

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Nothopassalora personata* AGENTE CAUSAL DE LA VIRUELA TARDÍA DEL MANÍ

Monguillot J.H¹⁻², Bernardi Lima N¹⁻²⁻³, Paredes J.A¹⁻², Giordano D.F⁴, Oddino C⁴, Rago A.M²⁻⁵, Carmona M⁶, Conforto C¹⁻².

1- Instituto de Patología Vegetal, Centro de Investigaciones Agropecuarias, INTA

2- Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, UFRYMa-CONICET 3- Facultad de Ciencias Agrarias, UNCA, Catamarca, Argentina 4- Facultad de Agronomía y Veterinaria, IMICO, UNCR, Córdoba, Argentina 5- Centro de Investigaciones Agropecuarias- INTA- Córdoba, Argentina

6- Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Cátedra de Fitopatología, Buenos Aires, Argentina
monguillot.joaquin@inta.gov.ar

Introducción

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) es afectado por dos enfermedades foliares importantes, la viruela temprana (*Cercospora arachidicola*) y la viruela tardía (*Nothopassalora personata* Syn. *Cercosporidium personatum*). En Argentina la viruela tardía, por su distribución y presencia en todos los ciclos agrícolas de las últimas décadas, es la enfermedad foliar con mayor potencial de daño para el cultivo. Actualmente la herramienta de control más eficiente es el uso de fungicidas, principalmente sitios específicos, que, por su uso sistemático, conlleva a un alto riesgo de desarrollar resistencia en las poblaciones del patógeno. Entre las características de *N. personata* se incluyen una baja capacidad de producir conidios en condiciones *in vitro* y un lento crecimiento micelial en medios de laboratorio estándar, lo que limita los estudios de etiología y epidemiología, así como una mejor comprensión de su biología (Monguillot et al., 2023). Dado el número limitado de estudios y la importancia de este patógeno en el cultivo de maní, el objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos de *N. personata* obtenidos de distintas áreas de producción de Córdoba, Argentina, y evaluar su patogenicidad.

Materiales y Métodos

Aislamiento: *N. personata* fue aislado de hojas sintomáticas colectadas en la campaña 2019-20 de seis lotes localizados en Río Cuarto, Las Perdices, General Deheza, Vicuña Mackenna, Pampayasta Sur y General Cabrera, mediante el método de aislamiento directo. Previo al aislamiento las hojas fueron desinfectadas y mantenidas en cámara húmeda por 72 h. Tejido estromático junto a conidióforos y conidios fueron transferidos a placas de Petri conteniendo agar agua (AA) con el objetivo de obtener conidios individuales que posteriormente fueron transferidos a placas con medio POA (extracto de hoja de maní+ avena + agar) + D (Dextrosa). Las placas fueron incubadas por diez días a 24 °C con 12 h-fotoperiodo. Los cultivos puros obtenidos fueron preservados por el método Castellani.

Caracterización morfológica: las colonias fueron estudiadas en medio de cultivo Spezieller Nährstoff-farmer agar (SNA), luego de un período de incubación de 20 días a 24 °C en condiciones de luz/oscuridad de 12/12 h. La caracterización de los conidios se llevó a cabo en medio de cultivo POA y en planta, midiendo largo y ancho utilizando el software ImageJ.

Caracterización molecular: El ADN genómico se extrajo a partir de micelio obtenido en medio líquido (papa dextrosa + extracto de hojas (30 g/L), en agitación continua (130 rpm, 24 °C con un fotoperiodo de 12 h) usando el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones (Conforto et al., 2019). Para la identificación molecular, se realizó la amplificación por la técnica de PCR y posterior secuenciación de los genes LSU, ITS, RPB2 (Videira et al., 2017). Las secuencias consenso de cada aislado se compararon con la secuencia de la especie tipo de *N. personata*. El análisis filogenético se realizó mediante inferencia Bayesiana.

Crecimiento micelial: fue evaluada en cuatro medios de cultivo: POA, papa dextrosa agar (PDA), extracto de hoja de maní agar (PLA) y extracto de grano de maní agar (PGA). El ensayo se realizó con seis aislados, y con cuatro repeticiones por aislado. Un disco de micelio de 3 mm de diámetro obtenido del margen de las colonias, en activo crecimiento en medio PDA fue transferido a las placas conteniendo los diferentes medios de cultivo. Las placas de Petri se incubaron a 24 °C en 12/12 h luz/oscuridad durante tres semanas. El diámetro de las colonias fue medido en dos direcciones perpendiculares, utilizando un calibre digital. Los datos fueron comparados utilizando ANOVA y las comparaciones de medias se realizaron utilizando Statistix 9.0.

