

Eilyn Mena<sup>1\*</sup>, Martina Jorajuría<sup>2</sup>, Julieta Gurméndez<sup>2</sup>, Pablo Grijalba<sup>3</sup>, Inés Ponce de León<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay; <sup>2</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad ORT, Uruguay; <sup>3</sup>Departamento de Producción de Plantas, Universidad de Buenos Aires, Argentina

\*eilyn.mena@gmail.com

### INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max* (L.)) es un cultivo importante a nivel mundial, y en Uruguay su producción está limitada por la enfermedad del cancro del tallo de la soja (CTS). La enfermedad también está presente en otros países de América del Sur como Brasil, Argentina, Paraguay, Ecuador, Bolivia y en otros países incluidos Estados Unidos de América, Canadá, Francia, Italia, Austria, España, Bulgaria, Rusia, Ghana, Australia, China, Corea y Croacia. Los hongos causantes del CTS pertenecen al género *Diaporthe*, incluyendo *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. masirevicii*, *D. miriciae* y *D. longicolla*. Los síntomas del causados por estas especies de *Diaporthe* consisten en pequeñas lesiones necróticas de color marrón a rojizo que se extienden a lo largo del tallo. La similitud entre los síntomas y la morfología de las especies constituye un desafío para el diagnóstico de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue detectar y cuantificar las especies de *Diaporthe* asociadas al CTS en Uruguay mediante qPCR multiplex.

### RESULTADOS

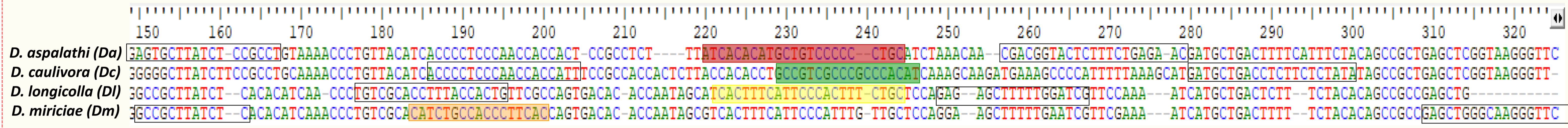
#### 1. Síntomas en plantas de soja cv. Williams (susceptible) inoculadas con diferentes *Diaporthe*



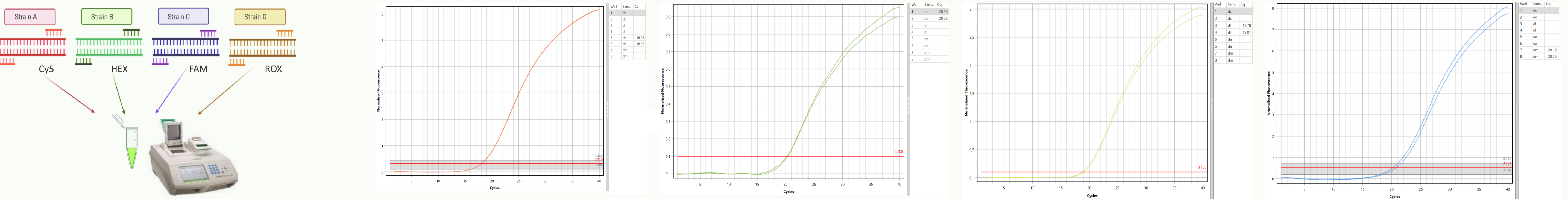
**Figura 1.** Cancro del tallo de soja causado por la inoculación de especies de *Diaporthe*, 7 días después de la inoculación (dpi). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las especies, t de Student,  $p < 0.01$ .

Los síntomas de la enfermedad aparecen en el tallo de todas las plantas de soja inoculadas con *Diaporthe*, como manchas de 1 a 2 mm que se expanden como lesiones alargadas de color marrón. Se observó una mayor longitud de las lesiones y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) en plantas inoculadas con *D. longicolla* y *D. caulivora*. La presencia de picnidios en el tallo de soja se observó en plantas inoculadas con *D. longicolla* y *D. miriciae*.

