

Cercospora kikuchii aislada en la provincia de Santa Fe (Argentina): variabilidad genética y producción de cercosporina in vitro

Ana María González, Ludmila Turino, María Gabriela Latorre Rapela y María Cristina Lurá

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

Resumen

Los objetivos del trabajo fueron analizar la variabilidad genética y la producción de cercosporina in vitro de los aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii* obtenidos a partir de soja cultivada en la región centro-norte de la provincia de Santa Fe (Argentina) y evaluar si existía relación entre los perfiles de RAPD obtenidos y la producción de la toxina. Se utilizó la cepa *C. kikuchii* NBRC 6711 y 13 aislamientos obtenidos de plantas de soja, con síntomas de tizón de la hoja. La producción y cuantificación de cercosporina se analizó previo cultivo en agar papa dextrosa. La toxina se extrajo en medio alcalino y su concentración se determinó por espectrofotometría. La población de *C. kikuchii* estudiada resultó variable genéticamente, detectándose nueve grupos, y en su capacidad de producir cercosporina in vitro. No se encontró relación entre la producción de la toxina y los perfiles por RAPD.

Palabras clave

Cercospora kikuchii, RAPD, Variabilidad genética, Cercosporina

Cercospora kikuchii isolated from Province of Santa Fe (Argentina): genetic variability and cercosporin production

Summary

The aims of the present study were to analyze the genetic variability of *Cercospora kikuchii* isolates and the *in vitro* cercosporin production, of these isolates obtained from soybean at the central-northern region of Santa Fe province (Argentina). Also the relationship between RAPD profiles and toxin production was also assessed. The strain *C. kikuchii* NBRC 6711 and 13 soybean isolates with symptoms of leaf blight were tested. Cercosporin production was analyzed by growing the fungus on Potato Dextrose Agar, extracting the toxin in alkaline medium and determining its concentration by spectrophotometry. The population of *C. kikuchii* studied showed variability, both genotypically, nine different groups were encountered, and have the ability to produce cercosporin. No relationship was found between toxin production and the RAPD profiles.

Key words

Cercospora kikuchii, RAPD, Genetic variability, Cercosporin

Las enfermedades de fin de ciclo de la soja (*Glycine max* L. Merr.) ocasionan pérdidas considerables en su rendimiento; entre ellas, el tizón de la hoja, en Argentina, produce mermas de hasta el 50-80% [15]. Su agente

causal, *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner, tiene una amplia distribución mundial [3] y es uno de los hongos prevalentes en la soja cultivada en la provincia de Santa Fe, dado que en esta región encuentra las condiciones de temperatura y humedad óptimas para su crecimiento [19]. *C. kikuchii* produce una toxina no específica de la soja, de color rojo, denominada cercosporina (1,12-bis-(2-hydroxipropil)-2,11-dimetoxi-6,7-metileno-dioxi-4,9-dihidroxiperylene-3,10-quinona), aislada por primera vez en 1957 a partir del micelio de este hongo y, posteriormente, de un gran número de otras especies de *Cercospora* y de plantas infectadas por hongos pertenecientes a este género [2,8,12].

Esta toxina desempeña un papel muy importante en la habilidad del hongo para infectar la soja y es un factor de virulencia que interviene en la severidad de la enfermedad. Su mecanismo de acción es dependiente de la luz [2,5,12,18].

Dirección para correspondencia:

Dra. Ana María González
Catamarca 3580
(3000) Santa Fe
Argentina
Tel./Fax: + 54 3424534372
E-mail: amgpodio@fbc.unl.edu.ar

Aceptado para publicación el 12 de mayo de 2008

©2008 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

El conocimiento de la epidemiología y de la estructura poblacional de *C. kikuchii* es de suma importancia tanto para la prevención como para el control de las enfermedades [3,14]. Sin embargo, en Argentina no se han reportado estudios al respecto. Diferentes autores, han propuesto la aplicación de la técnica *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) para detectar la variabilidad genética de este agente [1,3]. Dicha técnica es un método de PCR rápido y sencillo que genera un patrón de "huellas digitales" [20].

Los objetivos del trabajo fueron analizar la variabilidad genética, mediante RAPD, y la producción de cercosporina in vitro de los aislamientos regionales de *C. kikuchii* obtenidos a partir de soja cultivada en la región centro-norte de la provincia de Santa Fe, y evaluar si existía relación entre los perfiles de RAPD obtenidos y la producción de la toxina.

