



EFFECTO DE *Nostoc muscorum* AG. EN LA GERMINACIÓN 'IN VITRO' DE ESPORANGIOS DE *Bremia lactucae* REGEL EN *Lactuca sativa* L.

Carlos A. Tassara^{1,2}; Ana M. Stella³; M. Clara Sokn³; Silvia E. López¹ y Cecilia C. Carmarán¹

¹PROPLAME-PRHIDEB-CONICET, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, PB II, 4to piso, (CP1428EHA) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ²Cátedra de Horticultura, Facultad de Agronomía, UBA, Av. San Martín 4453 - (C1417DSE) Buenos Aires y Cátedra de Prácticas Agrícolas, Universidad Nacional Antonio Jaureche, Av. San Martín 2002, Florencio Varela, provincia de Buenos Aires. ³Laboratorio de Ecoporfirinas. (www.ecoporfirinas.com.ar). Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. CONICET.

*Autor responsable: Ing. Agr. Carlos A. Tassara

Email: tassara@agro.uba.ar y anamariastella@ecoporfirinas.com.ar

Recibido: 10-02-12

Aceptado 06-07-12

RESUMEN

Se analizó el efecto de extractos etéreo, metanólico y acuoso de 5 cepas de *Nostoc muscorum* en la germinación 'in vitro' de esporangios de *Bremia lactucae* Regel durante una epifitía sobre *Lactuca sativa* var *capitata* cv *gallega*, en un predio hortícola intensivo de la localidad La Capilla-partido de Florencio Varela-provincia Buenos Aires -Argentina (34°50' Lat sur 58°06' Long oeste). La cepa 60a promovió la germinación de esporangios, mientras que la 40g la inhibió. El estudio aleatorio de 150 plantas del lote cultivado, mostró una incidencia de 100% y una severidad de 9,9 hojas/planta y 13,8 dm² de superficie foliar/planta, al cabo de 91 días.

Rationale: la lechuga (*Lactuca sativa*) es el primer cultivo hortícola intensivo en la provincia de Buenos Aires, con un área sembrada de 5134 ha aproximadamente. Una de las principales causas de pérdida de la producción es la enfermedad ocasionada por *Bremia lactucae*, un biótrofo obligado, perteneciente al grupo de los Oomycetes. Considerando los reportes previos de actividad biológica de metabolitos provenientes de cepas de *Nostoc muscorum*, se consideró de interés evaluar el comportamiento de este patógeno frente a diferentes extractos de esta cianobacteria.

Palabras clave. Cianobacterias - *Bremia lactucae* - *Lactuca sativa* L. - Pérdida de rendimiento - Jaulas - Hojas afectadas y Superficie foliar afectada.

EFFECT OF *Nostoc muscorum* AG. ON GERMINATION 'IN VITRO' OF *Bremia lactucae* SPORANGIA *Lactuca sativa* L. REGEL IN

SUMMARY

In this study it was analyzed the effect of etheric, methanolic and aqueous extracts of the five strains *Nostoc muscorum* in the germination of sporangia of *Bremia lactucae* Regel in vitro in an epiphyte of *Lactuca sativa* var *capitata* cv *galician* in an intensive horticultural area of Florencio Varela, La Capilla, Argentina (34°50' South Latitude 58°06' West Longitude). The 60a strain promoted the germination of sporangia whereas the 40g inhibited it.

Rationale: Lettuce (*Lactuca sativa*) represents one of most important crops from Buenos Aires province. The disease produced by *Bremia lactucae*, a biotrophic Oomycetes, on *L. sativa*, cause significant economic losses in the affected farms. Taking into account previous reports about biological activity of *Nostoc muscorum*, we decided to evaluate the response of *B. lactucae* to different extracts from *N. muscorum*.

A randomized plant pathology study of 150 plants of the cultivated plot showed an incidence of 100% and a severity of 9, 9 leaves/plant and 13, 8 dm² of leaf/plant surface area during the 91 days.