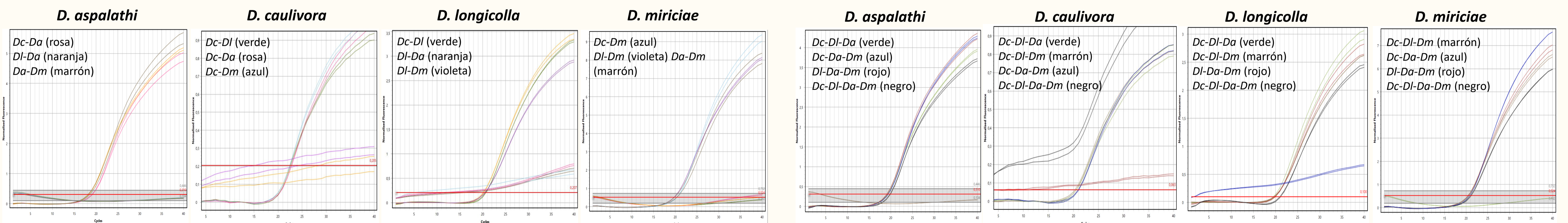
#### 2. Validación y especificidad del ensayo de PCR multiplex



**Figura 2.** Diseño de primers y sondas basado en el alineamiento del factor de elongación de la traducción 1<sup>o</sup> alfa (TEF). Las sondas TaqMan se muestran en colores: *D. aspalathi* (rojo), *D. caulivora* (verde), *D. longicolla* (amarillo) y *D. miriciae* (azul).

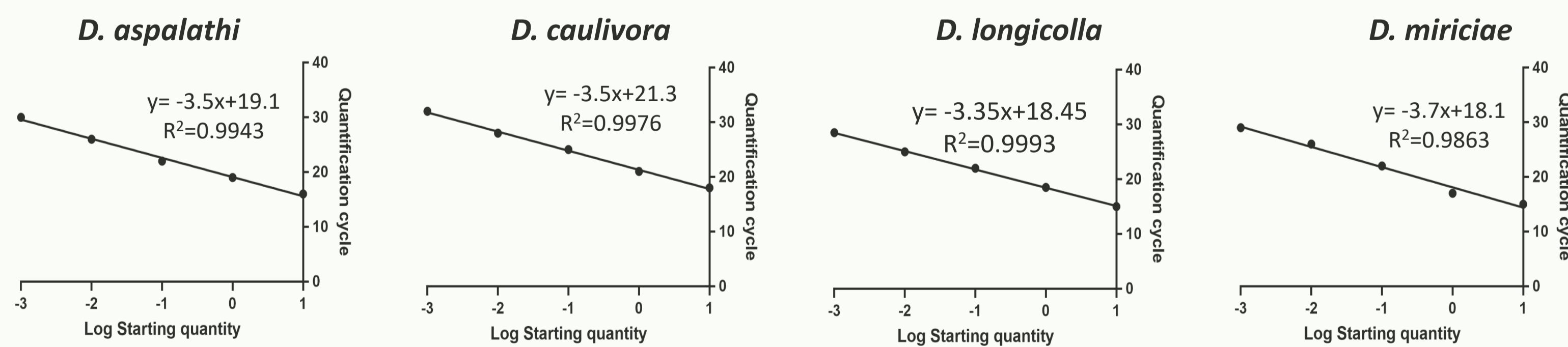


**Figura 3.** Especificidad del ensayo de PCR multiplex utilizando ADN genómico de cada especie de *Diaporthe*: *D. aspalathi* (rojo), *D. caulivora* (verde), *D. longicolla* (amarillo) y *D. miriciae* (azul). En todos los casos se pusieron 25 ng de ADN de *D. aspalathi* Dpm2, *D. caulivora* D57, *D. longicolla* D43.1 y *D. miriciae* D67 (2 réplicas técnicas por especie) en un mix conteniendo todos los primers y sondas.



