

Trabajos

Cercospora patógenas de soja: influencia de factores ambientales sobre su desarrollo. Degradación biológica de cercosporina

RECIBIDO: 4/5/05

ACEPTADO: 27/7/08

Mattio, M.C. • Turino, L. • González, A.M. •
Di Conza, J.A. • Latorre Rapela, M.G. • Vaccari, M.C. •
Iacona, V.A. • Lurá, M.C.

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina.

Correspondencia: María Cristina Lurá. Domingo Silva 1980 (3000) Santa Fe, Argentina. Tel: (0342)-4537227.
Email: mclura@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: En Argentina, *Cercospora kikuchii* ocasiona considerables pérdidas económicas en la soja. Su patogenicidad se atribuye a la toxina cercosporina. En este trabajo se caracterizaron fenotípicamente aislamientos de *C. kikuchii* provenientes de plantas de soja, que se cultivan en la Provincia de Santa Fe, Argentina. También se determinó la influencia de algunos factores ambientales y se evaluó la capacidad de degradar la cercosporina por parte de bacterias que se encuentran habitualmente en el medio ambiente. Se trabajó con una cepa de referencia y con aislamientos regionales. Se ensayaron diferentes medios artificiales, observándose las características macro y microscópicas y la producción de cercosporina, efectuando también recuentos de conidios. La degradación de la toxina se verificó por la

presencia de halos transparentes alrededor de las colonias de 24 bacterias cultivadas sobre un medio que contenía la toxina. Existieron comportamientos fúngicos muy variados frente a los diferentes medios de cultivo artificiales y algunas bacterias ambientales degradaron la cercosporina.
PALABRAS CLAVE: *Cercospora*, caracterización fenotípica, enfermedades de la soja, biodegradación.

SUMMARY: Soybean pathogen *Cercospora: environmental factors affecting its growth. Biological degradation of cercosporin.* In Argentina, *Cercospora kikuchii* causes considerable economic losses in soybean crops, its pathogenicity being attributable to cercosporin toxin. Phenotypical characterization of *C. kikuchii* isolated from soy cultivated in Santa Fe, Argentina,

was carried out; the influence of some environmental factors was determined; and the biodegradation of its phytotoxin was assayed using bacteria usually present in the environment. A culture type strain and regional isolates were cultured on different artificial media. Macroscopic and microscopic observations, evaluation of cercosporin production and counting of conidia were carried out. The degradation of cercosporin was confirmed through the

presence of transparent halos surrounding the colonies of 24 bacteria cultured on a toxin-containing agar medium. Fungal development was different for each substrate. Different artificial culture media induced very dissimilar fungal behavior. Some environmental bacteria were found to degrade cercosporin.

KEY WORDS: *Cercospora*, phenotypic characterization, soybean diseases, biodegradation.

Introducción

En Argentina, la soja (*Glycine max* L. Merr.) es el principal producto de la agricultura nacional. Entre las enfermedades que la afectan hacia el final de su ciclo se encuentran: el tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla, cuyo agente etiológico es *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner (1). Las plantas enfermas pierden gran cantidad de follaje, lo que adelanta su maduración, sin el llenado correcto de las vainas, y las semillas disminuyen su germinación (2). *C. kikuchii* sobrevive en los restos de plantas afectadas y en las semillas las que, aún siendo asintomáticas, se transforman en portadoras, constituyéndose en reservorio (1).

Las especies de *Cercospora* se caracterizan por presentar un crecimiento lento y una esporulación reducida en medios de cultivos artificiales, y se identifican habitualmente en base a las características fenotípicas que presentan cuando desarrollan sobre su sustrato natural, resultando mucho más complejo caracterizarlas a partir de medios artificiales. Un ejemplo es *C. kikuchii*, que esporula mucho menos cuando se cultiva, en laboratorio, sobre medios agarizados (3).