Material y métodos

Aislamiento de *C. kikuchii*. Los aislamientos fueron obtenidos a partir de plantas de soja (Tabla 1), cultivadas durante la campaña agrícola 2004-2005, en la región centro-norte de la provincia de Santa Fe, Argentina, que presentaban síntomas compatibles con el tizón de la hoja. Se colocaron trozos de tejido enfermo en cámara húmeda y se incubaron a $26 \pm 0,5$ °C, con fotoperíodos de 16 h (8 h de oscuridad), a fin de estimular su esporulación, según la técnica descrita por Salvador y cols. [16]. Tras cinco días, se observaron los trozos de tejido mediante lupa estereoscópica, a fin de determinar si existían las estructuras conidiales características, las cuales se repicaron sobre agar patata dextrosa, incubando durante ocho días bajo el mismo régimen de iluminación y temperatura.

Caracterización molecular de los aislamientos por RAPD. La extracción del ADN fúngico se realizó según la metodología de Di Conza y cols. [6]. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo según lo propuesto por Williams y cols. [20]. Se ensayaron 20 oligonucleótidos pertenecientes a la serie OPA (OPA 01-20, FAGOS/Rurallex, Argentina) con cada uno de los aislamientos. En las reacciones de PCR se utilizó un volumen total de 50 µl que contenía los siguientes reactivos: 20 ng de ADN, 2,5 mM de cloruro de magnesio, 125 µM de cada dNTP (Inbio-Highway, Argentina), 1 µM de cebador y 5 U de Taq polimerasa (Inbio-Highway). La reacción de amplificación se realizó utilizando un termociclador MJ Research Thermal Cycler en las siguientes condiciones: un ciclo de 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 75 s a 94 °C, 90 s a 36 °C, 150 s a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C. Todas las reacciones se hicieron por duplicado y se incluyó un control negativo, sin ADN, en cada una de ellas. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con el agregado de bromuro de etidio, y corridos en buffer TBE 0,5X (0,089 M Tris-borato, 0,002 M EDTA) a 100 V durante 90 min [17]. Los perfiles de bandas obtenidos fueron observados y fotografiados en un transiluminador de luz UV (DiyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator, Labnet). La ausencia o presencia de cada banda observada se consideró como 0 ó 1, respectivamente. De esta manera, se obtuvo la matriz de distancia mediante el software RAPDistance 1.04, aplicando el algoritmo de Dice (D). La relación entre los aislamientos estudiados se representó gráficamente mediante un dendrograma utilizando el método UPGMA del programa MEGA versión 2.1. Se consideró que los aislamientos que compartían un 85% o más de similitud pertenecían a un mismo grupo.

Capacidad de producción de cercosporina in vitro. Para cada uno de los aislamientos se llevó a cabo la metodología basada en lo propuesto por Jenns y cols. [10]. A partir de cultivos de siete días, se inocularon placas conteniendo 10 ml de agar patata dextrosa. Se incubaron a $26 \pm 0,5$ °C durante 11 días con fotoperíodos de 16 h (8 h de oscuridad). Luego se cortaron tres cilindros (10 mm de diámetro) del borde de la colonia y se colocaron en 6 ml de KOH 5 N, se fragmentaron con varilla de vidrio y se conservaron durante 3 h en oscuridad para la extracción de la cercosporina. Se centrifugó a 7.500 rpm durante 20 min, se separaron los sobrenadantes y se les realizó un barrido entre 400 y 700 nm con espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS (960 nm/min cada 1 nm) frente a blanco. La cercosporina se corroboró por la presencia de 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 se determinó midiendo la absorbancia de los sobrenadantes obtenidos a 480 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar de 23.300 [4]. Dichos experimentos se realizaron por duplicado.

Cepa control. En todos los ensayos se utilizó una cepa de *C. kikuchii* perteneciente a la colección NITE Biological Resource Center: *C. kikuchii* NBRC 6711 (CK6711).

