



INFORME BREVE

Validación de una técnica de Dot blot para la detección de *Cercospora kikuchii* en plantas de soja



Mónica C. Mattio, María V. Peretti Canale, María C. Lurá y María G. Latorre Rapela*

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Santa Fe, Pcia. de Santa Fe, Argentina

Recibido el 1 de marzo de 2017; aceptado el 17 de junio de 2017

Disponible en Internet el 20 de noviembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Dot blot;
Cercospora kikuchii;
Validación

KEYWORDS

Dot blot;
Cercospora kikuchii;
Validation

Resumen *Cercospora kikuchii*, fitopatógeno usual en plantas de soja, ocasiona deterioro en las cosechas. Su identificación precoz y correcta evitaría el uso indebido de plaguicidas y permitiría iniciar un tratamiento adecuado. Una técnica rápida, económica y de fácil ejecución es el *Dot blot*, capaz de reconocer la presencia de una proteína específica del género conocida como CFP (Cercosporin Facilitator Protein). El objetivo de este trabajo fue validar dicha técnica para garantizar la fiabilidad del resultado. Para ello, se procesaron 29 plantas de soja infectadas y 31 plantas sanas teniendo en cuenta una confianza deseada del 95% y un error permitido del 5%. La técnica presentó una sensibilidad diagnóstica del 93,3% y una especificidad diagnóstica del 96,7%. La eficacia fue del 95% y los valores predictivos positivo y negativo del 96,6 y el 93,5%, respectivamente. Estos resultados la postulan como una herramienta útil para detectar precozmente *c. kikuchii* en plantas de soja.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Validation of the technique based on Dot blot for the detection of *Cercospora kikuchii* in soybean plants

Abstract *Cercospora kikuchii* is a common pathogen in soybean plants that causes crop spoilage. Its early and precise identification would prevent the misuse of pesticides and allow the initiation of an appropriate treatment. A quick, economical and easy-to-execute technique is the *Dot blot*, capable of recognizing the presence of a genus-specific protein called CFP (Cercosporin Facilitator Protein). The objective was to validate this technique to guarantee the

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: latorrerapela@gmail.com (M.G. Latorre Rapela).

reliability of the results. For that purpose, 29 infected soybean plants and 31 healthy plants were processed, taking into account a 95% desired confidence level and a permissible error of 5%. The technique provided a diagnostic sensitivity of 93.3% and a diagnostic specificity of 96.7%. The efficiency was 95% and positive and negative predictive values were 96.6% and 93.5%, respectively. These results postulate it as a useful resource for the early detection of *C. kikuchii* in soybean plants.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

En Argentina, la soja es el principal producto de la agricultura nacional². Sin embargo, su cultivo se encuentra limitado por las enfermedades de fin de ciclo (EFC) debido a que estas provocan madurez anticipada de la planta y reducción del rendimiento o de la calidad de las semillas, lo que genera graves deterioros en las cosechas y pérdidas en la producción¹². Entre las EFC que presentan mayor prevalencia e incidencia en las principales áreas sojeras del país se encuentra el tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla, enfermedad ocasionada por el hongo *Cercospora kikuchii*³.

La patogenicidad de este hongo se asocia a la producción de la exotoxina cercosporina, responsable de muchos de los síntomas de la enfermedad. La cercosporina ha sido aislada *in vitro* de al menos 34 especies de *Cercospora*, entre las que se encuentra *Cercospora sojina*. La producción y la exportación de cercosporina hacia el exterior del hongo están reguladas por la expresión del gen *cfp*, que codifica la proteína denominada *Cercosporin Facilitator Protein* (CFP)¹.

Debido a que este patógeno se encuentra presente en estadios tempranos del cultivo en forma latente y asintomática, resulta indispensable disponer de métodos de diagnóstico precoces y certeros, que contribuyan a generar medidas de control efectivas, para optimizar los recursos y reducir los efectos negativos sobre el medio ambiente por el uso indebido de plaguicidas. Asimismo, dichos métodos permitirían originar información respecto de la interacción patógeno-hospedante⁸.

Hasta el momento, no existen en el mercado métodos de detección temprana de este patógeno. En la actualidad, su diagnóstico se realiza cuando la planta ya presenta los síntomas característicos en las etapas avanzadas, utilizando métodos tradicionales (aislamiento, cultivo del hongo, observación de características macro y microscópicas) que requieren de personal especializado y prolongados períodos de tiempo (semanas).

Por ello, el desarrollo de un método de detección precoz de *Cercospora* en plantas de soja es de gran necesidad. Entre las principales técnicas disponibles que permiten complementar o reemplazar los procedimientos de laboratorio tradicionales se encuentran las inmunológicas y las moleculares⁸.

Latorre Rapela⁷ desarrolló y optimizó un método de detección precoz para el género *Cercospora*, capaz de reconocer la presencia de la proteína CFP, específica del género. Dicho método es muy versátil y aplicable al diagnóstico de

un gran número de muestras y se basa en la técnica de *Dot-enzyme linked immunosorbent assay* (Dot-ELISA). Esta metodología consiste en un ELISA rápido, que utiliza como soporte sólido papel de nitrocelulosa, caracterizado por su excelente capacidad para adsorber proteínas¹³.

Para su correcta aplicación, debe efectuarse su validación diagnóstica, evaluando dicha metodología en un número considerable de plantas de soja enfermas y sanas, según el intervalo de confianza (IC) deseado y el error estimado. Entre los principales indicadores estadísticos se deben determinar la sensibilidad y la especificidad, la eficacia y los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN)⁴.