La patogenicidad de estos hongos se ve favorecida por la producción de una exotoxi-

na, de color rojo, denominada cercosporina. Esta toxina fue aislada en 1.957 a partir del micelio de *C. kikuchii* y, posteriormente, de un gran número de otras especies de *Cercospora* y de plantas infectadas con este género fúngico (4). Se la responsabiliza de muchos de los síntomas de la enfermedad. Su fitotoxicidad se debe a que es un compuesto fotosensibilizador capaz de absorber la luz y transferir la energía al O² que, a su vez, se transforma en compuestos muy tóxicos (Oxígeno "singlet" e iones superóxido). Como resultado se produce la oxidación de numerosos constituyentes celulares tales como ácidos grasos, azúcares y materiales celulósicos, se daña el ADN e inactivan enzimas y se destruyen las membranas celulares (5). Esta elevada toxicidad ha motivado que diferentes investigadores consideren de importancia detectar algún método biológico de degradación de la toxina con el objetivo, a largo plazo, de identificar genes de diferentes microorganismos que codifiquen sustancias que degraden la toxina, y transferirlos a las plantas, para así desarrollar resistencia transgénica a las enfermedades ocasionadas por *Cercospora* (6).

En la región central de la Provincia de Santa Fe, Argentina, en los últimos años, la

prevalencia del tizón por *Cercospora* ha aumentado considerablemente (7), siendo motivo de gran preocupación, por lo que se han impulsado diferentes líneas de investigación tendientes a profundizar el conocimiento del hongo y sus factores de patogenicidad.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) caracterizar fenotípicamente aislamientos de *Cercospora kikuchii* provenientes de plantas de soja que se cultivan en la Provincia de Santa Fe, Argentina, determinando la influencia de algunos factores ambientales; b) evaluar la capacidad de degradar la cercosporina por parte de bacterias que se encuentran habitualmente en el medio ambiente.

Materiales y Métodos

Se trabajó con una cepa de *C. kikuchii*, perteneciente a la colección NITE Biological Resource Center (Japón): *C. kikuchii* NBRC 6711, y con dos aislamientos obtenidos a partir de plantas de soja que exhibían síntomas típicos de la enfermedad, recolectadas en diferentes localidades (San Jerónimo Norte y Recreo) de la región Central de la Provincia de Santa Fe, Argentina (CKCOB y CKC9, respectivamente). Para aislar estos hongos regionales, cada una de las muestras se lavó con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos y, a continuación, se enjuagó con agua destilada estéril, procediéndose a incubarlas a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, bajo ciclos alternados de luz (16 horas de luz fría y 8 horas de oscuridad). Una vez desarrolladas las estructuras de reproducción, las mismas fueron inoculadas sobre agar papa dextrosa (PDA) (8). Cada aislamiento, identificado con una letra y un número correlativo, se conservó a 4°C hasta su procesamiento.

Para estudiar el efecto del pH sobre el crecimiento y esporulación, se utilizaron cinco medios de cultivo: agar jugo V8, preparado

a partir de jugo envasado "Campbells" y suplementado con carbonato de calcio (AV8) (9), agar conejarina con y sin carbonato de calcio (ACc/cc y AC, respectivamente) (10), agar extracto de malta (MEA) y PDA (8).

Cada uno de los medios fue ajustado a un pH comprendido entre 5,5 y 7, ambos inclusive, con intervalos de 0,5 unidad de pH. La siembra se efectuó en superficie y la incubación se llevó a cabo de igual modo al descrito anteriormente.

Las observaciones macro y microscópicas se efectuaron a los 14 días de incubación, teniendo en cuenta el diámetro de la colonia, la producción del pigmento rojo característico (cercosporina), el tipo de hifa y la presencia o ausencia de elementos de fructificación.