Key words. Cyanobacteria - *Bremia lactucae* - *Lactuca sativa* L. - Performance Loss-Cages- Affected leaves and affected leaf area.

Tassara, C.A.; Stella, A.M.; Sokn M.C.; López, S.E. y Carmarán C.C. 2012. Efecto de *Nostoc muscorum* AG. en la germinación 'in vitro' de esporangios de *Bremia lactucae* Regel en *Lactuca sativa* L. *Rev. Agronomía & Ambiente* 32(1-2): 1-8 . FA-UBA, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias o algas azul-verdosas son microorganismos procariotas fotosintéticos. Éstas proveen una biomasa continuamente renovable y/o metabolitos secundarios que son mineralizados por otros organismos. Son capaces de producir y ceder al ambiente durante su vida, y cuando la célula muere y se desintegra en compuestos orgánicos solubles, productos extracelulares o metabolitos secundarios (Rastogi, *et al.*, 2009; Natarajan, 2010). Entre estas sustancias se pueden citar: vitaminas, enzimas, carbohidratos, péptidos, aminoácidos y sustancias promotoras o inhibidoras del crecimiento.

La actividad biológica de cepas de cianobacterias ha sido reportada en varias oportunidades e incluyen miembros del género *Nostoc* mostrando una importante actividad antifúngica (Biondi *et al.*, 2004). *Nostoc muscorum* C. Agardh produce sustancias antifúngicas de naturaleza fenólica frente al patógeno humano *Candida albicans* (Cano *et al.*, 1990); inhibe *in vitro* el crecimiento vegetativo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Caire *et al.*, 1987) y de hongos productores de la mancha azul (Zulpa *et al.*, 2003). En este mismo sentido varios reportes señalan actividad antifúngica en diferentes extractos de *N. muscorum* sobre patosistemas, tales como *Cunninghamella blakesleana*- *Panicum milleaceum* - *Rhizoctonia solanii* y otros causantes de "damping off" (Caire *et al.*, 1976; Caire *et al.*, 1990; Mulé *et al.*, 1977; Zulpa *et al.*, 2003).

Por otro lado Tassara y colaboradores (2006) señalaron que metabolitos bioactivos de *N. muscorum* incrementaron en un 25% el rendimiento del cultivo de *Lactuca sativa* var. *capitata* cv. *gallega* en un lote infectado con *Sclerotinia sclerotiorum*.

Dado el perfil de actividad antifúngica de estos organismos se consideró de interés evaluar su acción en patógenos de interés comercial en cultivos intensivos hortícolas, con especial interés en *Lactuca sativa* var. *capitata* cv. *gallega*. Según el censo Hortiflorícola de la provincia de Buenos Aires la lechuga es el primer cultivo hortícola in-

tensivo en área sembrada (5134,6 ha) y en producción (66.400 t). Los tipos "criollas", a la cual pertenece el cultivar gallega, ocupan el primer lugar dentro de las lechugas cultivadas en la provincia de Buenos Aires con 1853,4 ha (Gobierno Prov. Buenos Aires, CHFBA 2005).

Bremia lactucae Regel (*Peronosporaceae* de Bary) es un biotrofo obligado con un extenso rango de hospedantes dentro de *Asteraceae* (Lebeda and Zinkernagel, 2003; Sharaf *et al.*, 2007; Lebeda *et al.*, 2008). Es un patógeno común en cultivos de lechuga (mildiu de la lechuga) en todo el mundo. Ataca especialmente las hojas exteriores desmejorando su calidad comercial y aumentando el riesgo de podredumbre durante su transporte y almacenamiento (Mitidieri, 1995). En la Argentina, Melegari y colaboradores (2010) señalan al "mildiu" como la enfermedad más prevalente de este cultivo.

