

Caracterización taxonómica y análisis de la variabilidad del agente causal del cancro del tallo de la soja en Buenos Aires (2005/2007)

GRIJALBA, P. E.¹; RIDAO, A. DEL C.²; GUILLIN, E.³

RESUMEN

El complejo *Diaporthe/Phomopsis* es un importante grupo de hongos patógenos de la soja. Dentro del mismo, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* es uno de los agentes causales del cancro del tallo. Veintitrés aislamientos de este hongo, provenientes de diferentes zonas geográficas de la provincia de Buenos Aires, fueron caracterizados morfológicamente y genéticamente. Los criterios morfológicos fueron tipo y color de micelio; formación del teleomorfo y/o del anamorfo. La identificación molecular fue llevada a cabo utilizando una técnica de restricción de fragmentos de amplificación (PCR-RFLP) de la región ITS de ADN ribosomal. Adicionalmente, los productos de amplificación fueron secuenciados y comparados con la información de bancos de datos. Los aislamientos presentaron características morfológicas y patogénicas propias de la variedad, y los patrones de restricción con la enzima Alu I fueron concordantes con la identificación morfológica y con la información de secuencias disponibles. Las reconstrucciones filogenéticas apoyan la idea de que *D. meridionalis* y *D. caulivora* son entidades biológicamente aisladas. Los resultados obtenidos confirmaron la utilidad del uso del método de PCR-RFLP para la identificación precisa y rápida de *D. caulivora*. Por sus características, este método puede ser implementado para análisis de rutina en laboratorios de pequeña y mediana escala.

Palabras clave: *Glycine max*, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, PCR-RFLP, ITS.

ABSTRACT

Diaporthe/Phomopsis is an important group of soybean pathogens. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* is one of the causal agents of stem canker. Twenty three isolates from different regions from the Province of Buenos Aires were morphologically and genetically characterized and assigned to different taxa within the *Diaporthe/Phomopsis* complex; diagnostic morphological traits were: mycelium type and color, teleomorph/anamorph occurrence. Molecular characterization was carried out using RFLP analyses of PCR-amplified DNA (PCR-RFLP) for the Internal Transcribed Spacer (ITS) of the ribosomal DNA (rDNA) region. PCR products were additionally sequenced and compared with information available. All isolates were morphologically assigned to *D. phaseolorum* var. *caulivora*; PCR-RFLP patterns with restriction enzyme Alu I were coincident with morphological identification and sequence information. Phylogenetic reconstructions supported the idea that *D. caulivora* and *D. meridionalis* constitute biologically isolated entities. Our results validated the use of a single enzyme PCR-RFLP method for fast and accurate identification of *D. caulivora*. This technique resulted appropriated for routine analysis in small/medium throughput laboratories.

Keywords: *Glycine max*, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, PCR-RFLP, ITS.

1.- Facultad de Agronomía (UBA).

2.- Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP) Argentina

3.- Instituto de Genética, CNIA – INTA Castelar. e-mail: eguillin@cnia.inta.gov.ar

Recibido 05 de enero de 2011 // Aceptado 30 de agosto de 2011 // Publicado online 09 de noviembre de 2011

INTRODUCCIÓN

El complejo *Diaporthe/Phomopsis* (D/P) constituye un importante grupo de hongos patógenos del cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Morgan Jones, 1989). Comprenden al mismo, *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc., anamorrofo *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc.; *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm) Fernández and Hanlin, y *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Dpc), K.L. Athow and R.M. Caldwell, citados como agentes causales del cancro del tallo de la soja (CTS) (Fernández y Hanlin, 1996; Hartman *et al.*, 1999).

En la Argentina, la enfermedad alcanzó características epidémicas durante la campaña 1996/97 (Ploper, *et al.*, 1997; Grijalba y Marino, 2001). En ese momento el agente causal fue identificado como *D. phaseolorum* var. *meridionalis*. Como consecuencia de la incorporación de genes de resistencia al patógeno, en los cultivares de soja la prevalencia e intensidad del CTS disminuyó (Ploper, 2004). Sin embargo, la enfermedad reapareció nuevamente con características epidémicas a partir de la campaña 2005. A diferencia del brote anterior, esta vez el agente causal prevalente del CTS fue *Dpc*, y la zona donde se concentró la epifitía fue el área sur de la región sojera de la Argentina (Grijalba y Guillín, 2005 y 2007; Pioli *et al.*, 2005; Ridao y Lago, 2007; Lago, 2010). *Dpc* fue citado por primera vez en Argentina en 2001 (Pioli *et al.*, 2001); desde entonces el patógeno se ha extendido a diferentes áreas del país, principalmente dentro la provincia de Buenos Aires (Grijalba y Guillín, 2005; Ridao *et al.*, 2005; Lago *et al.*, 2007). Durante el ciclo agrícola 2006/07 en el centro y sudeste bonaerense, la prevalencia fue del 94% y la incidencia observada varió entre 0,5 y 55,5% (Lago, 2010). Como se menciona más arriba, el control de *Dpm* ha sido efectivamente logrado a partir de la introducción de genes de resistencia en los principales cultivares argentinos de soja. Por el contrario, no se han detectado hasta el momento genotipos resistentes a *Dpc* en el acervo genético de la soja como especie biológica (*Glycine max* y *Glycine soja*). Se torna entonces extremadamente importante desde el punto de vista epidemiológico y del manejo del cultivo determinar con claridad cuál es el patógeno prevalente en la actualidad y a futuro. La detección de uno u otro agente patógeno determinará diferentes estrategias a seguir en distintos aspectos de la producción de variedades y las tareas de control de enfermedades en el cultivo de la soja.