El recuento de los conidios se llevó a cabo en una suspensión de los mismos obtenida mediante el agregado de 7 ml de agua destilada estéril sobre cada colonia. Los recuentos se realizaron por duplicado, utilizando una cámara de Neubauer. Se calculó el número de conidios/colonia y se consideró el promedio de los datos obtenidos.

Para verificar si el pigmento rojo producido por los hongos era cercosporina, la misma se extrajo de la siguiente manera: A partir de cultivos de 7 días, se sembraron placas con 10 ml de PDA, se incubaron a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ bajo un régimen de iluminación discontinua con fotoperíodos de 16 horas (8 horas de oscuridad), durante 11 días. Se cortaron 3 cilindros (base 10 mm de diámetro) del borde de la colonia, se colocaron en 6 ml de KOH 5N y se conservaron durante 3 horas en oscuridad para la extracción de la cercosporina. Se realizó un barrido del extracto entre 400 y 700 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS (960 nm/min cada 1 nm). La producción de cercosporina se corroboró por la presencia

de los picos característicos a 480, 595 y 640 nm, analizados con el programa OriginPro 7. Paralelamente se trabajó con un testigo comercial (Sigma, lote 35082-49-6).

La concentración de cercosporina, expresada como nanomol/cilindro, se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 480 nm y usando un coeficiente de extinción molar de 23300, según lo señalado por Mitchell y col. (6). Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Degradación de Cercosporina.

Ensayo biológico con bacterias

Se agregó cercosporina (Sigma, lote 35082-49-6), disuelta en OHNa 0,1N hasta concentración final de 50 μ M, junto con igual volumen de HCl 0,1N, al medio agar nutritivo. El medio, de color rojo por la presencia de la toxina, se repartió en placas de Petri (6). Una vez solidificado, se sembraron en superficie, por toque con ansa aguja, distintas especies de bacterias. Luego de 12 días de incubación en oscuridad, a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, se observó la existencia o no de halos transparentes alrededor de la colonia, a fin de determinar si las bacterias analizadas eran capaces de degradar la toxina.

Las 24 cepas utilizadas fueron: *Bacillus cereus* ATCC 117780, *B. cereus* ATCC 4810, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (2 cepas), *Escherichia coli* (2 cepas), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp.*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* (3 cepas), *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* (4 cepas), *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* (2 cepas), *Xanthomonas campestris* y *Acinetobacter baumannii*. Con excepción de las pertenecientes a la colección ATCC, el resto de las bacterias, aisladas del medio ambiente, pertenecen al cepario de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Argentina.

Resultados y Discusión

Distintos factores ambientales influyen en el desarrollo y la esporulación *in vitro* de *C. kikuchii*. En 1980, Yeh y col. (11) efectuaron una revisión bibliográfica, advirtiendo que distintos autores obtenían resultados diferentes según los aislamientos estudiados.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en cuanto al desarrollo radial, el recuento de conidios y la producción de cercosporina.

De su observación surge claramente que, aunque todos los hongos desarrollaron sobre los diferentes sustratos, existió disparidad en los comportamientos fúngicos, confirmando los resultados obtenidos por Almeida y col. (12) para aislamientos de *C. kikuchii* de diferentes zonas de Brasil. En general, los mejores desarrollos se obtuvieron a pH 6,5, independientemente del medio de cultivo y del hongo.

En la Figura 1 se observan los conidióforos, de color castaño en la base y hialinos en el extremo, que dan origen a conidios aciculares, de base trunca y hialinos, derechos o curvados y multiseptados (Fig. 2).

En 1979, Chen y col. (13) determinaron la influencia de los factores ambientales sobre el desarrollo y la esporulación de *C. kikuchii*, obteniendo los mejores desarrollos sobre PDA y MEA; resultados similares se observaron con el aislamiento regional CKC9, en cambio el agar conejarina suplementado con carbonato de calcio facilitó el crecimiento de CKCOB.

