denominada cercosporina. La producción de esta toxina

desempeña un papel muy importante en la infección de la soja (4). 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 (5,6).

Para minimizar este problema, se utilizan diferentes estrategias entre las que se encuentra la aplicación de fertilizantes, fungicidas y herbicidas, combinada con el uso de cultivares de mayor potencial genético, la difusión masiva de materiales transgénicos en soja y las prácticas de manejo como la siembra directa (1, 7, 8).

La detección temprana del patógeno en la planta, constituye una estrategia complementaria para resguardar el medio ambiente y eliminar algunos de los factores de riesgo que afectan su rendimiento y la salud de los seres humanos y animales (9).

Ahora bien, la eficacia de las técnicas de detección y diagnóstico rápido se debe comprobar no sólo a nivel de pruebas de laboratorio sino también, en plantas desarrolladas bajo condiciones controladas y, en una 3<sup>o</sup> instancia, "a campo", siendo los ensayos "in vitro" un complemento necesario e imprescindible de las pruebas "a campo"(9).

En el laboratorio se pueden efectuar evaluaciones en condiciones controladas, de modo de minimizar los efectos del ambiente frente a 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 (10).

Es entonces que adquiere relevancia el desarrollo de métodos de inoculación artificial bajo condiciones controladas. Esta metodología 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 (11). Además, es muy útil para caracterizar la sintomatología, efectuar pruebas de selección genética y realizar estudios de epidemiología (12). Otras ventajas que presenta, es que permite un mejor control en el manejo del organismo, mayor seguridad en la evaluación de los síntomas, certeza de que no ocurrirán interferencias con otros microorganismos y rapidez en evaluar el material.

El objetivo de este trabajo fue implementar y optimizar un modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*.

### **Materiales y métodos**

Para la puesta a punto del modelo experimental de infección de plantas de soja se utilizaron semillas de muy buena calidad que no presentaban a simple vista, daño mecánico alguno.

Previo a la siembra se realizó su pregerminado, para lo cual se colocaron 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 (13). Luego, las semillas pregerminadas 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 y a los 45 días se seleccionaron las primeras hojas trifoliadas.

### **• Hongos utilizados y preparación de los inóculos**

Se trabajó con las cepas pertenecientes a la colección NITE Biological Resource Center (Japón): *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 y *Cercospora sojina* NBRC 6715 y con aislamientos regionales de *C. kikuchii*, para lo cual se seleccionaron hongos que producían cercosporina en concentraciones alta, mediana y baja (14) disponibles en el cepario de la cátedra; también se incorporó un aislamiento de *Cladosporium* sp. para el estudio de especificidad de género (15).

Para la preparación de los respectivos inóculos, cada uno de los hongos se sembró en 5 tubos conteniendo APD (agar papa dextrosa) y se incubaron durante 4 días a  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Transcurrida la incubación, se agregaron 5 mL de agua destilada estéril a cada tubo y se procedió a des-

prender las estructuras fúngicas con el ansa, mediante un raspado suave de la superficie del cultivo. La suspensión de las mismas se cuantificó efectuando recuentos microbiológicos (en placa en superficie) y se procedió a ajustar el inóculo de manera de obtener una suspensión de  $10^5$  UFC/mL (16).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### • Inoculación de las plantas

Se trabajó con 16 plantas en estado fenológico V3. Las mismas se dispusieron por grupos de a dos, de la siguiente manera:

- 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 cercosporina (según estudios efectuados y publicados por González y col. 14)

\* 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 productora de cercosporina ( $243,30 \pm 11,60$  nmol  $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$ )

- Plantas inoculadas con *C. sojina* NBRC 6715, cepa productora de cercosporina ( $553,08 \pm 5,36$  nmol  $\text{cyl}^{-1} \pm \text{SD}$ )

- Plantas inoculadas con *Cladosporium* sp.

Se seleccionaron las hojas trifoliadas correspondientes al primer y segundo par de hojas completamente desplegadas y cada planta se asperjó con 2 mL del inóculo

correspondiente, 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 (17).

#### • 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 (18). Una vez detectadas se inspeccionaron bajo lupa estereoscópica (10–40x), a fin de corroborar la presencia del agente infeccioso.

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 (19).

#### Resultados y discusión

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, elevadas pérdidas económicas y desastres ecológicos (20).

Como ya se comentó, 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 (11).

Durante el ensayo descrito en este trabajo, se comprobó que tanto los aislamientos regionales como las cepas de referencia fueron capaces de infectar las plantas, mientras que en la planta tratada con agua (control negativo) no se observó ningún tipo de lesión.

Recién a los 5 días post-inoculación, tanto la cepa patrón CK6711 como los aislamientos regionales CK23 y CK32, produjeron lesiones compatibles con el tizón de la hoja,

lo que se corroboró mediante la observación con lupa estereoscópica. Estos hongos, buenos productores de cercosporina, ocasionaron en ambas caras de las hojas, lesiones angulares o irregulares, que coalescieron formando áreas necróticas con un halo rojo debido a la presencia de la toxina (Fig. 1).