La determinación de estos hongos es dificultosa, pues son altamente variables en su morfología y patogenicidad. Tanto *Dpc* como *Dpm* producen síntomas parecidos, lo cual impide su identificación en el campo. En consecuencia, para determinar la variedad del hongo, debe recurrirse al aislamiento y posterior estudio de las características morfológicas en laboratorio (Morgan Jones, 1989). Sin embargo, Yorinori (1991) y Vechiato, *et al.* (2003) han demostrado que el diagnóstico basado en características tales como la pigmentación de la colonia en medio de cultivo, la presencia y el tipo de picnidios debe ser considerado como preliminar. Fernández y Hanlin (1996) también criticaron la identificación morfológica indicando que las variaciones genéticas muchas veces no son tenidas en cuenta, por eso complementaron sus trabajos con métodos moleculares. Un pro-

blema adicional que presenta la identificación morfológica es que el análisis requiere de un período de cultivo *in vitro* de aproximadamente un mes para obtener el total de las estructuras reproductivas características de cada taxón. Este período resulta muchas veces demasiado largo para satisfacer las necesidades del productor que debe tomar decisiones en un tiempo mucho menor. Tomando esto en cuenta, Zhang *et al.* (1997) desarrollaron técnicas moleculares tradicionales (PCR-RFLP) y de PCR en tiempo real para caracterizar e identificar aislamientos del complejo D/P en soja (Zhang *et al.*, 1997; 1999).

El objetivo del presente trabajo ha sido explorar la pertenencia taxonómica y la variabilidad genética de los aislamientos causantes del CTS en la provincia de Buenos Aires (República Argentina) durante tres campañas agrícolas (2005-2007). Se encaró además la determinación taxonómica de los agentes causales del CTS utilizando PCR-RFLP a los efectos de compararla con la identificación tradicional, validarla y ponerla a disposición como una herramienta ágil y sencilla para el diagnóstico rápido de esta patología.

MATERIALES y MÉTODOS

Procedencia, obtención y conservación de los aislamientos

Veintitrés aislamientos de *Dpc* fueron obtenidos de plantas con síntomas típicos de cancro de lotes comerciales de soja cultivados en la provincia de Buenos Aires. A partir del margen de las lesiones, se cortaron trocitos de la médula de 2-3 mm de largo y se desinfectaron mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto. Posteriormente, se sembraron en cajas de Petri conteniendo agar papa dextrosado al 2% acidificado con 0,2% de ácido láctico, pH 4.5 (APDA). Se sembraron además: 1 cepa patrón de *Dpc*, 3 cepas de *Dpm* y 3 de *Phomopsis longicolla* (Pl) provenientes de la colección de hongos de la Cátedra de Fitopatología de la Universidad de Buenos Aires (tabla 1).

Determinación morfológica

Para la caracterización morfológica, los aislamientos se sembraron en el centro de cajas de Petri que contenían APD y APD con el agregado de un trocito de tallo de soja estéril de 4-5 cm de largo (Yorinori, 1996). Las cajas se incubaron durante 15 días a 25 + 2 °C, en oscuridad y, posteriormente, en cámara climática con ciclos de 12/12 h de luz ultravioleta cercana (NUV)/oscuridad a la temperatura indicada anteriormente durante 30-40 días aproximadamente. La determinación taxonómica se realizó teniendo en cuenta la presencia y el tipo de estroma, la coloración y el tipo del micelio, la presencia o ausencia de picnidios, el tipo de conidios (alfa y/o beta), la presencia y el agrupamiento del teleomorfo y la longitud y ancho de ascos y ascosporas.

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se efectuó para los aislamientos de *Dpc*. La inoculación se realizó mediante el método del escarbadiante (Young, 1943; Yorinori, 1991) sobre

10 plantas de soja en estado vegetativo V1 (Fehr y Caviness, 1977) del cultivar DM 3700 RR con antecedentes de susceptibilidad al patógeno (Grijalba y Guillín, 2007). La evaluación de la reacción se realizó 14 días después de la inoculación. El hongo se aisló de la periferia de las lesiones después de 30 días de la inoculación mediante el procedimiento antes descrito y fue comparado con las características morfológicas de las colonias originales. Se cumplió así con los postulados de Koch.

Determinación molecular

Extracción de ADN. El ADN del micelio de los aislamientos se extrajo a partir de colonias de 36 h de crecimiento en APD a 25 °C (Zhang *et al.*, 1999), utilizando un kit comercial (Wizard genomic, Promega Inc.), según protocolo e instrucciones del proveedor.