El objetivo del trabajo fue estudiar el impacto del mildiu producido por *Bremia lactucae* en la productividad de plantas de *Lactuca sativa* var. *capitata* cv. *gallega* y evaluar la efectividad de cepas de *Nostoc muscorum* en el control de la germinación *in vitro*, de esporangios del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

Para la colecta de esporangios de *Bremia lactucae* fue seleccionado, un establecimiento hortícola de cultivo intensivo en el Cinturón Verde de Buenos Aires, con no menos de 30% de cultivos de *Asteráceas*, tanto en superficie como en tiempo (años), con ocurrencia de 5 o más años consecutivos de mildiú.

El lote estudiado fue plantado con *Lactuca sativa* var. *capitata* cv. *gallega*, en lomos de doble línea de plantas con semiforzado en el otoño (28/05/2010) y fue cosechado a final del invierno. Se encontraba ubicado a 34°50' Lat sur 58° 06' Long oeste (partido de Florencio Varela, localidad La Capilla, provincia de Buenos Aires, Argentina), una superficie de cultivo fue 2000 m² con una densidad de 8,8 plantas por m².

Evaluación de daños

La observación y muestreo del lote se realizó el 27/08/2010, fecha en la cual se tomaron 15 lomos al azar de 15m de largo. Se consideró como planta enferma por *Bremia lactucae* aquella que presentaba hojas con una o más manchas foliares del mildiú. Se estimó la incidencia como el porcentaje de plantas afectadas respecto del número total de plantas por hilera. Además se seleccionaron al azar 150 plantas con las que se estudió severidad, definida de dos formas: número de hojas afectadas con una o más manchas por planta y superficie afectada por mildiú por planta. La superficie foliar total con mildiú correspondió a la suma de las áreas de cada hoja que presentó al menos una mancha de la enfermedad. En el conteo y los cálculos de incidencia y severidad se descartaron las tres primeras hojas que son eliminadas por el productor en la cosecha.

Para el estudio de la superficie foliar afectada se utilizó la metodología de Bensink (1971) y el programa de "Computer Aided Desing" (CAD).

Estudios de productividad

La cosecha comenzó el 29/08/2010 y finalizó el 10/09/2010, período en el cual se calculó la productividad promedio por planta expresada en: 1) número de hojas totales y comercializadas (hojas no afectadas) y 2) la superficie foliar total y comercializada (superficie de hojas no afectadas) del lote.

Sobre datos de productividad de jaulas comercializadas proporcionados por el productor, se estimó la pérdida de rendimiento de jaulas no comercializadas. Para ello se calculó la: diferencia entre el rendimiento promedio zonal (jaulas potenciales) de cultivos libres de la enfermedad (desde el 2005 a la actualidad) y el número efectivo de jaulas comercializadas del lote estudiado.

Cepas de cianobacterias

Se emplearon cepas *Nostoc muscorum*, 86 a, 60 a, 40 g, 101 y 69 b, cedidas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biología de Cianobacterias, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA. Fueron cultivadas en medio Watanabe (1959) modificado (Halperin *et al.*, 1979) a temperatura de laboratorio, en agitación y exposición a la luz de tubos fluorescentes de 45 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, con un fotoperíodo 12:12. Se procedió a la extracción a los 36 meses de cultivo, cuan-

do las cepas se encontraron en la fase estacionaria de crecimiento.

Obtención de los extractos

Se obtuvieron extractos de los cultivos cianobacterianos axénicos mediante la técnica citada por Halperin *et al.* (1973). La biomasa resultante de cada cepa se seccionó en pequeños cubos de 1 a 2 mm de lado que se colocaron sobre portaobjetos excavados estériles con medio de cultivo Watanabe (1959) modificado (Halperin *et al.*, 1979), dentro de cajas de Petri estériles y se expusieron a radiación ultravioleta durante 70 minutos (68 132 A lámpara germicida 253,7 nm, General Electric, Cleveland, Ohio 44112, USA). Luego de la irradiación, cada trozo (submuestra) fue transferido a un tubo de hemólisis que contenía 1 mL de medio de cultivo Watanabe (1959) modificado (Halperin *et al.*, 1979), los cuales fueron expuestos a luz de tubos fluorescentes en condiciones controladas de temperatura. Se prepararon 50 repeticiones para cada cepa.