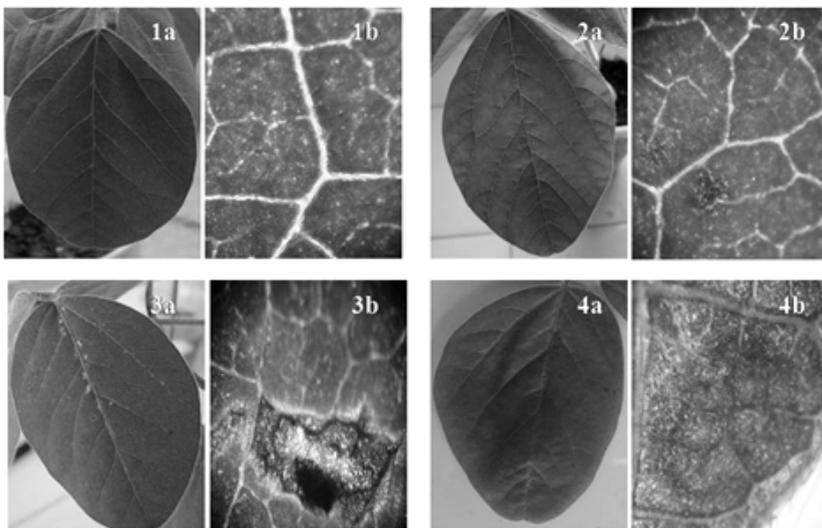
El aislamiento CK15, productor de baja concentración de cercosporina, también ocasionó lesiones pero las mismas fueron de tamaño pequeño y sin presencia de halo rojo (Fig.1).

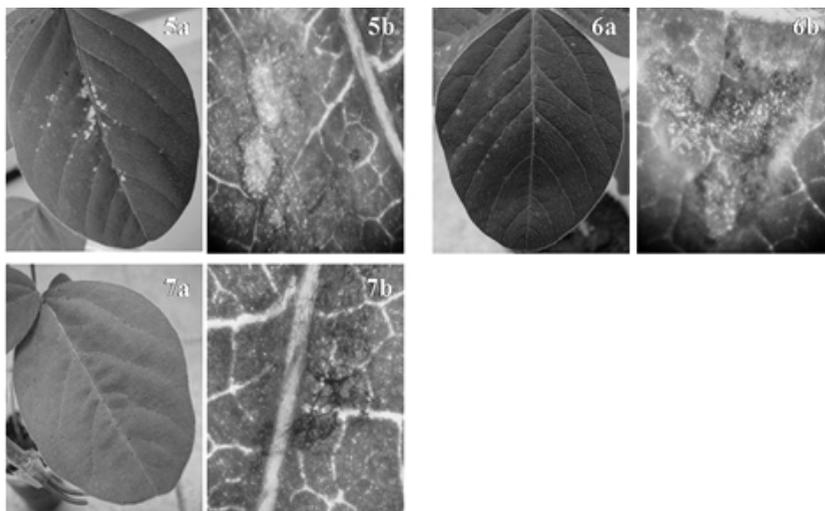
La planta inoculada con CS6715 presentó manchas de color castaño rojizo o grisáceas oscuras, rodeada de un delgado margen marrón rojizo, compatibles con MOR (Fig. 1).

A mayor aumento se pudieron distinguir, sobre la lesión, los conidióforos (Fig. 2).

Por su parte, *Cladosporium* sp. produjo una lesión diferente a las anteriores (Fig. 1).

Figura 1. Plantas de soja a los 5 días post-inoculación

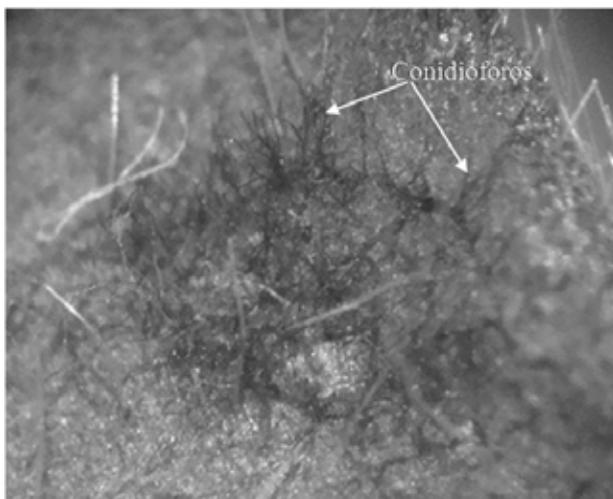




a: Observación de la hoja a simple vista; b: Observación de la hoja con lupa estereoscópica (40 x).

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 2. Planta inoculada con *Cercospora sojina* NBRC 6715



Observación con lupa estereoscópica (40x) de los conidióforos sobre la lesión en la hoja

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 y determinar el tiempo de aparición de las lesiones observadas a simple vista.

Coincidiendo con lo observado por Almeida y col. (21), los síntomas comenzaron a hacerse visibles a simple vista sobre las hojas de las plantas 5 días después de la inoculación. En cuanto a las lesiones observadas, los resultados fueron semejantes a los obtenidos por otros autores cuando inocularon plantas de soja con *C. kikuchii* productores de distintas concentraciones de cercosporina (4).