Amplificación por PCR de la región ITS

La región del ADN nuclear (figura 1) se amplificó usando los iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación fueron realizadas con un termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA) de acuerdo con el protocolo de Zhang *et al.* (1997). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 50 mM KCl; 2.5 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3; 0.2 mM de cada dTTP, dATP, dGTP y dCTP; 50 pmol de cada iniciador; 2.5 unidades de Taq polimerasa (Gibco BRL Corp., Grand Island, MD) y 25 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 µl. El perfil de la reacción fue: 1 ciclo a 96 °C durante 3 min y 30 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y 72 °C durante 2 min. Cada experimento incluyó una reacción sin ADN (control negativo) para monitorear la contaminación potencial por ADN exógeno; la amplificación de cada aislamiento se repitió al menos dos veces. Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% p/v en TBE 0.5x (0.045 M Trizma base, 0.045 M ácido bórico, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y se visualizaron en un transiluminador con fluorescencia UV después de la tinción con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se documentaron usando un procesador de imágenes (Gel Documentation System – ImageStore 5000, UVP, UK) y se almacenaron como archivos TIFF.



Figura 1. Región del ADN ribosomal y cebadores (ITS4 e ITS5) utilizados en la determinación taxonómica y en la evaluación de la diversidad genética para el complejo *Diaporthe/Phomopsis*. Las secuencias de los cebadores se indican en el texto. LSU: Subunidad grande del gen del ADNr (Large subunit rDNA gene); SSU: Subunidad pequeña del gen del ADNr (small subunit rDNA gene). ITS1 e ITS2: espaciadores transcritos internos (Internal Transcribed Spacers 1 y 2).

Los productos de PCR de la región ITS del ADNr fueron digeridos con 5 diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *MseI*, *HhaI*, *RsaI* y *SacI*, Zhang *et al.*, 1997 y 1999), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (New England Biolabs, Beverly, MA). Se usaron 7 µl de los productos de PCR (aproximadamente 200 a 500 ng de ADN), 1.5 µl de buffer (10x), 6.5 µl de H₂O_{dd} y dos unidades de enzima en cada caso (15 µl volumen final). La digestión se incubó a 37 °C durante 2 a 4 h. El producto de la digestión enzimática fue separado en geles de agarosa al 3% (Gibco BRL Corp.) a 3.5 V/cm durante 45 – 60 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV. Se usó un marcador de peso molecular de doble cadena de 100 bp (Life Technologies). Nuevamente, las imágenes de los geles se documentaron usando un procesador de imágenes (Gel Documentation System – ImageStore 5000, UVP, UK) y se almacenaron como archivos TIFF.

Análisis de variabilidad

El remanente de los productos de amplificación (Aprox. 43 µl) se purificó con el "QIAquick PCR Purification Kit (50)" (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). El ADN purificado fue secuenciado en la Unidad de Genómica del CICVyA (INTA Castelar). A los efectos de minimizar errores de secuenciación, se obtuvieron tanto las cadenas 5' → 3' como las 3' → 5'. Las secuencias consenso fueron ensambladas utilizando el programa GeneTool Life 1.0 (Layon, 2000). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GeneBank; los números de acceso correspondientes están listados en la tabla 1.

Análisis filogenético

Los datos obtenidos para *Dpc*, *Dpm* y *Pl* fueron analizados utilizando el algoritmo de "Neighbour-net" (NN; Bryant y Moulton, 2004) a los efectos de computar gráficos de partición basados en las distancias no corregidas (p) entre todos los pares de secuencias; el nivel de soporte de las ramas (bootstrap) para el NN se realizó a partir de 5000 pseudorrepliques. NN es un método de construcción de redes filogenéticas exploratorias, derivado del algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) de Saitou y Nei (1987). Esta metodología utiliza como entrada una matriz de distancia obtenida a partir de una matriz de caracteres (en este caso, un alineamiento múltiple de secuencias) y provee una apreciación sobre el nivel de conflicto (incongruencia) en el set de datos. Es importante señalar que NN no propone como resultado una hipótesis filogenética explícita, sino más bien una primera visión del nivel de estructuración del set de datos, al tiempo que ofrece una reconstrucción de los agrupamientos que no involucra supuestos previos. El análisis de NN fue realizado utilizando el programa SplitsTrees 4.0 (Huson *et al.*, 2006).

A fin de complementar el análisis de NN y obtener una hipótesis explícita se realizó la reconstrucción del árbol filogenético más probable utilizando el método de Máxima Verosimilitud (MV), considerando el modelo de evolución molecular de Tiempo General Reversible, y una tasa de sustitución que varía entre sitios con una distribución Gamma con sitios invariantes a lo largo de la secuencia. El

modelo de evolución molecular más probable fue evaluado utilizando el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2007). El análisis de consistencia interna (bootstrap) para el árbol MV se basó en el análisis de 1000 pseudorréplicas. Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa Mega 5.0.

