

## Caracterización morfológica, cultural y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* de España y Argentina

J. Viejobueno<sup>1</sup>, J.J. Medina<sup>2</sup>, A. Aguado<sup>3</sup>, M. Camacho<sup>3</sup>, M. Camacho-Sánchez<sup>4</sup>, S.M. Salazar<sup>1,5</sup> y B. de los Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental Agropecuaria Famaillá, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), T4132, Famaillá, Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup> Centro IFAPA Huelva (CAGPDS-JA) c/ Julio Caro Baroja s/n. Huelva

<sup>3</sup> Centro IFAPA Las Torres-Tomejil (CAGPDS-JA). Apartado de Correos Oficial. 41200-Alcalá del Río, Sevilla

<sup>4</sup> Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), 4485-661, Vairão, Portugal.

<sup>5</sup> Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT, T4000, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

**Palabras clave:** *fresa, arándano, podredumbre carbonosa, clorato, temperatura, pH*

### RESUMEN

*Macrophomina phaseolina* es un hongo de suelo necrotrófico, agente causal de la podredumbre carbonosa de raíz y corona que afecta a más de 500 especies de plantas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica, cultural y molecularmente 32 aislados de *M. phaseolina* procedentes de España y Argentina, obtenidos de diferentes hospedantes: fresa, girasol, soja, judía, arándano y cáñamo. La caracterización se realizó a partir de los cultivos puros y se determinó la resistencia a clorato y el crecimiento a distintas temperaturas y pH. Para la caracterización molecular se extrajo ADN, se amplificaron 4 regiones del mismo y se realizó un árbol filogenético. En la caracterización según resistencia a clorato, no se vio un patrón de asociación con respecto al país o cultivo de procedencia de los aislados. Los 3 aislados más sensibles al mismo provenían de fresa, arándano y girasol. La temperatura media óptima de crecimiento estuvo entre 30 y 35°C. El único aislado que presentó una temperatura óptima de crecimiento menor fue el procedente de judía. El rango de pH medio óptimo de crecimiento de los aislados estuvo entre 5 y 6. Hubo 3 aislados que presentaron pH óptimo de 4 y uno de 8. En cuanto a la caracterización molecular, se encontró muy poca variabilidad genética entre los aislados, sin observarse agrupación por país o cultivo de procedencia en el árbol filogenético. Todos fueron identificados como *Macrophomina phaseolina* salvo el aislado de judía, que se agrupó junto con los aislados de *Macropomina pseudophaseolina*. La gran variabilidad obtenida en los parámetros analizados dificulta la clasificación de este hongo en subespecies.

### INTRODUCCIÓN

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae*, filo *Ascomycota* (Crous et al., 2006). Es un hongo de suelo necrótrofo con una alta variación en su patogenicidad y diversidad genética, confirmando su capacidad para sobrevivir y adaptarse a distintos parámetros ambientales (Vandemark et al., 2000; Mayek-Pérez et al., 2001). A pesar de esa observada variabilidad, no se han podido definir subespecies o razas fisiológicas basadas en caracterizaciones morfológicas (Dhingra y Sinclair, 1978), bases de datos de secuencias (Crous et al., 2006) o virulencia de los aislados en diferentes hospedantes, salvo por la nueva especie *M. pseudophaseolina* reportada por Sarr et al.