En cuanto a la esporulación de los hongos no existe coincidencia con los datos de la bibliografía y los resultados obtenidos en este trabajo. Tanto Chen y col. (13) como Yeh y col. (11) consideran que el mejor medio de cultivo para obtener el mayor número de conidios es el agar Jugo V8. En este caso, AV8 sólo permitió la esporula-

Tabla 1: Aspectos fenotípicos de *Cercospora kikuchii* sobre diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	AV 8 ¹				ACC/cc ²				AC ³				PDA ⁴				MEA ⁵			
	5,5	6	6,5	7	5,5	6	6,5	7	5,5	6	6,5	7	5,5	6	6,5	7	5,5	6	6,5	7
Desarrollo radial																				
CK6711 ⁶	[Diagrama de desarrollo radial: 20 columnas de patrones de sombreado representando crecimiento radial en diferentes medios y pH]																			
CKCOB ⁷	[Diagrama de desarrollo radial: 20 columnas de patrones de sombreado representando crecimiento radial en diferentes medios y pH]																			
CKC9 ⁷	[Diagrama de desarrollo radial: 20 columnas de patrones de sombreado representando crecimiento radial en diferentes medios y pH]																			
Recuento de conidios (Conidios/colonia)																				
CK6711 ⁶	[Tabla de recuento de conidios: 20 columnas de valores numéricos]																			
CKCOB ⁷	[Tabla de recuento de conidios: 20 columnas de valores numéricos]																			
CKC9 ⁷	[Tabla de recuento de conidios: 20 columnas de valores numéricos]																			
Difusión de pigmento																				
CK6711 ⁶	[Diagrama de difusión de pigmento: 20 columnas de patrones de sombreado representando difusión de pigmento]																			
CKCOB ⁷	[Diagrama de difusión de pigmento: 20 columnas de patrones de sombreado representando difusión de pigmento]																			
CKC9 ⁷	[Diagrama de difusión de pigmento: 20 columnas de patrones de sombreado representando difusión de pigmento]																			

¹ Agar Jugo V 8; ² Agar Conejarina suplementado con carbonato de calcio; ³ Agar Conejarina; ⁴ Agar Papa Dextrosa; ⁵ Agar Extracto de Malta; ⁶ *Cercospora kikuchii* NBRC 6711; ⁷ aislamientos regionales; NS: método de recuento no sensible; ■ ≥ 43 mm; ▨ 35-42 mm; □ ≤ 34 mm; ▣ +++; ▢ ++; ▤ +; □ no producción de conidios.

Figura 1: Conidióforos color castaño de *Cercospora kikuchii*. Observación personal. 400x.

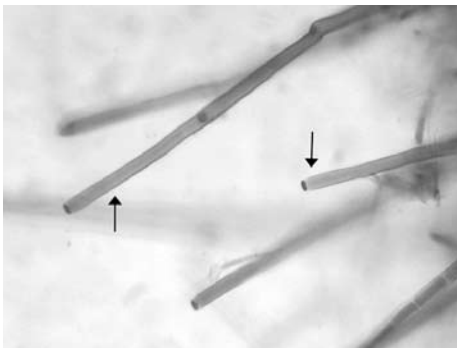


Figura 2: Conidio hialino de *Cercospora kikuchii* que nace a partir del conidióforo. Observación personal. 400x



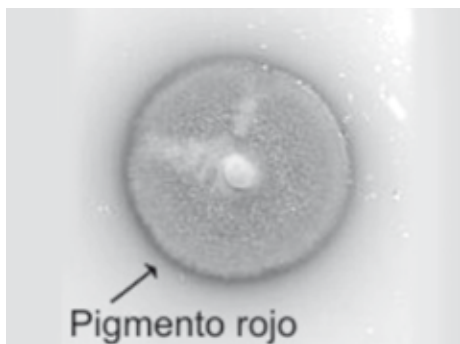
ción, muy escasa, de CKC9 y los mejores resultados para CKCOB se obtuvieron sobre Agar conejarina con o sin el suplemento de carbonato de calcio. Debe destacarse que estos medios han sido sugeridos para la esporulación de diferentes especies de *Cercospora* (10).