El análisis de variabilidad incorporó además de las secuencias generadas en el laboratorio del Instituto de Genética Ewald A. Favret (IGEAF) todas las secuencias de la región del ADNr de *D. phaseolorum* var. *caulivora* y *D. phaseolorum* var. *meridionalis* disponibles en GeneBank al mes de abril de 2011 provenientes de diferentes orígenes geográficos. Se calcularon además las distancias genéticas no corregidas (p) entre cada uno de los grupos de haplotipos analizados (Mega 5.0). A los efectos de corroborar la corres-

pondencia entre los agrupamientos obtenidos y el análisis de PCR-RFLP (pertenencia taxonómica) para las secuencias del GeneBank, éstas fueron analizadas *in silico* utilizando con el programa NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBCutter2/>).

RESULTADOS

Determinación taxonómica por morfología

De acuerdo con las características morfológicas en APD y APD con el agregado de tallitos de soja, todos los aislamientos fueron identificados como *Dpc*, *Dpm* y *PI* según lo descripto por Fernández y Hanlin (1996) y Pioli *et al.* (2003), según figura en la tabla 1.

Denominación	Origen	Número Calle (Figura 1)	Número de acceso al GENBANK	Origen aislamiento (1-) o Envío de plantas (2-)
Dpc-05-1	Mar del Plata	6	HM625752	Ing. Pascualini 2
Dpc -05-2	Mar del Plata	7	HM625753	Ing. Pascualini 2
Dpc -05-3	San A de Areco	8	HM625754	Ing. Dufourq 1
Dpc -06-1	Ramallo	3	HM625755	P. Grijalba 1
Dpc -07-1	Gral Rod.	1	HM625756	P. Grijalba 1
Dpc -07-2	Pergamino	2	HM625757	P. Grijalba 1
Dpc -07-3	Trenq. Lauq	4	HM625758	Productor 2
Dpc -07-4	Quequen	9	HM625759	Ing. Carmona 2
Dpc -07-5	Gral Piran	10	HM625760	P. Grijalba 1
Dpc -07-6	Quequen	11	HM625761	P. Grijalba 1
Dpc -07-7	Azul	12	HM625762	Ing. Carmona 2
Dpc -07-8	S. Manuel	13	San Manuel	P. Grijalba 1
PI	S/D	14	-----	P. Grijalba 1
Dpc -07-10	Balcarce	15	HM625762	P. Grijalba 1
Dpc -07-11	Necochea	16	Necochea	P. Grijalba 1
PI	S/D	17	-----	Ing Grijalba 1
Dpc -07-13	Tandil	18	HM625765	P. Grijalba 1
Dpc -07-14	Necochea	19	HM625766	P. Grijalba 1
Dpc -07-15	Necochea	20	HM625767	P. Grijalba 1
Dpc -07-16	Tandil	21	HM625768	P. Grijalba 1
Dpc -07-17	S. Manuel	22	HM625769	P. Grijalba 1
Dpc -07-18	Urdampilleta	26	HM625770	Productor 2
Dpc -07-19	Guamini	28	HM625771	Ing. Gally 2
Dpc -07-20	Loberia	29	HM625772	Ing Carmona 2
Dpc -07-21	San A de Areco	30	HM625773	P. Grijalba 1
Dpc -Patrón	USA	5	-----	Ing. Tozzini 1
Dpm-1	Paraguay	23	HQ130438	Ing. Román 1
Dpm -2	Vdo. Tuerto	24	HQ130439	Ing. Grijalba 1
Dpm -3	Pergamino	25	HQ130440	Ing Grijalba 1
PI-4-11	S/D	27	HQ130441	Ing. Barreto 1

Tabla 1. Aislamientos: Denominación, procedencia, número de acceso al GeneBank y fragmentos de restricción (PCR-RFLP, *Alu I*) de la región del ADNr (ITS1, 5.8S e ITS2) de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* (*Dpc*), *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (*Dpm*), *Phomopsis longicolla* (*PI*).

Determinación taxonómica con marcadores moleculares

Los productos de amplificación obtenidos presentaron un tamaño aproximado de 600 bp. De las enzimas utilizadas en el análisis de restricción de los productos de PCR de la región ITS, sólo *Alu I* (figura 2) arrojó patrones unívocos, distintivos y consistentes con la identificación taxonómica tradicional, de caracteres morfológicos. Este resultado concuerda con lo comunicado por Zhang *et al.* (1997). *Dpc* presentó dos bandas diagnósticas, mientras que para *Dpm* se registró una única banda (no existen sitios de restricción para esta enzima). Los aislamientos de *P. longicolla* presentaron también un patrón diferencial de dos bandas diagnósticas. Las otras enzimas no permitieron diferenciar los tres taxones bajo análisis de manera unívoca, cuando se las utilizó de manera individual (datos no mostrados).