(2014) mediante la caracterización molecular de 189 aislados de *Macrophomina* de Senegal. *M. phaseolina* es el causante de la podredumbre carbonosa en más de 500 especies de plantas, siendo una de las enfermedades más destructivas, cuyos síntomas se manifiestan inicialmente como marchitamiento de las plantas y más tarde, el colapso y muerte de las mismas. La enfermedad es más grave si la planta infectada está sujeta a estrés abiótico como temperaturas altas, carencia de agua, malas condiciones de suelo o alta producción de fruta (Mertely et al., 2005; Avilés et al., 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó como objetivo del presente trabajo caracterizar morfológica, cultural y molecularmente 32 aislados de *M. phaseolina* procedentes de España y Argentina, obtenidos de diferentes hospedantes: fresa, girasol, soja, judía, arándano y cáñamo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron treinta y dos aislados de *Macrophomina*, veintiuno procedentes de Argentina y once españoles, obtenidos de diferentes hospedantes: fresa, girasol, soja, judía, arándano, maíz y cáñamo (Tabla 1). La caracterización se realizó a partir de cultivos puros. Para determinar la resistencia a clorato, discos de micelio de 5mm de diámetro se transfirieron a placas Petri conteniendo medio LBA con clorato (KClO<sub>3</sub>, LBA+) modificado del referido por Puhalla y Spieth (1985). Los controles se dispusieron en el mismo medio sin clorato (LBA), incubándose a 30°C en oscuridad. En el caso de la respuesta a temperatura, se sembraron los aislados en placas con patata dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40°C. Para evaluar el crecimiento de los aislados a diferentes pH, discos de micelio se sembraron en placas con PDA cuyo pH se ajustó a 3, 4, 5, 6, 7 y 8, agregando ácido o base (HCl o KOH 1N), según fuera necesario, incubándose a 30°C en oscuridad. En los 3 ensayos se sembraron 3 réplicas/aislado y se realizaron mediciones del radio mayor (R) y el menor (r) a los 2, 3 y 6 días. El área final cubierta por las colonias ( $A = \pi * R * r$ ) se analizó mediante análisis de varianza y la separación de medias mediante test MDS ( $P < 0,05$ ) (Pearson et al., 1986). Para la caracterización molecular, se procedió a la extracción de ADN de los aislados por el método del fenol-cloroformo-isoamílico y a la amplificaron mediante PCR de 4 regiones de ADN: ITS, Tubulina, Calmodulina y Factor de elongación. Los productos de la amplificación se secuenciaron y alinearon para cada región con MAFFT v7.244 (10.1093/molbev/mst010). Luego se concatenaron con AMAS (10.7717/peerj.1660) donde se incluyeron como ingroups secuencias descargadas de GenBank de 3 aislados de *M. phaseolina* y 2 de *M. pseudophaseolina*, y como outgroup la del hongo *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. El árbol filogenético se construyó con el programa RAxML 7.2.8 (10.1093/bioinformatics/btu033) con un marco de Máxima Verosimilitud, usando el modelo de evolución GTR+G.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Resistencia a clorato.** El aislado TOR-888 (cáñamo, España) presenta un crecimiento significativamente inferior al resto en medio LBA. Aproximadamente la mitad de los aislados fueron sensibles a clorato, con un crecimiento en medio LBA+ significativamente menor al del medio LBA (Fig. 1). Manici et. al. (1995) reportaron que el 95% de los aislados de girasol analizados fueron tolerantes al clorato, coincidiendo con los resultados obtenidos en este caso con aislados procedentes de este cultivo. La sensibilidad a clorato no se vio asociada al país o cultivo de procedencia de los aislados. Así, los aislados provenientes de fresa presentaron comportamientos muy diferentes entre sí, al igual que los aislados de Argentina o España (Fig. 1). Esto concuerda con lo reportado por Zazzerni y

Tosi (1989), donde aislados de *M. phaseolina* provenientes de cuatro especies hospedadoras diferentes variaron ampliamente en la sensibilidad al clorato, independientemente de su especie de origen, concluyendo que no hay una evidencia real acerca de la especialización por un hospedero. Resultados similares obtuvieron Kaur et al. (2012), quienes señalaron que la caracterización de los aislados en base a su sensibilidad a clorato podría no ser útil para el estudio de la especificidad de *M. phaseolina*.