Los tubos se centrifugaron (8000 x g - 25 min - 15 °C) para separar la biomasa del medio de cultivo y se pesaron las biomásas sedimentadas (peso fresco).

A partir de la biomasa axénica de cada cepa se extrajeron los metabolitos algales con diferentes solventes: éter, agua y metanol.

El extracto etéreo fue preparado con: 8 g de biomasa fresca disgregada en mortero con arena lavada y estéril adicionando pequeñas alícuotas de éter libre de peróxidos (Caire *et al.*, 1976), hasta alcanzar un volumen final de 80 mL. El extracto se transfirió a 80 mL de agua destilada estéril, evaporando previamente el éter, y se esterilizó mediante filtros de nitrocelulosa de 0,22 μm de diámetro de poro.

Los extractos acuosos y metanólico fueron obtenidos con el mismo procedimiento ya citado, utilizando agua destilada y metanol como solventes.

El volumen requerido de cada cepa para llevar a cabo los ensayos fue de 1mL.

Ensayos 'in-vitro'

Los esporangios de *Bremia lactucae* fueron obtenidos a partir de las hojas más internas de la planta (hojas N° 7 a la 10) infectadas, contando desde los verticilos externos a los internos, que exhibían los síntomas y el signo de la enfermedad. Se procedió al raspado de las

manchas existentes en la epidermis abaxial de las hojas.

Se colocaron 0,5 mL de agua destilada estéril en cajas de Petri estériles para realizar los tratamientos. Los ensayos se llevaron adelante con 5 repeticiones por cada extracto evaluado y un control por ensayo.

Se rasparon ligeramente hojas con signo de la enfermedad sobre las cajas de Petri previamente acondicionadas a fin de obtener esporangios. Según correspondiera se adicionó a cada caja los extractos acuosos, etéreo y metanólico de las distintas cepas cianobacterianas con dosis 1/10, v/v. Los ensayos se realizaron en cámara controlada para la germinación de esporangios bajo las siguientes condiciones: 24 hs de oscuridad y temperaturas entre 12 a 15 °C. El proceso se detuvo elevando la temperatura a 28 °C. Se consideró esporangios germinados cuando el largo del tubo de germinación fue igual o mayor a su diámetro, de acuerdo a Sargent y Payne (1974).

La evaluación de la germinación se realizó a las 24 hs de iniciado el ensayo por conteo bajo microscopio. Se estimó el porcentaje de germinación a partir del conteo de un total de 200 esporangios y la evaluación de tres alícuotas por caja.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio con las repeticiones correspondientes en cada caso (n=6). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y para detectar diferencias entre tratamientos y entre diferentes tiempos se usó la prueba de Tukey HDS ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Evaluación de daño

La evaluación realizada sobre 1296 plantas (7,4% del total del lote) indicó un 100% de incidencia de plantas afectadas en el campo estudiado, observaciones generales del lote corroboraron este alto nivel de incidencia.

La Figura 1 muestra la severidad expresada como frecuencia de hojas afectadas (1a) y superficie afectada (1b) por *Mildiú* por planta. En el 100% de las plantas muestreadas la afeción al-

canzó las hojas de mayor tamaño de la planta desde la 7 a la 14 (Fig. 1a y Fotografía 1). El 78,6% de las plantas fueron afectadas en el rango 12-15 dm² de superficie foliar (Fig. 1b).

Los análisis de superficie foliar señalan que el 23,1% de las hojas fueron afectadas lo que representa el 56,1% de la superficie foliar total por planta (Cuadro 2).

