



## Encuentro de JÓVENES INVESTIGADORES

### ESTUDIOS ETIOLÓGICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE SÍNTOMAS ASOCIADOS A MANCHA GRIS DEL MAÍZ EN LA ZONA NÚCLEO SANTAFESINA.

**Cavallero, Román**

*Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral*

Directora: Roxana Maumary

Codirector: German Schlie

Área: Ingeniería

Palabras claves: Mancha gris, Maíz, ADN

#### INTRODUCCIÓN

En la última década, el área destinada a maíces tardíos en Santa Fe ha aumentado progresivamente y se han profundizado los problemas sanitarios a nivel foliar y en consecuencia de enfermedades de raíz y tallo. Desde la campaña 2014/2015 se viene detectando en la región centro de Santa Fe, la presencia de mancha gris/lineal (MG) causada por *cercospora zae-maydis*, considerada una enfermedad de fin de ciclo (EFC), y se encuentra en el mismo grupo que el tizón, afectando a las hojas con necrosis.

#### OBJETIVOS

- Procesar material conservado y fresco para generar una colección de aislados de MG del maíz de distintos sitios.
- Identificar según características morfológicas y moleculares los diferentes aislamientos fúngicos seleccionados.
- Realizar pruebas de patogenicidad sobre genotipos de maíz introducidos y/o comerciales disponibles más comúnmente utilizados en la región bajo estudio.

Título del proyecto: Estudios etiológicos y epidemiológicos de síntomas asociados a mancha blanca y mancha gris del maíz en la zona núcleo santafesina.

Instrumento: PI TIPO I

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Director/a: Roxana Maumary



## METODOLOGÍA

Para determinar la identidad de los agentes causales de MG en el cultivo de maíz, se recolectaron muestras de hojas de maíz de diferentes híbridos en estadio VT según escala de Ritchie (Ritchie et al., 1993) y diferentes lotes de las provincias de Santa Fe y Córdoba. Para obtener los aislados, se colocó el material vegetal en agua con hipoclorito 50% durante 30 segundos y luego otros 30 segundos en agua destilada. Posteriormente, se colocó en una cámara húmeda por un periodo de 48 hs, con un fotoperíodo de 12 hs y una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  para facilitar el desarrollo de las estructuras fúngicas.

Pasado el tiempo requerido en cámara húmeda, se recortaron pequeños fragmentos de tejido vegetal para generar una suspensión en agua destilada estéril; luego se extrajo una alícuota de la suspensión y se sembró en medio de cultivo de agar papa con el agregado de estreptomina. Se realizaron repeticiones para cada material vegetal, utilizando 2 técnicas de siembra: a) toque de esporas y b) suspensión de esporas.

A continuación, con el material recolectado y aislado en medio de cultivo, se lograron cultivos monospóricos de cuatro cepas aisladas a partir de cuatro híbridos diferentes. A los cuales se las nombro como "Czm1", "Czm2", "Czm3" y "Czm4". Luego, se caracterizaron morfológicamente mediante la observación macroscópica de las colonias, evaluando color y características del micelio, tinción del medio de cultivo y velocidad de crecimiento. Microscópicamente se observó la forma, el color de los conidios y presencia de estados sexuales o teleomorfos.

Para la identificación molecular de los patógenos de MG, en primera instancia se realizó la extracción de ADN del material vegetal y luego se utilizó la metodología propuesta por Gonçalves et al. (2013). Se amplificó, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la región ITS (del inglés "internal transcribed spacer") del ADN nuclear ribosomal (rDNA), utilizando los cebadores universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3')/ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990). El producto de amplificación obtenido se envió a secuenciar a Macrogen (Seúl, Corea) y los resultados serán comparados utilizando BLAST con los depositados en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para confirmar la patogenicidad de los aislamientos obtenidos, se sembraron diez híbridos de maíz diferentes en macetas que contenían un 75% tierra y un 25% sustrato orgánico previamente esterilizado. Por cada híbrido, se realizaron cinco repeticiones (debido a la cantidad de cepas obtenidas) y se colocaron en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo. Posteriormente, se realizaron técnicas de inoculación artificial sobre las plantas de maíz, de manera que cada híbrido fue inoculado por cada una de las cuatro cepas, dejando una planta como control.