**Crecimiento a diferentes temperaturas.** El crecimiento de los aislados a distintas temperaturas se ajusta a una curva normal, encontrándose la temperatura media óptima de crecimiento en 30°C (Fig. 2A). La mayoría presenta una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 35°C, excepto el aislado Por-Lea (judía, Argentina), con temperatura óptima de 25°C. No se observó crecimiento a 5°C, y sólo un 30% de los aislados crecieron a 10°C, no siendo letal la temperatura de 40°C para ninguno de ellos. Con respecto a la velocidad de crecimiento, el aislado que más creció en su temperatura óptima fue Soj-Bal alcanzando un área de 56,27 cm<sup>2</sup> y el que menos, TOR-888 con 23,47 cm<sup>2</sup>. No pudo observarse ninguna asociación clara entre los aislados, ya sea por país o por cultivo de procedencia. Sánchez et al. (2017), determinaron que la temperatura óptima de crecimiento de aislados procedentes de fresa estaba entre 30 y 35°C. Csöndes et al. (2012), reportaron que el intervalo de temperatura más favorable para el desarrollo de algunos aislados de girasol de Hungría estaba entre 25 y 35°C, aunque a 20°C también se observaba un buen crecimiento. En cuanto a la amplitud de temperaturas a la cual puede crecer *M. phaseolina*, los datos de Csöndes et al. (2007; 2012) corroboran un buen crecimiento de las colonias a 20°C, varias veces mayor al alcanzado a 15°C y algo de crecimiento a 10 y 40°C. Resultados similares se obtuvieron en este estudio, aunque en nuestro caso más de la mitad de los aislados no crecen adecuadamente a 10°C, pero sí a 40°C.

**Crecimiento a diferentes pH.** Al segundo día de incubación, el rango de pH medio óptimo de crecimiento estuvo entre 5 y 6 y se ajustó a una curva normal (Fig. 2B). Solo 3 aislados presentaron un pH óptimo de 4 (Fru-Alb, Ar-SB y TOR-860) y uno de 8 (Gi-ACA 885) (resultados no mostrados). Los pH 3 y 8 no fueron letales para los aislados, aunque el crecimiento a pH 8 fue aproximadamente el doble que a pH 3. El aislado que más creció en su pH óptimo fue Ar-SB (arándano, Argentina), y el que menos, el aislado de cáñamo TOR-888. Otros estudios muestran que el rango de pH óptimo se encuentra entre 4 y 6 (Nischwitz et al., 2004; Csöndes et al., 2012). A pesar de esto, se pudo observar un crecimiento considerable a pHs 3, 7 y 8, lo cual concuerda con Dhingra y Sinclair (1978), que reportaron buenos crecimientos entre pH 5 y 8. Csöndes et al. (2012), concluyeron que la tasa de crecimiento de *M. phaseolina* a diferentes pH depende en gran medida del aislado y sus condiciones de origen.

**Caracterización molecular.** En la Fig. 3 se observa el árbol filogenético obtenido con las 4 regiones de ADN concatenadas. Se distinguen 2 grandes clados, uno formado por todos los aislados de *M. phaseolina* y otro por los de *M. pseudophaseolina*. Dentro de este último se encuentran las dos secuencias de *M. pseudophaseolina* tomadas como ingroups y el aislado de judía Por-Lea. En el otro clado se encuentran el resto de los aislados observándose una variabilidad genética muy pequeña entre ellos, sin agruparse por país ni por cultivo de procedencia. Por ejemplo, observamos secuencias idénticas en aislados como TOR-840 y Fru-SWA, pero que no tienen la misma procedencia de cultivo ni zona geográfica (cáñamo, España y fresa, Argentina, respectivamente). Estos resultados coinciden con los de otros autores que tampoco pudieron encontrar una correlación entre el genotipo y

el origen geográfico u hospedador (Vandermark et. al., 2000; Reyes-Franco et. al., 2006).

Se podría concluir que la gran variabilidad genética, morfológica y cultural que presentan los aislados de *M. phaseolina* no permite clasificar a este hongo más allá de poblaciones y que éstas no suelen estar asociadas a cultivos o zona geográfica de procedencia.