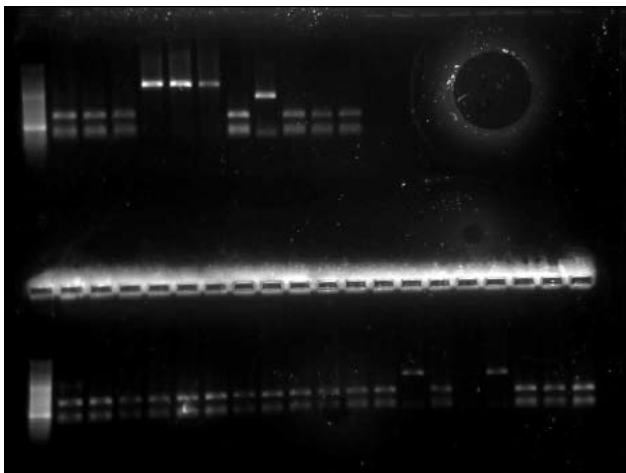


Figura 2. Patrones de restricción para la región del ITS del ADNr de *Dpc*, *Dpm* y *Pl* utilizando la enzima *Alu I*. Panel inferior, de izq a der: calles 13 y 16, *Pl*. Calles 1 – 12, 14, 15, 17 – 20, *Dpc*. Panel superior, de izq a der: calles 1 – 3, 7, 9 – 11, *Dpc*; calles 4 – 6, *Dpm*; calle 8: *Pl*.

Pruebas de patogenicidad

Todos los aislamientos de *Dpc* dieron resultado positivo, manifestado por el desarrollo de un cancro visible y/u oscurecimiento interno de la médula en al menos una de las diez plantas inoculadas.

Análisis de variabilidad

La distancia intragrupo fue de 0,003±0,002 para el cluster de *Dpm* y de 0,001±0,001, para *Dpc*. La distancia entre clados (*Dpm* y *Dpc*) resultó de 0,042±0,013, es decir, de un orden de magnitud mayor que la distancia intragrupo. Las diferencias dentro de los grupos vienen dadas principalmente por inserciones o deleciones (in/dels) o bien sustituciones (transiciones o transversiones) puntuales dentro de los grupos. Las diferencias entre grupos resultan de in/dels de mayor tamaño y son los que generan polimorfismos de corte para las enzimas de restricción.

El análisis de Neighbor-Net para la región del ADNr muestra una alto nivel de soporte para la formación de grupos entre *Dpm* y *Dpc*, (figura 3, valor de bootstrap 100% en las ramas que separan los grupos). A su vez, todos los aislamientos de *Dpc* pueden agruparse en seis haplotipos diferentes) cuatro de los cuales (AF00212, USA; AF000563, USA y HM625767, Necochea; HM625773, San Antonio de Areco,) constituyen haplotipos únicos, que se diferencian de los dos grupos principales. Los dos grupos principales de haplotipos incluyen, a su vez, aislamientos de diferentes orígenes geográficos. Lo mismo se verifica para los dos grupos de haplotipos detectados en *Dpm*.

Análisis filogenético

De manera coincidente, la reconstrucción filogenética por el método de máxima verosimilitud agrupó en diferentes clados a todas las secuencias de aislamientos determinados como de *Dpc* y *Dpm*, tanto a partir de la observación mor-

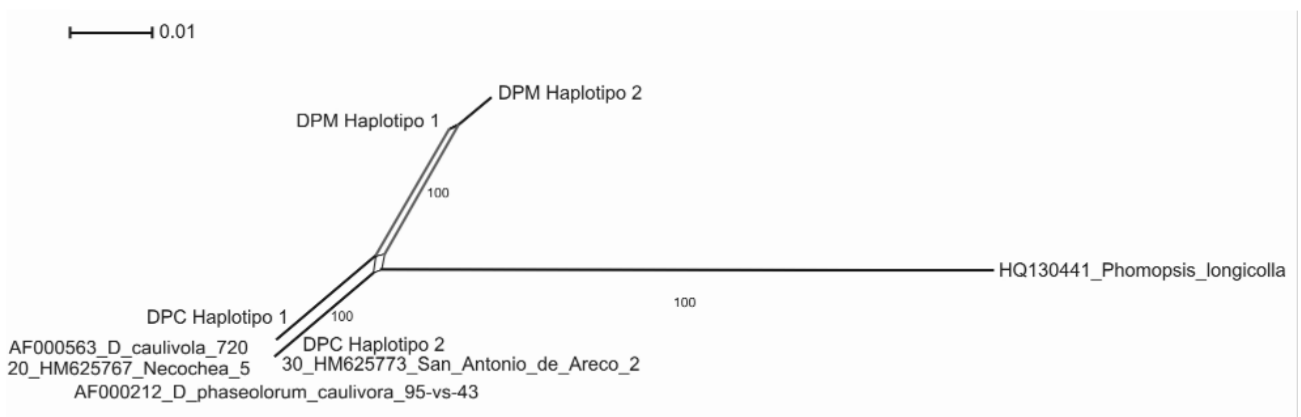


Figura 3. Red de haplotipos obtenida a partir del análisis de Neighbor-net (SplitsTree4) de la matriz de distancia obtenida desde el alineamiento de secuencias de la región del ADNr; se observa que el agrupamiento de los distintos haplotipos se corresponde con la determinación taxonómica de las muestras. Se aprecia un soporte de bootstrap de 100% (sobre los ejes) para la separación entre los tres taxa principales. La longitud relativa de cada eje es función de la cantidad de cambio acumulado entre cada agrupamiento. El "LFIT" (nivel de concordancia entre el gráfico y la matriz de distancia) es de 100%, indicando que todos los conflictos del set de datos (ejes paralelos de igual longitud) están realmente representados en el gráfico. Imagen propia, elaborada para la presente edición.

fológica, como del análisis molecular *in vitro* e *in silico* (figura 4). El valor de soporte (bootstrap) para los agrupamientos vuelve a ser cercano a 100 también para la

reconstrucción por MV. La reconstrucción filogenética por MV también reconoce dos subgrupos de haplotipos dentro de *Dpc* y *Dpm*.