Pruebas de patogenicidad: el inóculo de cada uno de los aislados se cultivó individualmente en Erlenmeyers conteniendo 25 ml de medio de cultivo líquido PD + extracto de hojas, partiendo de un disco de micelio (3 mm). La incubación se realizó en un agitador orbital a 130 rpm, 24 °C con un fotoperiodo de 12 h. Después de diez días de incubación, el micelio fue macerado y posteriormente sembrado en placas de Petri conteniendo medio AA. Las placas se incubaron a 24 °C con un fotoperiodo de 12 h. Diez días después, 10 ml de agua destilada estéril + Tween 20% (0,01%) se agregó a cada placa y se retiraron los conidios utilizando una espátula Drigalsky. La suspensión de conidios se recolectó en un tubo eppendorf y la concentración se ajustó a 1×10^4 conidios por ml. Las hojas de maní (cv. Granoleico) previa desinfección, se colocaron en placas de Petri y las condiciones de humedad se mantuvieron colocando en el extremo de cada pecíolo un algodón humedecido con 5 ml de agua destilada estéril. Las hojas fueron inoculadas con una gota de 10 µl de la suspensión de conidios. Las placas de

Petri se colocaron en una cámara de incubación a 24 °C con un fotoperiodo de 12 h. Las pruebas se realizaron con tres repeticiones por aislado y el experimento fue repetido dos veces.

Resultados

Se caracterizaron seis aislados, uno por cada localidad. Los aislados presentaron crecimiento lento (0,45 mm/día), con colonias inicialmente de color blanco, compactas, de borde irregular, con micelio aéreo compuesto de hifas septadas, color pardo-oliváceo. Conidióforos tabicados agregados, surgiendo del tejido estromático, de color marrón pálido a marrón, rectos a curvos o geniculados-sinuosos (en planta e in vitro). Los conidios son solitarios, septados, rectos o ligeramente curvos, de color marrón pálido a marrón, con las siguientes dimensiones: en planta: (22,7) 34,4 (50,4) x (6,4) 7,9 (9) μm , y 1 a 6 septos, in vitro: (28) 44,9 (58,9) x (5,1) 7 (8,4) μm , de 3 a 5 septos.

A partir del análisis Bayesiano de inferencia filogenética los seis aislados se agruparon en un clado fuertemente soportado con la especie tipo de *N. personata* (PP:1.0). (Fig. 1)

De la comparación entre los cuatro medios de cultivo después 21 días, se observó el mayor crecimiento en medio PGA (12,89 mm), seguido de PDA (12,02 mm), PLA (11,88 mm) y POA (10,3 mm). Si bien, no existieron diferencias significativas (LSD $p < 0,05$) entre los medios PGA y PDA, PGA si difirió significativamente de los medios PLA y POA. (Fig. 2)

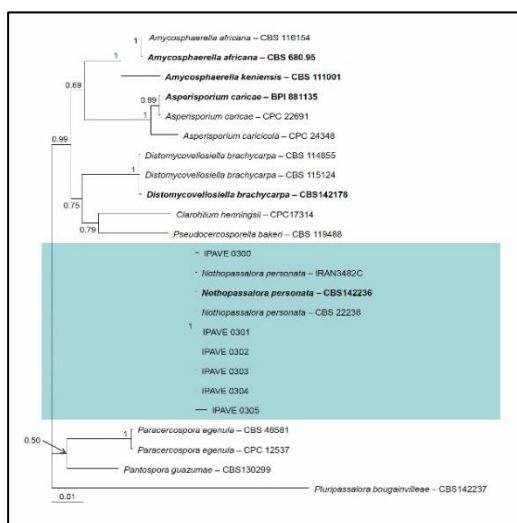


Fig 2. Árbol filogenético resultante del análisis Bayesiano basado en la combinación de tres genes: LSU; ITS y RPB2.

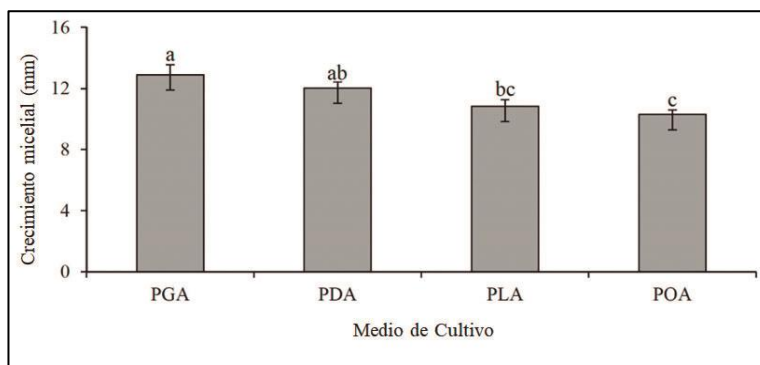


Fig 2. Crecimiento micelial de *N.personata* en diferentes medios de cultivo.

En la prueba de patogenicidad, todos los folíolos presentaron síntomas típicos de la viruela del maní. En la superficie adaxial, en el punto de inoculación, los síntomas comenzaron como pequeñas manchas circulares oscuras, en algunos casos se pudo observar la presencia de un halo clorótico. No se observaron síntomas en el control negativo. El patógeno fue re-aislado de las hojas inoculadas, para cumplir con los postulados de Koch.

Conclusiones

Este es el primer estudio que se realiza en Argentina focalizado en aspectos morfológicos moleculares y de patogenicidad de *N. personata* agente causal de la viruela tardía del maní.

La información generada en este trabajo contribuye a futuros estudios epidemiológicos y de manejo de esta enfermedad.

Bibliografía

Conforto C, et al 2019. Euro J Plant Pathol 155:1179-1194. Monguillot JH, et al. J Plant Pathol 105:557-565. Videira SIR, et al 2017. Stud Mycol 87:257-421.
Financiamiento: PICT 2018-4057, INTA