Tabla 1. Aislamientos de *C. kikuchii* provenientes de la región centro-norte de la Provincia de Santa Fe. Campaña 2004/2005

Denominación	Localidad de origen	Cultivar
C ₀	San Gerónimo	A 8000 Nidera
C _{0A}	San Gerónimo	A 8000 Nidera
C _{0B}	San Gerónimo	A 8000 Nidera
C _{0C}	San Gerónimo	A 8000 Nidera
C _{0H}	San Gerónimo	A 8000 Nidera
C ₁	San Justo	A 3901 Nidera
C ₂	Villa Trinidad	DM 3700
C ₃	Esperanza	A 5409
C ₄	Videla	ACA 530
C ₅	Videla	ACA 530
C ₆	Esperanza	A 7118
C ₈	Recreo	8000 RG Nidera
C ₉	Recreo	8000 RG Nidera

Tabla 2. Polimorfismos de los aislamientos regionales y *C. kikuchii* NBRC 6711. Grupos obtenidos con más del 85% de similitud según el análisis de RAPD

Oligonucleótido ¹	Total de fragmentos	Nº de polimorfismos	Nº de grupos obtenidos
OPA 01	30	30	5
OPA 02	9	6	3
OPA 03	19	18	7
OPA 05	19	19	9
OPA 08	22	22	9
OPA 12	21	21	7
OPA 13	12	7	2
OPA 14	22	20	6
OPA 15	15	15	5
OPA 16	27	25	7
OPA 17	27	26	5
OPA 18	19	19	4
OPA 19	25	25	6
OPA 20	26	25	8

¹ OPA04, OPA06, OPA07, OPA09, OPA10 y OPA11: no produjeron amplificación.

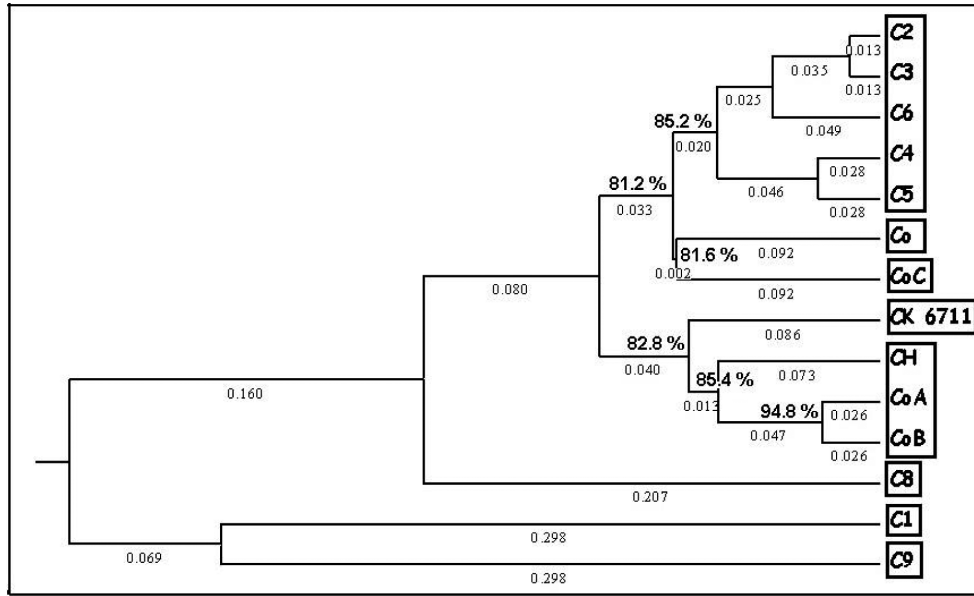


Figura 1. Similitud genética entre *C. kikuchii* aisladas en la Provincia de Santa Fe, Argentina. Dendrograma basado en el análisis de UPGMA. CK 6711: *C. kikuchii* NBRC 6711; Co, CoA, CoB, CoC, CH, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8 y C9: aislamientos regionales de *C. kikuchii*. El dendrograma se elaboró con los patrones de bandas obtenidos con OPA 01, 03, 05, 08, 12, 14 - 17, 19 - 20. Los aislamientos que compartían una similitud $\geq 85\%$ fueron agrupados y se muestran dentro de recuadros. Cada recuadro representa un grupo diferente.

Resultados

La tabla 1 muestra el origen de los aislamientos de *C. kikuchii*. De los 20 cebadores utilizados, 14 amplificaron ADN con la técnica RAPD y permitieron diferenciar nueve grupos. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos a partir del análisis de los patrones de bandas hallados. Los oligonucleótidos OPA 05 y OPA 08 fueron los que diferenciaron mayor número de grupos. En la figura 1 se observa el dendrograma realizado con los patrones de bandas obtenidos con los oligonucleótidos que detectaron mayor variabilidad (cinco a nueve grupos). La cepa de colección, CK6711, y los aislamientos regionales C1, C8 y C9 se observan conformando, cada uno, un grupo aparte del resto. La mayoría de los oligonucleótidos ensayados pusieron en evidencia distintos polimorfismos entre ellos y con el resto de los aislamientos, tal como se observa en la figura 2, para OPA 20.