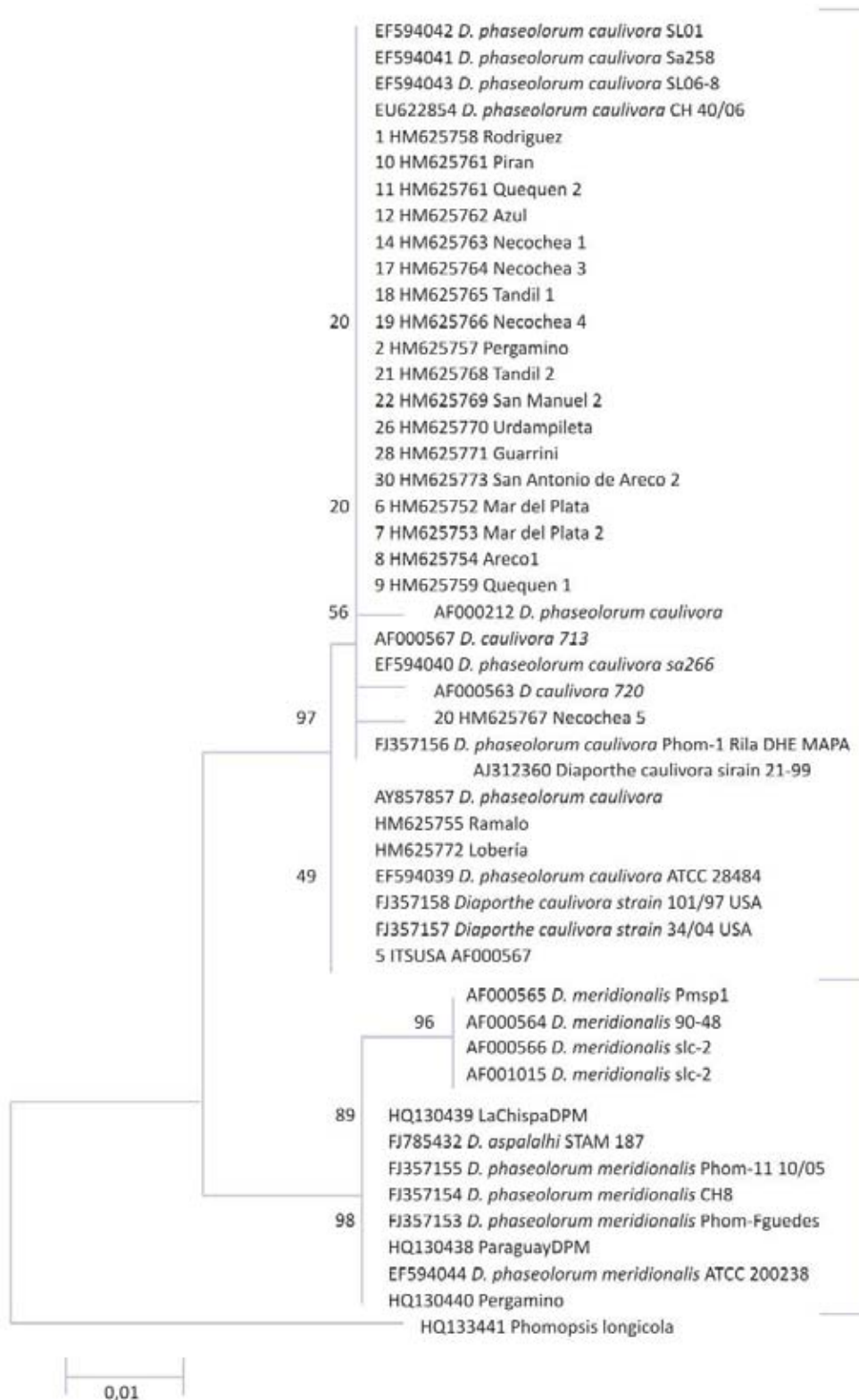


Figura 4. Reconstrucción filogenética inferida por el método de máxima verosimilitud. Se muestra el árbol con el mayor índice de probabilidad (log likelihood, -946,8307). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de los brazos medidas en números de sustituciones por sitio. Pueden observarse dos clados (*Dpc* y *Dpm*) con soporte de bootstrap de 97% y 98%, respectivamente. La determinación taxonómica a partir del análisis de restricción (*in vitro* e *in silico*, derecha) resultó consistente para todos los haplotipos, e independiente de la formación de subgrupos dentro de los clados principales. También pueden verse los tamaños de banda exactos para cada grupo. Outgroup (raíz) *Phomopsis longicola*. Imagen propia, elaborada para la presente edición.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El análisis de restricción de los productos de amplificación (PCR-RFLP) ha sido utilizado para identificar distintas especies de hongos, y también para diferenciar subgrupos dentro de especies (Zhang *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996; Goodwin, *et al.*, 1989). En el presente trabajo, se corroboró que la utilización de la amplificación de la región ITS, seguida por la restricción con una única enzima (*AluI*) resultó absolutamente consistente con la identificación morfológica para cada uno de los agentes causales del cancro del tallo de la soja.