Sobre 2000 m² se comercializaron 225 jaulas sobre un total potencial estimado para la zona de 432, lo que indicó una disminución del 52,1% del rendimiento comercial.

Ensayos 'in vitro'

En la Figura 2 se resumen los resultados de los ensayos para evaluar el efecto de los extractos cianobacterianos. El extracto etéreo de la cepa 60a promovió la germinación de esporangios, hecho que podría atribuirse a la actividad auxínica de la misma. El extracto etéreo de la cepa 40g de *Nostoc muscorum* produjo inhibición de la germinación de esporangios. El resto de los extractos no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

DISCUSIÓN

Este trabajo registra por primera vez un análisis cuantitativo de la severidad ocasionada por daño de *Bremia lactucae* en *Lactuca sativa* var *capitata* cv *gallega* en la provincia de Buenos Aires y evalúa la acción de potenciales antifúngicos en el patosistema estudiado.

Los resultados de la evaluación de campo corroboran la alta incidencia de esta enfermedad, tal y como ha sido reportado previamente por Melegari *et al.* (2010).

El mayor nivel de severidad se observó asociado a las hojas de superficie superior ubicadas en el segmento de la 5^{ta} a la 11^{ava} (descartando las tres primeras) como fue señalado en la Figura 1a y Fotografía 1.