Si se considera el origen de los aislamientos (Tabla 1), la técnica RAPD permitió detectar variabilidad entre los provenientes de una misma localidad: en efecto

C0 y C0c de San Jerónimo no se agruparon con el resto de los aislamientos de esta localidad. Lo mismo ocurrió con C8 y C9 de Recreo (Figura 1).

Once de los aislamientos regionales y la cepa de colección produjeron cercosporina. Los no productores fueron C1 y C8. En la figura 3 se muestra el espectro de absorción de la cercosporina extraída a partir de la cepa patrón CK6711, del aislamiento CH y el del metabolito obtenido de C1. En la tabla 3 se presentan las cepas agrupadas de acuerdo con la cantidad de cercosporina producida.

No pudo comprobarse la existencia de relación entre el perfil obtenido por RAPD y la producción de cercosporina puesto que aislamientos que produjeron mucha cercosporina (grupos I y II) se agruparon con productores pobres (grupo IV). En cuanto a los hongos del grupo V, no productores, la técnica RAPD los diferenció del resto de los aislamientos y no los agrupó entre sí (Tabla 3 y Figura 1).

Finalmente, de la observación de las tablas 1 y 3, se puede advertir que los aislamientos provenientes de un mismo origen también presentaron diversidad en la cantidad de toxina producida.

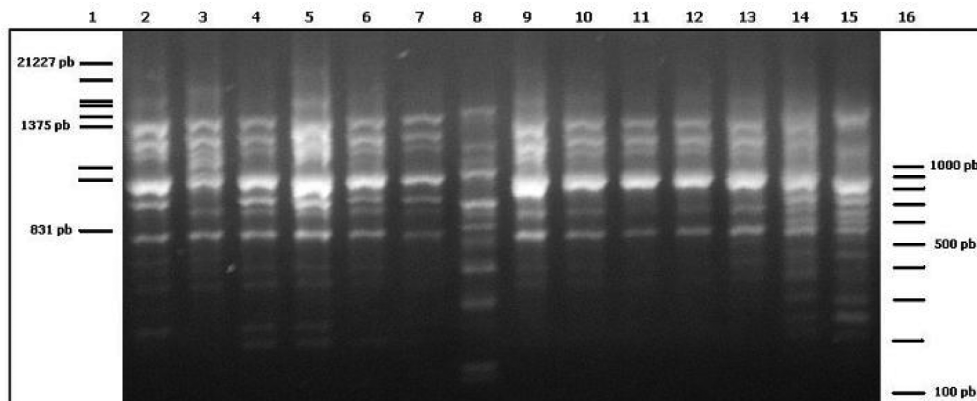


Figura 2. Perfil RAPD con el oligonucleótido OPA 20. Calle 1: marcador λ EcoR I/Hind III (Promega); 2: *C. kikuchii* NBRC 6711; Calles 3-15: Aislamientos regionales de *C. kikuchii*: Co, CoA, CoB, CoC, CH, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8 y C9; Calle 16: marcador 100-bp DNA Ladder (Promega).

Discusión

La técnica RAPD ha sido utilizada satisfactoriamente en el estudio de la variabilidad genética de especies de *Cercospora* [9,13]. Estudios realizados utilizando esta técnica, con aislamientos de *C. kikuchii* obtenidos de soja cultivada en un campo cercano a la ciudad de Santa Fe, pero pertenecientes a una cosecha anterior, permitieron detectar polimorfismo en su genoma [13].

El hallazgo en este estudio de valores altos de similitud entre los hongos señaló la estrecha relación existente entre ellos. No obstante, OPA 05 y OPA 08 resultaron muy útiles al poner en evidencia la variabilidad genética existente entre los hongos analizados (nueve grupos). Cai caracterizó en su estudio aislamientos de *C. kikuchii* provenientes de Estados Unidos utilizando estos oligonucleótidos, los que seleccionó entre un total de 24 ensayados, debido a que ellos revelaron abundantes variaciones entre los aislamientos analizados [3].