Como se mencionó anteriormente, la identificación específica de taxones del complejo *Diaporthe/Phomopsis* presenta dificultades; los métodos tradicionales resultan complicados, de mucha duración, y arrojan resultados en ocasiones confusos. La determinación molecular (extracción de ADN, amplificación, restricción con *AluI* y visualización en geles de agarosa bajo luz UV) puede ser completada en un lapso aproximado de 48 horas. Con un cicladador térmico convencional pueden analizarse hasta 96 muestras a la vez. Una vez puesta a punto la metodología, el tiempo promedio de análisis para un lote de muestras es de dos a tres días, en comparación con los 30 a 40 días necesarios para la caracterización morfológica. Adicionalmente, y a diferencia de lo que ocurre con la determinación tradicional donde los caracteres diagnósticos tienen cierto grado de superposición en el rango de sus estados (Fernández y Hanlin, 1996; Yorinori, 1991), los resultados del test de PCR-RFLP son absolutamente unívocos para las diferentes variedades del agente causal de cancro de la soja analizadas, e irrespectivo del haplotipo en cuestión, tal como lo comprueba el análisis *in silico*.

Desde el punto de vista netamente instrumental, el presente trabajo muestra que la amplificación de la región ITS seguida por la restricción con una única enzima (*AluI*) constituye una herramienta unívoca simple, rápida y económica que puede ser utilizada rutinariamente para la diferenciación e identificación de las variantes del complejo *Diaporthe/Phomopsis* en laboratorios de diagnóstico fitopatológico en Argentina. Esta metodología será de gran utilidad para determinar la situación epidemiológica del cancro de la soja en la Argentina y, por consiguiente, cuáles deberán ser las tareas en las que se deberá poner énfasis a corto, mediano y largo plazo en términos de mejoramiento y manejo del cultivo.

En la actualidad existen numerosas tecnologías que se comparan favorablemente con las técnicas tradicionales de PCR (PCR en tiempo real, PCR digital, microarreglos, etc). Sin embargo, la inversión inicial en equipamiento dificulta en gran medida la implementación de estas aproximaciones en laboratorios de diagnóstico individuales. Las características de la aproximación de PCR-RFLP hacen que este tipo de metodologías sean relativamente sencillas de incorporar por parte de laboratorios individuales, o bien grupos de laboratorios o asociaciones de productores en diferentes puntos de la región sojera argentina. El diagnóstico del

complejo *Diaporthe/Phomopsis* en soja representa, en este sentido, un ejemplo de la potencialidad del análisis molecular tanto en fitopatología como en otras áreas del quehacer agronómico.

Los métodos de reconstrucción de relaciones filogenéticas utilizados (NN, MV) muestran un altísimo nivel de soporte para la separación de *Dpm* y *Dpc*. En igual sentido, existe una diferencia muy importante (un orden de magnitud) en los coeficientes de distancia inter e intragrupo para ambos agrupamientos. Estos resultados parecen sumarse al hecho de que dentro del germoplasma de soja se han encontrado genes de resistencia para *Dpm* pero no para *Dpc*; la teoría "gen x gen" (Flor, 1971) propone que para cada gen de virulencia en el patógeno existe un gen de resistencia en el hospedante. Si *Dpm* y *Dpc* fueran entidades de la misma especie, los genes mayores de resistencia a *Dpm* deberían tener algún efecto en el comportamiento de los genotipos de soja frente a al menos algunos aislamientos de *Dpc*. Esta situación no se verifica en absoluto en el germoplasma comercial de soja hasta ahora analizado, y lo observado en todos los lotes de producción en la Argentina (Lago, 2010, Grijalba, 2011).

En conjunto, estos datos apoyan la idea de que *Diaporthe meridionalis* y *Diaporthe caulivora* son entidades biológicamente aisladas y, por lo tanto, debieran considerarse especies separadas tanto a nivel taxonómico como en su nomenclatura. En este momento nuestro laboratorio está llevando adelante estudios complementarios para corroborar y asignar valores de significación estadística a esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