### Conclusiones

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.

### Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco de un Proyecto CAID 2009, financiado por Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

### Notas

**Resultados** parciales del trabajo fueron presentados en el XII Congreso Argentino de Microbiología (2010) y XII Congreso Argentino de Micología (2011).

<sup>1</sup> según estudios efectuados y publicados por el grupo de trabajo (González y col., 2008)

### Referencias bibliográficas

1. Formento, N., 2007. Enfermedades foliares de la soja: momento de aplicación de fungicidas y rendimientos. En: INTA (Ed.), "Información técnica de cultivos de verano. Campaña 2007". INTA EEA Rafaela (Argentina), **108**. Disponible en internet: <http://www.planetasoja.com/index.php?sec71&pag=1&ord=fechaPublicacion+DESC&fil=&selatab=1&tra=24712&orden=fechaPublicacion>. Fecha de acceso: Diciembre 2008.
2. Distéfano, S.G. y Gadbán, L.C., 2007. Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2006 – 2007. INTA EEA Marcos Juárez. Disponible en internet: <http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=78866&se=12>. Fecha de acceso: Junio 2012.
3. Ivancovich A; Botta G; D'Andrea F; Marchi L; Rostagno JC; Sillón M., 2002. "Relevamiento de enfermedades de fin de ciclo de la soja en áreas sojeras de las Provincias de Buenos Aires y Santa Fe (Argentina). Pautas para su manejo a través del uso de fungicidas". INTA. Cultivos de verano. Campaña 2002. N° 16. Disponible en Internet: <http://rafaela.inta.gov.ar/publicaciones/misc97/nro16.htm>. Fecha de acceso: Junio 2012.
4. Upchurch, R.G.; Walker, D.C.; Rollins, J.A.; Ehrenshaft, M.; Daub, M.E., 1991. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 2940–2945.
5. Pioli, R., 2007. Situación del Complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el cultivo de soja de Argentina. En: 3º Congreso de soja del Mercosur – Mercosojas (Ed.), "Compendio de Conferencias Plenarias. Protección Vegetal" Mercosojas (Argentina), I: 325–331. Disponible en Internet: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/blog/?p=12>. Fecha de acceso: Junio 2012.
6. Carmona, M.A.; Formento, A.N.; Scandiani, M.M., 2010. "Manual mancha ojo de rana". Ed. Horizonte A. Buenos Aires (Argentina), I:1–48.

7. Carmona, M., 2007. "Fungicidas: características, clasificación, especificidad. Resistencia de hongos y principales usos. Manual de las jornadas de Actualización elementos fundamentales para el buen uso de fitoterápicos, dosis, modo de acción y deriva". INTA EEAOC y Sociedad Rural de Tucumán (Argentina), I: 20 – 22
8. Carmona, M.; Reis, E. M., 2009. Critério: sistema de pontuação para aplicação de fungicidas para as doenças de final de ciclo na cultura da soja. En: Erlei Melo Reis. (Ed.). "Critérios indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doenças em soja e trigo". Aldeia Norte Editora (Brasil), I: 54 – 65.
9. Pupiro, M.L.; Malagón Rodríguez, L., 2003. Técnicas del diagnóstico de las enfermedades en las plantas. Trabajo de patología vegetal. Universidad Agraria de La Habana. La Habana.
10. 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) I: 1–217.
11. Bernal, A.; Martínez, B.; 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.
12. Gilchrist–Saavedra, L.; Fuentes Dávila, G.; Martínez–Cano, C.; López–Atilano, R.M.; Duveiller, E.; Singh, R.P.; Henry, M.; García A.I., 2005. "Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada". CIMMYT, D.F. (México) I: 1–68.
13. Copati Souza, L., 2001. Reação de genótipos de soja ao alumínio em hidroponia e no solo. Pesq.Agropec. Bras., Brasília, **36**: 1255–1260.
14. González, A.M.; Turino, L.; Latorre Rapela, M.G.; 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.
15. Moreno, N.; Agudelo–Flórez, P., 2010. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiples para la identificación de aislamientos de *Leptospora* spp. en Colombia. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública **27**: 548–556.
16. CLSI, 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38–A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
17. Layrisse, D.A.; 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.
18. Camacho de Torres, E.F.; Subero Martínez, L.J., 1992. Histopatología foliar de tres cultivares de maní atacados por *Cercospora arachidicola*. Rev. Fac. Agron. (Maracay) **18**: 325–338.
19. Salvador, D.; Garrido, M., 1990. Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo. Fitopatol. Venez. **3**: 11–15.
20. Agrios, G.N., 2007. Fitopatología LIMUSA, D.F., México.
21. Almeida, A.M.R.; Piuga, F.F.; Marín, S.R.R.; Binneck, E.; Sartori, F.; Costamilan, L.M.; Teixeira, M.R.O.; Lopes, M., 2005. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. Fitopatol. Bras. **30**: 594–602.