La cepa de colección, CK6711, presentó menor desarrollo que los aislamientos regionales en la mayoría de los ensayos y no se detectó esporulación en ninguno de los medios utilizados, lo que podría deberse al estrés generado por la conservación. Sin embargo, mantuvo intacta su capacidad de producir cercosporina, siendo el único de los 3 hongos que lo hizo sobre todos los sustratos analizados.

La producción del pigmento también varió en intensidad según el medio de cultivo, siendo los más adecuados PDA y, sobre todo, MEA. Efectuada la cuantificación de la toxina, sobre PDA, los valores obtenidos fueron: para CK6711: 327,11 nmol/cilindro; para CKCOB: 503,51 nmol/cilindro y para CKC9: 31,04 nmol/cilindro.

La pigmentación alrededor de las colonias causada por la toxina, de color rojo, se observa en la figura 3. Por ser un metabolito secundario, su producción depende de las condiciones nutricionales y ambientales y, a menudo, de las cepas o los aislamientos. Si bien es conocido el hecho de que la cercosporina no es específica de una especie del género *Cercospora*, sí lo es para la viru-

Figura 3: Desarrollo de *Cercospora kikuchii* sobre PDA, luego de 14 días de incubación. Observación personal.

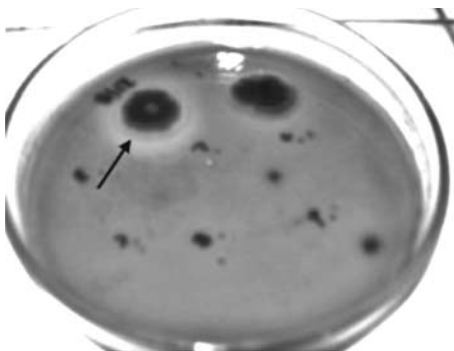


lencia del aislamiento al infectar la soja. Almeida y col. (12) consideran que la observación del color rojo alrededor de la colonia no es importante para predecir la virulencia, ya que se han detectado aislamientos no pigmentados y virulentos. No obstante, demostraron que la presencia del pigmento está en relación directa con el daño a la planta.

En cuanto al ensayo biológico con la toxina, de las 24 bacterias ensayadas, sólo *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* (una cepa de cada una, respectivamente) demostraron capacidad para degradarla. Los halos, producto de la degradación, se observan en la Figura 4.

En su trabajo, Mitchell y col. (6) efectuaron el ensayo con 244 cepas y patovariedades diferentes, de las cuales, sólo 43 fueron capaces de degradar la toxina. Ahora bien, 32 de esos 43 aislamientos, fueron *X. campestris* pv. *zinniae*, que respondieron positivamente al ensayo, independientemente de su lugar de origen y fecha de aislamiento.

Figura 4: Colonias de bacterias desarrolladas sobre Agar nutritivo adicionado de 50 μ M de cercosporina, incubado 12 días en oscuridad. La flecha indica el halo de degradación de la toxina por *Stenotrophomonas maltophilia*. Negativo para el resto de las cepas. Observación personal.



to. Sin embargo, no sucedió lo mismo con otras bacterias estudiadas como *X. campestris* pv. *pruni*, ya que demostraron heterogeneidad en las respuestas al ensayo, aún perteneciendo a la misma patovariedad (6). Esto podría explicar por qué en este caso no se obtuvieron resultados positivos con la cepa de *X. campestris* (cuya patovariedad era desconocida).

Tampoco coincidieron los resultados con *B. subtilis* ni *B. cereus*, ya que los mencionados autores (6), aún habiendo ensayado una sola cepa de cada especie, obtuvieron excelentes respuestas. Sí fueron coincidentes con lo acontecido con *E. coli*.