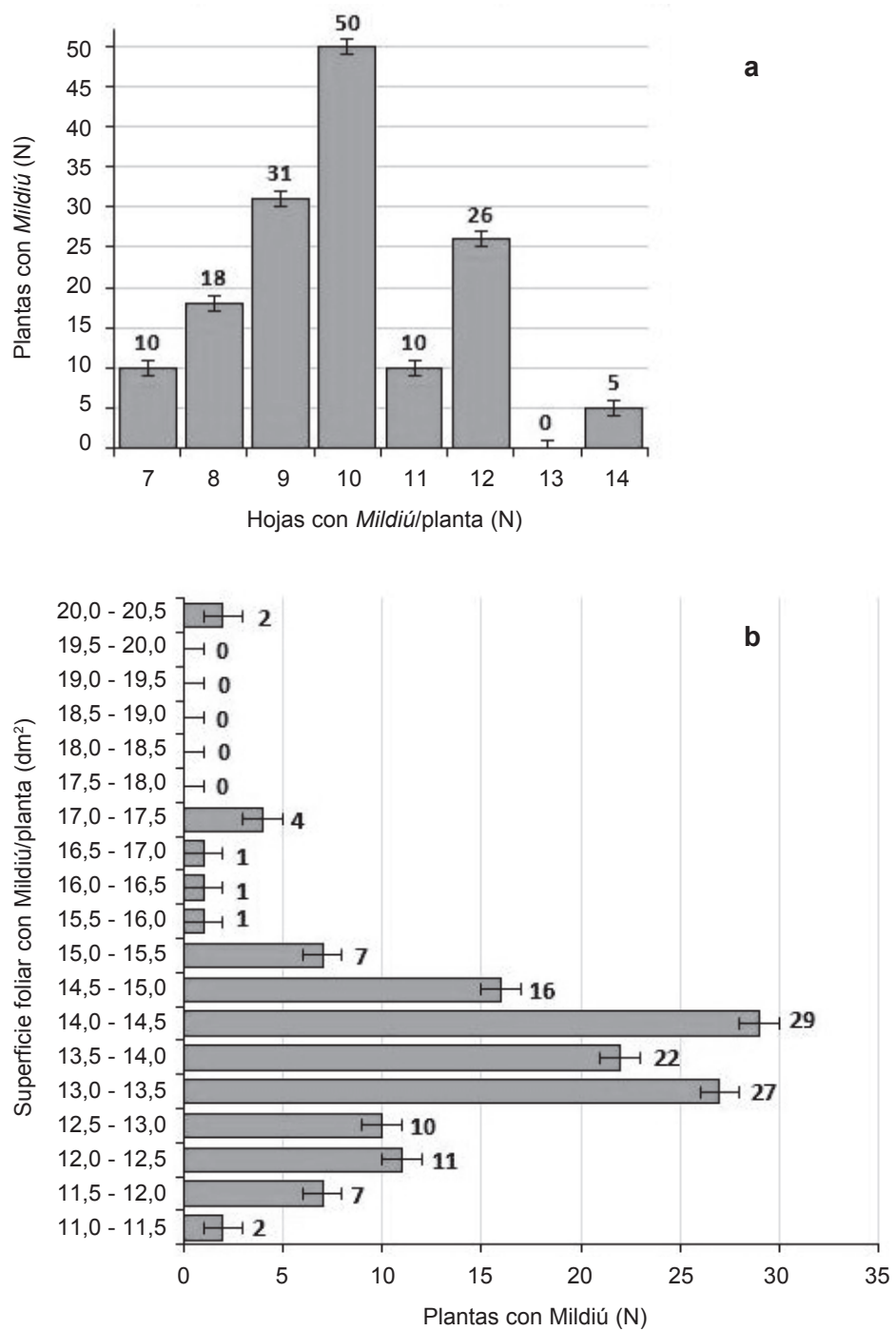


Figura 1. **Severidad**. Expresada como: a) número de hojas afectadas con una o mas manchas (N) y b) superficie foliar afectada con Mildiú por *Lactuca sativa* var *capitata* cv *gallega*. Se descartaron las tres primeras hojas.



Fotografía 1. Planta representativa de la patología con 10 hojas afectadas y 14,4 dm² de superficie foliar afectadas. Se descartaron las tres primeras hojas.

Cuadro 1. Productividades promedio por planta expresadas en: número (N) de hojas totales, número (N) de hojas con ‘Mildiu’, superficie foliar total, superficie foliar total con Mildiu.

Hojas totales (N)/planta	Hojas con Mildiu (N)/planta	Superficie foliar total (dm ²)/planta	Superficie foliar total con Mildiu (dm ²)/planta
42,9 ± 0,1	9,9 ± 0,1	24,6 ± 0,1	13,8 ± 0,1