Algunos cebadores como OPA 01, si bien permitieron obtener el número máximo de fragmentos, determinaron la formación de pocos grupos. Ello se debe a que el número de grupos obtenidos con cada "primer" depende del número de polimorfismos hallados con respecto al total de fragmentos y también del modo en que ellos están distribuidos entre los aislamientos. Esto explica también que aunque OPA 05 y OPA 18 produjeron igual cantidad de fragmentos y de polimorfismos, con el segundo se obtuvieron menos grupos.

En cuanto a los 6 oligonucleótidos que no produjeron fragmentos, ello podría justificarse si se tiene en cuenta que las regiones de ADN que se amplifican eficientemente deben estar comprendidas entre dos sitios complementarios a los "primers" y separadas por una distancia de pocas kilobases [20]; para estos "primers" esos sitios pudieron ser menos frecuentes en los hongos en estudio lo que hizo imposible técnicamente la amplificación de fragmentos.

Respecto a la fuente de la variabilidad genética encontrada, ésta podría deberse tal como lo proponen Almeida y cols. [1], a mutaciones, deleciones y pérdida de cromosomas, ya que a *C. kikuchii* no se le conoce reproducción sexual. De acuerdo con Kempken y cols. [11], los transposones también pueden incrementar la heterogeneidad en los hongos. El hecho de que la cepa CK6711 (colección japonesa) no se agrupara con ninguno de los demás aislamientos evaluados podría atribuirse a que no está epidemiológicamente relacionada con el resto.

La producción de cercosporina ha sido usada como un criterio para la predicción de patogenicidad [10]. La

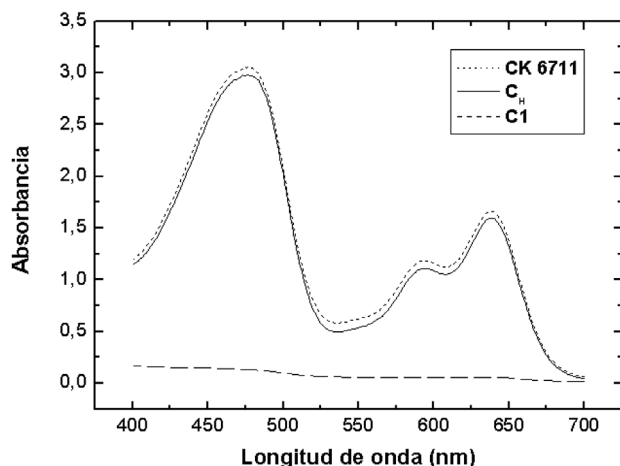


Figura 3. Espectro de absorción de los metabolitos obtenidos, en medio alcalino, a partir de dos aislamientos regionales y de una cepa de colección: C_H, C₁ y *C. kikuchii*.NBRC 6711.

Tabla 3. Agrupación de los aislamientos en base a la producción de cercosporina (promedio) in vitro

Grupo	Aislamiento	Producción de cercosporina (nmol/cil)
I	C ₀₈	503,51
	CK6711	327,12
II	C ₅	233,30
	C _H	230,21
III	C ₂	191,33
	C ₄	160,35
	C ₀₂	160,08
	C ₃	131,96
IV	C _{0A}	91,85
	C ₀	73,59
	C ₆	56,66
	C ₉	31,04
V	C ₁	NP
	C ₈	NP

nmol/cil: nanomol/cilindro; NP: No produjo; CK6711: *C. kikuchii* NBRC 6711

Grupo I: conformado por hongos que produjeron cercosporina en concentraciones >300 nmol/cil. Grupo II: conformado por hongos que produjeron cercosporina en concentraciones de 200 a 299 nmol/cil. Grupo III: conformado por hongos que produjeron cercosporina en concentraciones de 100 a 199 nmol/cil. Grupo IV: conformado por hongos que produjeron cercosporina en concentraciones < 100 nmol/cil de cercosporina.

capacidad de un aislamiento de producir cercosporina in vitro depende de factores nutricionales y ambientales, principalmente de la temperatura y de la luz, aunque también del aislamiento evaluado [7]. En este trabajo, las condiciones brindadas en el laboratorio, para la producción de la toxina, fueron efectivas en la mayoría de los aislamientos regionales, pero pudieron no serlo para los otros que no produjeron. El análisis de la producción de cercosporina bajo un único conjunto de condiciones (pH, temperatura, iluminación, sustrato) no asegura la detección de todos los productores; además, la falta de la producción in vitro no puede ser tomada como evidencia definitiva de que un aislamiento no sea capaz de sintetizarla [5]. En este caso las cepas que no produjeron la toxina fueron aisladas a partir de tejido con síntomas de enfermedad por *C. kikuchii* por lo que estos aislamientos probablemente tuvieron que haberla producido en la planta, dado que se ha demostrado el rol de la cercosporina en las enfermedades producidas por *Cercospora* [5]. Por otra parte, la diversidad en la cantidad de toxina producida por los aislamientos provenientes de un mismo origen (Tablas 1 y 3) reafirma los resultados de variabilidad genética encontrada entre estos hongos.