En cuanto a las dos especies que, en este trabajo, fueron capaces de degradar la cercosporina, Mitchell y col. (6) no presentaron datos. En vista de estos resultados promisorios respecto de estas dos especies presentes en el medio ambiente de la zona, se considera necesario ampliar el número de cepas a ensayar y determinar sus patovariedades a fin de realizar un análisis más exhaustivo.

Conclusiones

1. Los datos obtenidos pusieron en evidencia un considerable grado de variación en el comportamiento fenotípico *in vitro* de los aislamientos de *C. kikuchii* estudiados, frente a diferentes condiciones ambientales.

2. Se hallaron dos bacilos Gram negativos, provenientes del medio ambiente, que mostraron capacidad de degradar la cercosporina.

Para países como Argentina, es muy importante conocer todos los aspectos relacionados con el patógeno *C. kikuchii* a fin de contribuir con los programas de control de dos de las enfermedades más relevantes del fin de ciclo de la soja: el tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla. Dado el

hallazgo en este trabajo de dos biodegradadores de cercosporina no reportados aún en la bibliografía, se considera de relevancia intensificar estas líneas de trabajo.

Agradecimientos

A la ANPCYT que financió el Proyecto PICTO 08-13208 dentro del cual se realizó el presente trabajo. A los integrantes del Programa RiiA (UNL/FCA- INTA, Argentina) por la realización de los muestreos.

Nota

Resultados parciales del trabajo fueron presentados en los siguientes eventos científicos:

- III Encuentro Bioquímico del Litoral- VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas de la FBCB (UNL)
- III Congreso de Soja del Mercosur - Mercosoja 2006
- XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM- Empreendedorismo, Inovação Tecnológica e Desenvolvimento Regional
- Décimo Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL y Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe.

Bibliografía

1. Cai, G. y Schneider, R. W. 2005. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of *Cercospora* Leaf Blight and Purple Seed Stain in soybean. *Phytopathol.* **95**: 257-261.
2. 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. INTA EEA. Paraná, 4 p. http://www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/soja/enfermedades/Soja_Enf._de_Fin_de_Ciclo.pdf

3. Wang, J.; Levy, M. y Dunkle, L.D. 1998. Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. *Phytopathol.* **88**: 1269-1275.
4. Assante, G.; Locci, L.; Camarda, L.; Merlini, L. y Nasini, G. 1977. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochem.* **16**: 243-247.
5. Daub, M. E. 1982. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytopathol.* **72**: 370-374.
6. Mitchell, T. K.; Chilton, W. S. y Daub, M. E. 2002. Biodegradation of the polyketide toxin cercosporin. *Appl. Environm. Microbiol.* **68**: 4173-4181.
7. Ivancovich, A.; Botta, G. y Couretot, L. 2007. Enfermedades de final de ciclo de la soja. *Revista de Tecnología Agropecuaria, INTA Pergamino.* <http://www.inta.gov.ar/PERGAMINO/info/documentos/2007/sojenfe0701082.htm>
8. Pitt, J. I. y Hocking, A. D. 1999. "Fungi and food spoilage". Aspen Publishers, Inc. (Maryland). I. 509-513.
9. Brunelli, K.R.; Fazza, A.C.; Athayde Sobrinho, C. y Camargo, L.E.A. 2006. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. *Summa Phytopatol.* **32**: 92-94.
10. Salvador, D. y Garrido, M. I. 1990. Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo. *Fitopatol. Venezol.* **3**: 11-15.
11. Yeh, C.C. y Sinclair, J. B. 1980. Sporulation and variation in size of conidia and conidiophores among five isolates of *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis.* **64**: 373-374.
12. Almeida, A. M. R.; Pinga, F. F.; Marín, 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.* **39**: 594-602.
13. Chen, M. D.; Lyda, S. D. y Halliwell, R. S. 1979. Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. *Mycol.* **71**: 1150-1157.