**Figura 4.** Especificidad del ensayo dúplex y cuadruplex, utilizando ADN genómico de cada especie de *Diaporthe* en combinaciones de 2, 3 y 4 especies por muestra (2 réplicas técnicas por especie). En todos los casos se pusieron 25 ng de ADN de *Diaporthe* en un mix conteniendo todos los primers y sondas.

Cuando se analizaron en simultáneo dos o tres muestras de ADN de diferentes especies de *Diaporthe*, los cuatro juegos de Primer-Sonda TaqMan tuvieron una especificidad similar entre sí y detectaron eficientemente entre las diferentes especies de *Diaporthe* en el ensayo cuadruplex. Al poner ADN de las cuatro especies en una misma reacción de PCR, se detectaron señales para las cuatro sondas, lo que demuestra la capacidad del ensayo para detectar en simultáneo las especies causantes del CTS: *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. longicolla* y *D. miriciae*.



**Figura 5.** Curvas estándar para la cuantificación de especies de *Diaporthe* utilizando el ensayo de qPCR cuadruplex (3 réplicas técnicas de cada dilución de ADN a concentraciones de 10-0,001 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). En el gráfico se muestran las ecuaciones de regresión y el  $R^2$  para el valor de los ciclos de qPCR respecto al logaritmo de la concentración de ADN genómico.

La amplificación de la serie de diluciones 1/10 (10-0.001 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) mostró una relación lineal entre la concentración del ADN y el ciclo de cuantificación de las qPCR para todos los primers de *Diaporthe*. En todos los casos la concentración mínima detectable fue de 0.001 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

#### 3. Detección de especies de *Diaporthe* en plantas de soja inoculadas bajo condiciones controladas y en muestras de campo



**Figura 6.** (A) Tallo de soja co-inoculado con las cuatro especies de *Diaporthe* y no inoculado (control), bajo condiciones controladas (16/8h luz/oscuridad y 25°). (B) qPCR cuadruplex de los tallos inoculado y control.

**Figura 7.** (A) Plantas y semillas de soja con síntomas, (B) Plantas y semillas de soja sin síntomas, (C) Frecuencia de amplificación de ADN de *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. longicolla* y *D. miriciae* en muestras provenientes de campo infectadas naturalmente.

Para validar el ensayo de qPCR cuadruplex en plantas de soja, se inocularon 23 tallos con diferentes especies de *Diaporthe* y sus combinaciones. Se detectaron todas las especies de *Diaporthe* analizadas en el ensayo, lo que demostró la capacidad para detectar en simultáneo las especies de *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. longicolla* y *D. miriciae* presentes en tallos de soja con síntomas del cancro del tallo.

Se analizaron un total de 54 tallos con síntomas del CTS, y semillas provenientes de 30 plantas con síntomas del CTS. Se detectaron las cuatro especies *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. longicolla* y *D. miriciae* en tallos con síntomas del CTS. Se obtuvo un aislado de *D. aspalathi*, especie que creíamos no estaba afectando a la soja en el país por la presencia de genes de resistencia *Rdm1-6* en las variedades plantadas. Se detectó en simultáneo más de una especie de *Diaporthe* en un mismo tallo de soja, lo que evidencia que las especies pueden co-infectar la planta. En plantas con lesiones muy avanzadas se detectó la misma especie de *Diaporthe* en tallo y semillas. La especie detectada con mayor frecuencia en el tallo y las semillas fue *D. longicolla* (especie que también causa la enfermedad de descomposición de las semillas).

### CONCLUSIONES

En conclusión, nuestro ensayo de qPCR multiplex proporciona un método rápido y práctico para detectar y cuantificar cuatro especies de *Diaporthe* causantes del CTS directamente en muestras de tallo o semillas de la planta. El ensayo de qPCR es específico para cada una de las especies analizadas: *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. longicolla* y *D. miriciae* y pueden detectarse en muestras co-infectadas. La aplicación de los qPCR multiplex ofrecen su potencial para mejorar el diagnóstico de las especies causantes del CTS en lotes de semillas de soja y en etapas tempranas de las plantaciones de soja de Uruguay.

### FINANCIAMIENTO

- Fondo Clemente Estable FCE\_3\_2022\_1\_172688  
- PEDECIBA