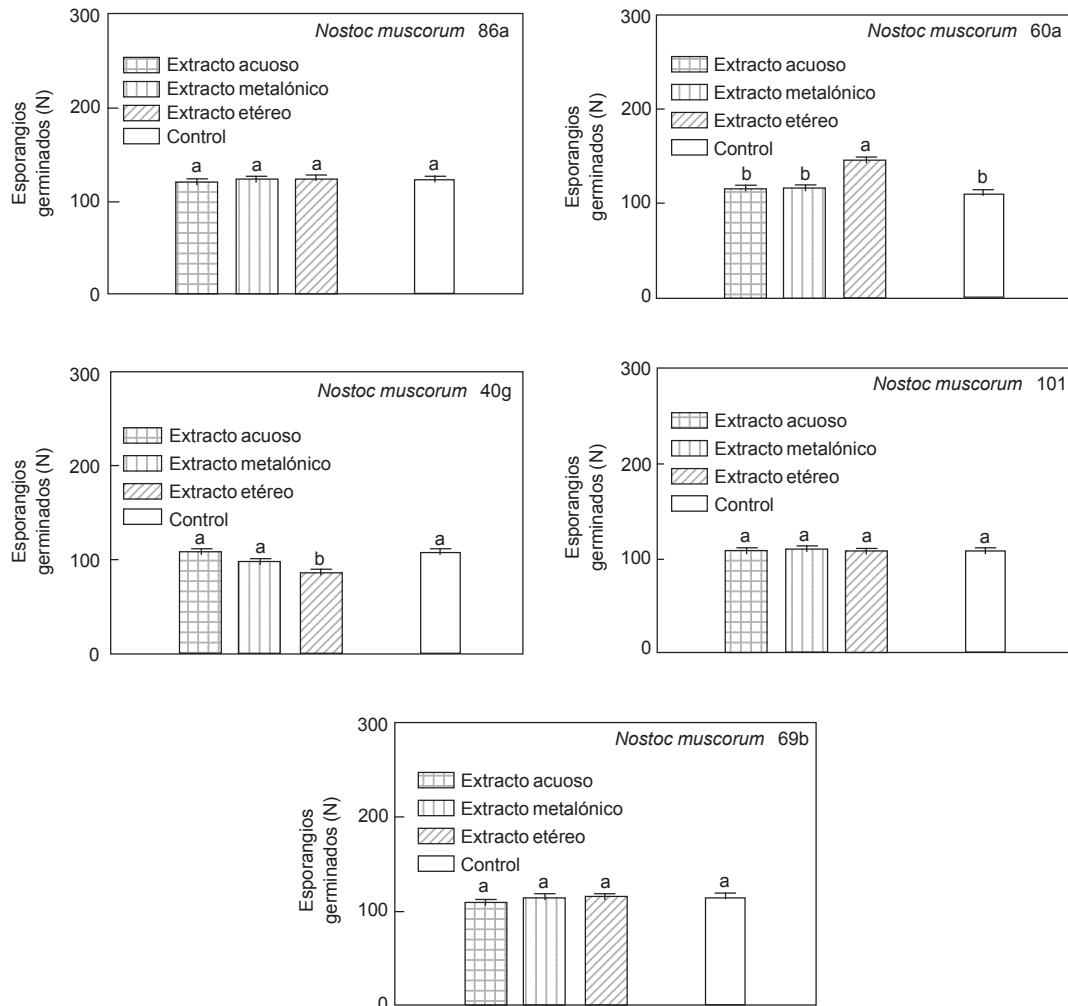


Figura 2. Efecto de los extractos cianobacterianos sobre la germinación de esporangios de *Bremia lactucae*. *Nostoc muscorum* 86a, *Nostoc muscorum* 60a, *Nostoc muscorum* 40g, *Nostoc muscorum* 101, *Nostoc muscorum* 69b. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Dosis v/v 1/10.

Por lo analizado y experiencias de campo del primer autor (desde 1990 hasta la actualidad), esta patología es, en la época y zona evaluada, el causal actual más importante de disminución de la productividad en el cultivar gallega con técnicas de producción de campo y semiforzados. Cabe destacar que el cultivar estudiado corresponde a los tipos Latinas o Criollas que no poseen desarrollo genético de resistencia a esta patología.

La evaluación de extractos algales correspondientes a cepas de *Nostoc muscorum* señaló la existencia de compuestos capaces de generar una inhibición significativa sobre la germinación de esporangios de *Bremia lactucae*. Sin embargo los resultados obtenidos en los ensayos 'in vitro' sugieren una especificidad de respuesta a nivel de cepa. Teniendo en cuenta que estas estructuras constituyen el inóculo primario de la enferme-