### AGRADECIMIENTOS

Proyecto PP.AVA.AVA201601.10 con 80% financiación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional, “Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014-2020”.

### REFERENCIAS

- Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M. and Pérez-Jiménez, R.M. 2007. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. *The British Society for Plant Pathology* 57:382.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. and Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235–253.
- Csöndes, I., Kadlicsk, S., Gaborjanyi, R., Sandor, K. and Richard, G. 2007. Growth of *Macrophomina phaseolina* isolates depend on different temperature. *Analele Universitații din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*.12:31-34.
- Csöndes, I., Cseh, A., Taller, J. and Poczai, P. 2012. Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 3259-3269.
- Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B. 1978. *Biology and pathology of Macrophomina phaseolina*. Imprensa Universitaria. Universidad Federal de Vicosa, Vicosa, Brasil. 166p.
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Vallad, G.E., Chand, R. and Chauhan, V.B. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2), 136-151.
- Manici, L.M., Caputo, F. and Cerato, C. 1995. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climate regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease* 79:834-838.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., González-Chavira, M., García-Espinosa, R., Acosta-Gallegos, J., Martínez de la Vega, O. and Simpson, J. 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:257-264.
- Mertely, J., Seijo, T. and Peres, N. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Disease* 89:434.
- Nischwitz, C., Olsen, M. and Rasmussen, S. 2004. Effect of irrigation type on inoculum density of *Macrophomina phaseolina* in melon fields in Arizona. *J. Phytopathol.* 152:133–137.
- Pearson, C.S.A., Leslie, J.F., and Schwank, F.W. 1986. Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean and soil. *Phytopathology* 76: 646-649.
- Puhalla, J.E. and Spieth, P.T. 1985. A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Exp. Mycol.* 9: 39-47.
- Reyes-Franco, M.C., Hernández-Delgado, S., Beas-Fernández, R., Medina-Fernández, M., Simpson, J. and Mayek-Pérez, N. 2006. Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. *Journal of Phytopathology*,

154(7-8), 447-453.

Sánchez, S., Chamorro, M., Henríquez, J.L., Grez, J., Díaz, I., De los Santos, B., and Gambardella, M. 2017. Genetic and biological characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing crown and root rot of strawberry. Chilean journal of agricultural research, 77(4), 325-331.

Sarr, M.P., Ndiaye, M., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. 2014. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. Phytopathol. Mediterr. 53:163-173.

Vandemark, G., Martínez, O., Pecina, V. and Alvarado M.J. 2000. Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomina phaseolina* using a simplified AFLP technique and two different methods of analysis. Mycologia 92:656-664.

Zazzerni, A. and Tosi, L. 1989 Chlorate sensitivity of *Sclerotium bataticola* isolates from different hosts. Phytopathol Z 126:219-224.

Tabla 1. Procedencia de los aislados.

<b>Aislado</b>	<b>País de origen</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Aislado</b>	<b>País de origen</b>	<b>Cultivo</b>
<b>Fru-SWA</b>	Argentina	Fresa	<b>Gi-AG4</b>	Argentina	Girasol
<b>Fru-Ely</b>	Argentina	Fresa	<b>Gi-PAN 1031</b>	Argentina	Girasol
<b>Fru-Paj</b>	Argentina	Fresa	<b>Por-Lea</b>	Argentina	Judía
<b>Fru-CR</b>	Argentina	Fresa	<b>Soj-Bal</b>	Argentina	Soja
<b>Fru-Car</b>	Argentina	Fresa	<b>Ar-SB</b>	Argentina	Arándano
<b>Fru-Sab</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-102</b>	España	Fresa
<b>Fru-Alb</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-840</b>	España	Cáñamo
<b>Fru-Cam</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-854</b>	España	Fresa
<b>Fru-Erli</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-855</b>	España	Fresa
<b>Fru-Trea</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-860</b>	España	Maíz
<b>Fru-For</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-861</b>	España	Arándano
<b>Fru-Mac</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-862</b>	España	Arándano
<b>Fru-Fes</b>	Argentina	Fresa	<b>TOR-872</b>	España	Arándano
<b>Gi-ACA 885</b>	Argentina	Girasol	<b>TOR-876</b>	España	Fresa
<b>Gi-P65A25</b>	Argentina	Girasol	<b>TOR-878</b>	España	Fresa
<b>Gi-A963</b>	Argentina	Girasol	<b>TOR-888</b>	España	Cáñamo