La inoculación propiamente dicha, se realizó mediante la aspersión de una suspensión de esporos  $10^4/\text{ml}$  sobre las hojas de maíz totalmente desplegadas (Lanza et al.; 2013). Luego de la inoculación las plantas fueron sometidas a cámaras húmedas por un período de 24 hs, período necesario para la germinación de esporos y penetración en el hospedante. Las plantas control fueron asperjadas con agua estéril. Posterior a la inoculación, las hojas de maíz infectadas artificialmente se recubrieron con una bolsa de nylon previamente humedecida con agua estéril para mantener la humedad relativa del ambiente cercana a la saturación, y así favorecer el desarrollo de síntomas.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se logró generar una colección de trece diferentes aislados de mancha gris con material herborizado, y también se lograron cuatro aislamientos monospóricos (Czm1, Czm2, Czm3 y Czm4) en medio de cultivo (en la figura 1 se muestra el aislamiento Czm3 en medio de cultivo). Se pudo comprobar que el medio con agar papa y agregado de estreptomicina logró un buen crecimiento. Además, se evidenció que el método de siembra por suspensión de spora fue el adecuado ya que hubo gran crecimiento micelar mientras que en el método de spora no hubo crecimiento.

A estos aislamientos monospóricos se les realizó la extracción de ADN, el cual fue posteriormente amplificado mediante PCR específica y luego para corroborar el resultado de la PCR se realizó una electroforesis (figura 2). El resultado de la PCR fue positivo, en la figura 3 se pueden ver los resultados de la electroforesis, las calles 1; 2 y 3 corresponden a tres extracciones de ADN diferentes (Czm1, Czm2 y Czm3 respectivamente) y las calles 4; 5 y 6 al control positivo, control negativo y marcador.

También se ha avanzado en la siembra y preparación de los híbridos que serán inoculados para las pruebas de patogenicidad. En la figura 4 se pueden ver los plantines el día 7 después de la siembra.

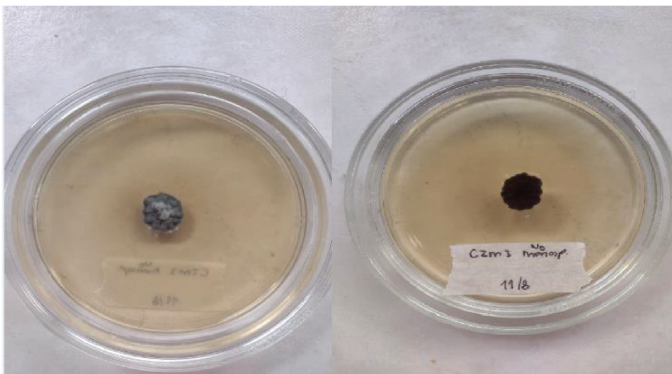


Figura 1: Aislamiento Czm3 en medio de cultivo.



Figura 2. Electroforesis del material amplificado por PCR.



Figura 3: Resultado de electroforesis.



Figura 4. Híbridos de maíz con 7 días

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Gonçalves, R.; Figueiredo, J.; Pedro, E.; Meirelles, W.; Leite Junior, R.; Sauer, A.; Costa, R.; Cota, L.; Silva, D. & Pacola-Meirelles, L.** 2013. Mancha foliar de *Phaeosphaeria* (mancha blanca do milho): Fungo ou bacteria?. Embrapa. v. 79. 36
- Lanza, F.E; Zambolim, L.; Casela, C.R.; Costa, R.V. Cota, L.V. Silva, D.D. and Figueiredo, J.E.F.** 2013. Etiology and epidemiological variables associated with maize resistance to white spot disease. *Journal of Plant Pathology* 95 (2), Edizioni ETS Pisa.
- Ritchie, S.W. y Hanway, J.J.** 1993. How a corn plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service. 21p. (Special Report, 48).
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J.,** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. Academic Press, New York, NY, USA.