Coincidentemente con lo reportado por Almeida y cols. [1], en este trabajo no se encontró correlación entre el perfil de RAPD y la producción de cercosporina in vitro, lo que podría explicarse por el hecho de que RAPD es un marcador molecular, que no permite analizar todo el genoma. De este modo, mientras esta técnica agrupó algunos aislamientos, la determinación cuantitativa de cercosporina los diferenció.

En conclusión, la población de *C. kikuchii* aislada a partir de soja, resultó variable genéticamente y en su capacidad de producir la toxina in vitro, aún entre los aislamientos de un mismo origen geográfico.

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto PICTO 08-13208, financiado por ANPCYT-UNL, y el Proyecto CAID 2006, financiado por Universidad Nacional del Litoral, Argentina. Un agradecimiento especial a los Ing. Agrónomos Eugenio Astegiano, Lello Herzog y Roxana Maumary e integrantes del equipo RiA por las muestras remitidas y los valiosos consejos.

Bibliografía

- Almeida AMR, Pinga FF, Marín SRR, Binneck E, Sartori F, Costamilan LM, Teixeira MRO, Lopes M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatol Bras* 2005; 39: 594-602.
- Assante G, Locci R, Camarda L, Merlini L, Nasini G. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry* 1977; 16: 243-247.
- Cai G. *Cercospora* Leaf blight of soybean: pathogen vegetative compatibility groups, population structure, and host resistance. Louisiana University. Tesis Doctoral. 2003. URL: <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-12112003-143624/>
- Chung KR. Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1187-1196.
- Daub ME, Ehrenshaft M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Ann Rev Phytopathol* 2000; 38: 461-490.
- Di Conza JA, Nepote AF, González AM, Lurá MC. (GTG)_n microsatellite regions in citrinin-producing *Penicillium*. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 34-37.
- Dunkle LD, Levy M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zeae-maydis*. *Phytopathology* 2000; 90: 486-490.
- Fajola AO. Cultural studies in *Cercospora* taxonomy: I. Interrelationships between some species from Nigeria. *Nova Hedwigia* 1978; 29: 912-921.
- Inglis PW, Teixeira EA, Ribeiro DM, Valadares-Inglis MC, Tigano MS, Mello SCM. Molecular markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. *Curr Microbiol* 2001; 42: 194-198.
- Jenns AE, Daub ME, Upchurch RG. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 1989; 79: 213-219.
- Kempken F, Kuck U. Transposons in filamentous fungi: facts and perspectives. *BioEssays* 1998; 20: 652-659.
- Kuyama S, Tamura T. Cercosporin. A pigment of *Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 5725-5726.
- Lurá MC, Di Conza JA, González AM, Latorre Rapela MG, Turino L, Ibáñez MM, Iacona V. Detección de variabilidad genética en aislamientos de *Cercospora kikuchii* contaminantes de un mismo sembradío de soja. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39: 11-14.
- Orth CE, Schuh W. Resistance of 17 soybean cultivars to foliar, latent, and seed infection by *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis* 1994; 78: 661-664.
- Pautasso JM, Formento N. Control químico de las enfermedades en soja. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA Paraná. 2006. URL: http://www.inta.gov.ar/PARANÁ/info/documentos/produccion_vegetal/soja/enfermedades/20320_060915_contr.htm
- Salvador D, Garrido M. Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo. *Fitopatol Venez* 1990; 3: 11-15.
- Sambrook J, Fritsche F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring, Harbor Laboratory Press, 1989.
- Upchurch RG, Walker DC, Rollins JA, Ehrenshaft M, Daub ME. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2940-2945.
- Vallone S, Gadban L, Masiero B, Pochettino A. Diagnóstico y manejo de enfermedades de fin de ciclo en soja en lotes de productores de Marcos Juárez y su zona de influencia. INTA Marco Juárez. 2003. URL:<http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/soja/enffic03res.htm>.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.