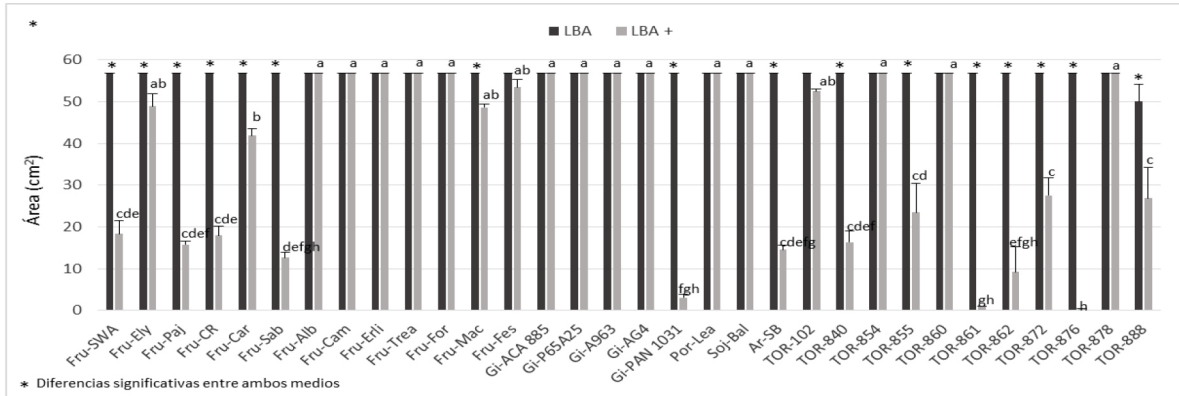


Figura 1. Crecimiento de aislados (área cm<sup>2</sup>) de *M. phaseolina* en medio LBA y medio LBA+, suplementado con clorato, tras seis días de incubación. Sobre una serie, distintas letras indican diferencias significativas según test MDS (P<0,05).

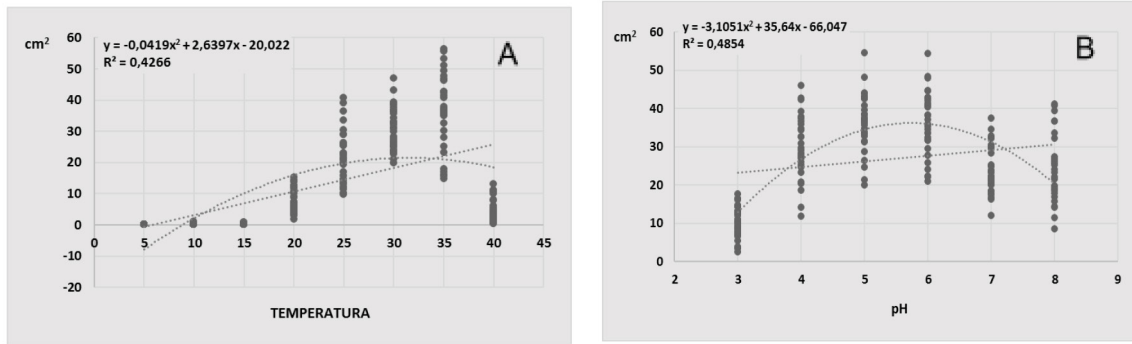


Figura 2. Área media de las colonias de 32 aislados de *M. phaseolina* tras 48h de incubación. A) dependiendo de temperatura, B) dependiendo de pH

Figura 3. Árbol filogenético de los aislados utilizando secuencias de 4 regiones de ADN concatenadas