- BRYANT, D.; MOULTON, V., 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* 21, 255–265
- CHEN, W.D.; GRAY, L.E.; GRAU, C.R. 1996. Molecular differentiation of fungi associated with brown stem rot and detection of *Phialophora gregata* in resistant and susceptible soybean cultivars. *Phytopathology* 86:1140-1148.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. 1977. Stages of soybean development. *Iowa Agr. Exp. Stn. Spec. Rep.* 80. 11 pp.
- FERNÁNDEZ, F.A.; HANLIN, R.T. 1996. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia* 88(3): 425-440.
- FLOR, H.H. 1971. Flor H. H (1971). *Annual Review of Phytopathology* 78, 275-298.
- GOODWIN, P.H.; KIRKPATRICK, B.C., DUNOWAY, J.M. 1989. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 79:716-721.
- GRIJALBA, P.E.; MARINO, S. 2001. Cancro del tallo de la soja: patogenicidad, prueba de algunos cultivares de soja y de hospedantes alternativos. *Revista Facultad de Agronomía* 21(1): 55-59.
- GRIJALBA P.E.; GULLIN E. 2005. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* en Buenos Aires. En proc.: XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Córdoba, Argentina. p. 428.

- GRIJALBA, P.E.; GUILLIN, E. 2007. Occurrence of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in the southern part of Buenos Aires province, Argentina. *Australian Plant Disease Notes*. 2: 65-66.
- GRIJALBA, P.E. 2011. Variabilidad morfológica, genética y patológica de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* causante del cancro del tallo de la soja en la provincia de Buenos Aires. Tesis Magister Scientiae en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 66 p.
- HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (EDS.). 1999. 4th. Ed. *Compendium Soybean Diseases*. APS Press. Inc., St. Paul, MN, 100 pp.
- HUSON D. H.; BRYANT D. 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254-267 (<http://www.splitstree.org/> Verificado: 20 de abril de 2011)
- LAGO M.E. 2010. Etiología y Aspectos Epidemiológicos del Cancro del Tallo de la Soja en el Centro y Sudeste Bonaerense. Tesis Magister Scientiae en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 87 p.
- LAGO, M. E.; RIDAO, A. DEL C.; SANMARTINO, S. 2007. Prevalencia e incidencia del cancro del tallo de la soja en el SE de la provincia de Buenos Aires., Argentina. *Fitopatología Brasileira* 32. Suplemento pp. 311.
- LAYON M. 2000. GeneTool 1.0. *Biotech Software and Internet Report* 1 (6): 261-264.
- MORGAN JONES, G. 1989. The *Diaporthe/Phomopsis* Complex: Taxonomic considerations. En: *Actas IV Conf. Mundial de Investig. en soja, Bs. As., Argentina*. 1699-1715.
- PIOLI, R.N.; MORANDI, E.N.; BISARO, V. 2001. First report of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. *Plant Disease* 85(1): 95.
- PIOLI R.N.; MORANDI E.N.; MARTINEZ M.; TOZZINI A.; BISARO V.; HOPP E. 2003 Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argenti *Current Microbiology* na. *Phytopathology* 93: 136-146.
- PIOLI, R.N.; CAIRO, C.; MORANDI, E.N. 2005. Prevalence of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* as causal agent of soybean stem canker in Argentina. *Biocell* 29 (1): 141.
- PLOPER, L.D. 2004. Economic importance and control strategies for the major soybean diseases in Argentina. *Proceedings VII World Soybean Research Conference. IV International Soybean Processing and Utilization Conference. III Congreso Brasileiro de Soja. Foz do Iguasu. PR, Brazil*. pp. 606-614.
- PLOPER, L.D.; GONZALEZ, V.; SALAS, G.; DEVANI, M. 1997. Cancro del tallo: importante enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial* 69: 3-7.
- RIDAO, A. del C.; PEREYRA IRAOLA, M.; PAGANI, A.; BODEGA, E; AZPEITIA, M.; ROSS, F. 2005. Situación actual de las principales enfermedades de soja en el sudeste de Bs As. Resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la AAF. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. pp.456.
- RIDAO, A. del C.; LAGO M.E. 2007. "Cancro del tallo de la soja". *Visión Rural* XIV (68): 56-57. ISSN 0328-7009.
- SAITOU, N., and NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- TAMURA K.; DUDLEY J.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- VECHIATO M.H.; MARINGONI A.C.; MARTINS E.M.F.; KOSHARA E.Y. 2003. Caracterizacáo de aislados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo*. 70 (2): 159-167.
- WHITE T.J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J.W. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York. Academic Press. pp. 315-322.
- YORINORI, J.T. 1991. Distinction between pod and stem blight and stem canker Phomopsis on soybean seeds by the blotter test. *Fitopatol. Brasil*. 16:37. (In Portuguese.)
- YORINORI, J.T. 1996. Cancro da haste da soja: Epidemiologia e controle. *Circ. Tecnica N.º 14*. Embrapa. Londrina. 75 pp.
- YOUNG H.C. 1943. The toothpick method of inoculating corn for ear and stalk rots. *Phytopathology* 33: 16 (Abstr.).
- ZHANG A.W.; HARTMAN G.L.; RICCIONI L.; CHEN W.D.; MA R.Z.; PEDERSEN W.L. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease* 81(10): 1143-1149.
- ZHANG A.W.; HARTMAN G.L.; CURIO-PENNY B.; PEDERSEN W.L.; BECKER K.B. 1999. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology* 89(9): 796-804.