dad en estudio, los datos aquí volcados señalan que estos organismos deben ser evaluados cuidadosamente como herramientas potenciales en el manejo de cultivos y que podrían representar una alternativa al uso de funguicidas en este cultivo intensivo tan importante en la horticultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Bensink, J. 1971. Tesis de doctorado. On morphogenesis of lettuce leaves in relation to light and temperature. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 71-15: 1-93
- Biondi, N; R. Piccardi; C. Margheri; L. Rodolfi; G.D. Smith and M.R. Tredici. 2004. Evaluation of *Nostoc* Strain ATCC 53789 as a Potential Source of Natural Pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3313-3320.
- Caire, G.Z; M.S. Cano; M.C. Mule; D.R. Halperin and M. Galvano. 1987. Action of cell-free extracts and products of *Nostoc muscorum* on growth *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phyton* 47(1/2): 43-46.
- Caire, G.Z; M.C. Mulé; S. Doallo; D.R. Halperin and L. Halperin. 1976. Acción de extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* ag. (N° 79a). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 17(3-4): 289-300.
- Caire, G.Z; M.S. Cano; M.C. Mule and D.R. Halperin. 1990. Antimycotic products from the Cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani*. *Phyton* 51:1-4.
- Cano, M.S; M.C. Mulé; G.Z. Caire and D.R. Halperin. 1990. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial Cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *J. Applied Phycology* 2(1): 79-81.
- Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. 2005. Censo Hortícola y Florícola Provincia de Buenos Aires. Dirección general de estadísticas. La Plata, Prov. Bs.As. 115 p.
- Halperin, D.R; G.Z. Caire; M.C. Mule and M.S. Cano. 1979. Influencia de distintas concentraciones de cloruro de sodio sobre la morfología y el contenido de nitrógeno de *Anabaena sphaerica* Barnet et flahault aislada de las salinas grandes de Jujuy (Argentina). *Physis Sec B* 38: 21-38.
- Halperin, D.R; M.L. Mendoza and G.Z. Caire. 1973. Obtención de cultivos axénicos de algas azules (Cyanophyta). *Physis* 84: 67-84.
- Lebeda, A; I. Petzelová and M. Zbynek. 2008. Structure and variation in the wild-plant pathosystem: *Lactuca serriola*-*Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122(1): 127-146.
- Lebeda, A. and V. Zinkernagel. 2003. Characterization of New Highly Virulent German isolates of *Bremia lactucae* and Efficiency of Resistance in Wild *Lactuca* spp. Germplasm. *Journal of Phytopathology* 151, Issue 5, p 274-282.
- Melegari, A.L.; E. Adiercreutz; L. Vigliachino y A. Szczesny. 2010. Etiología y prevalencia de enfermedades de lechuga (*Lactuca sativa*) durante los años 2007 y 2008 en el cinturón hortícola de Mar del Plata. Manual 9-10 EEA INTA San Pedro. Buenos Aires.
- Mitidieri, I. 1995. Las enfermedades de la lechuga y su control, II parte. *Boletín Hortícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad Nacional de La Plata* 3(6): 33-34.
- Mulé, M.C.; G.Z. Caire; S. Doallo; D.R. Halperin y L. Halperin. 1977. Acción de extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* ag. (N° 79a). Efecto sobre el desarrollo del hongo *Cunninghamella blakesleana* (-) en el medio de Mehlich). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 18(1-2): 121-128.
- Prasanna, R.; A. Sood; P. Jaiswal; S. Nayak; V. Gupta; V. Chaudhary; M. Joshy and C. Natarajan. 2010. Rediscovering cyanobacteria as valuable source of bioactive compounds. *Prikladnaia Biokhimiia. I Mikrobiologija* 46(2): 133-47.
- Rastogi, R.P and R.P. Sinha. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnological advanced* 27(4): 521-539.
- Sargent, J.A and H.L. Payne. 1974. Effect of the temperature on germination, viability and fine structure of conidia of *Bremia lactucae*. *Transactions British Mycological Society* 63(3): 509-518.
- Sharaf, K; D. Lewinshon; E. Neve and A. Beharav. 2007. Virulence patterns of *Bremia lactucae* in Israel. *Phytopathology* 35(1): 100-108.
- Tassara, C.A. 2006. Tesis de maestría: Cianobacterias como agente de biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum* en un cultivo de *Lactuca sativa*. Biblioteca de la Facultad de Agronomía UBA. 84 p.
- Watanabe, A. 1959. Distribution of nitrogen fixing blue green algae in various areas in south and east Asia. *Journal of General and Applied Microbiology* 5(1-2): 21-29.
- Zulpa, G.; M.C. Zaccaro; F. Boccuzzi; J. Parada and M. Storni. 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from Cyanobacteria and lactic acid bacteria on "wood blue stain fungi". *Biological Control* 27(3): 345-348.