El objetivo del presente trabajo fue validar la técnica de Dot blot para la detección precoz de *C. kikuchii* en plantas de soja, desarrollada previamente en el laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Para tal fin, se trabajó con 29 muestras positivas (hojas de plantas infectadas experimentalmente con *C. kikuchii* NBRC 6711, cepa perteneciente a la colección japonesa NITE Biological Resource Center [NBRC]) y con 31 muestras negativas (hojas de plantas sanas), acorde con lo establecido para una sensibilidad diagnóstica (DSe) y especificidad diagnóstica (DSp) estimada del 98%, con una confianza deseada del 95% y un error permitido del 5%⁶.

Las muestras positivas se obtuvieron a partir de plantas de soja cultivadas e inoculadas bajo condiciones de crecimiento controladas. El cultivo de las plantas se llevó a cabo utilizando semillas RAS16, grupo de madurez 5, que a simple vista no presentaban daño mecánico por almacenamiento o enfermedad. Para el pregerminado de las semillas, estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5% y luego se colocaron en bandejas plásticas que contenían papel de filtro embebido en agua sobre una capa de algodón, a fin de mantener las condiciones de humedad apropiadas. Estas bandejas se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad continua a una temperatura de $25 \pm 0,2$ °C durante 96 h, en una incubadora modelo i-501PF (INGELAB, Argentina). Luego, las semillas pregerminadas se dispusieron en macetas plásticas de 300 ml, estas macetas contenían tierra-arena-vermiculita en proporción 2:1:1, a 1,5 cm de la superficie. Las plantas continuaron su desarrollo en la incubadora bajo condiciones alternadas de luz (16 h luz/8 h oscuridad), a la temperatura ya citada, y durante su crecimiento fueron fertilizadas con solución de Hoagland o solución nutritiva de Jensen¹¹. Una

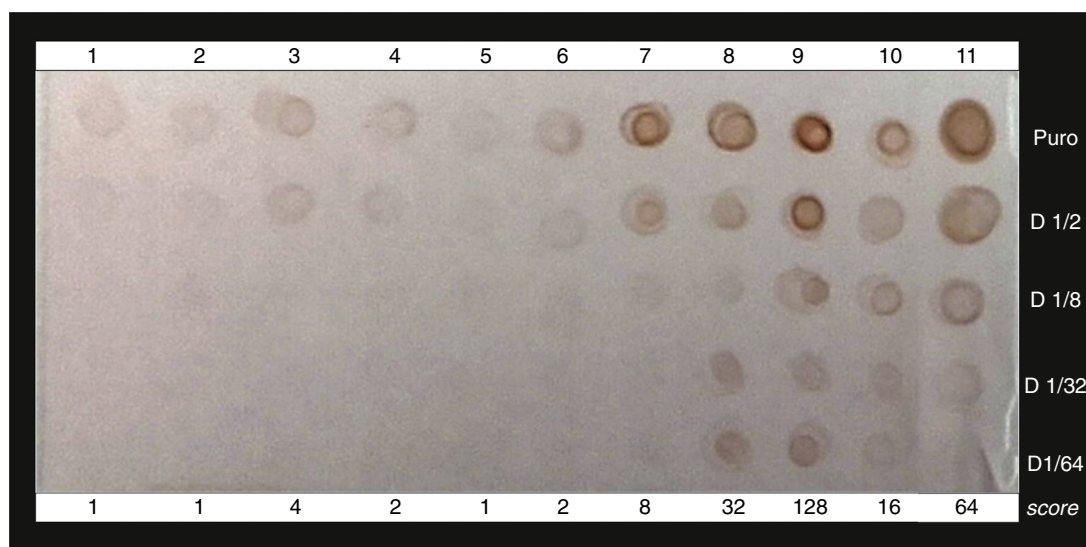


Figura 1 Dot blot aplicado a extractos de plantas sanas e infectadas con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. Calles 4, 5 y 6: plantas sanas. Calles 7, 8, 9 y 10: plantas inoculadas con la cepa de referencia *C. kikuchii* NBRC 6711. Calle 1: control negativo (extracto de *Penicillium* sp.). Calle 2: control negativo (extracto de *Alternaria* sp.). Calle 3: falso positivo. Calle 11: control positivo (extracto de *C. kikuchii* NBRC 6711).

vez que las plantas alcanzaron el estado fenológico V3, se inocularon con una suspensión de *C. kikuchii* NBRC 6711.

Para la preparación del inóculo, el hongo se sembró en 5 tubos que contenían agar papa dextrosa; estos se incubaron durante 4 días a $25 \pm 0,2$ °C, bajo ciclos alternados de luz (16 h luz/ 8 h oscuridad). Transcurrido dicho tiempo, se agregaron 5 ml de agua destilada estéril a cada tubo y se procedió a desprender las estructuras fúngicas mediante un raspado suave de la superficie del cultivo con ansa. La suspensión se cuantificó mediante un recuento en placa en superficie y la concentración del inóculo se ajustó en 10^4 UFC/ml.

Para la inoculación se seleccionaron las hojas trifoliadas correspondientes al primer y segundo par de hojas completamente desplegadas. Se asperjaron con un volumen de 2,5 ml del inóculo por planta, humedeciendo ambas caras de las hojas. Luego, se cubrieron con bolsas plásticas transparentes y perforadas, previamente humedecidas en su interior, y así se mantuvieron durante 24 h a fin de proveer las condiciones de humedad y mojado foliar adecuadas para estimular el proceso de infección⁷.

Una vez inoculadas, las plantas se colocaron nuevamente en la incubadora manteniendo las condiciones de temperatura y ciclos de luz/oscuridad empleados para su crecimiento.

Transcurridos 4 días, se recolectaron las hojas trifoliadas y se lavaron 3 veces con agua estéril para eliminar restos de inóculo adheridos a la superficie foliar. Se observaron a simple vista en busca de lesiones macroscópicas y con lupa estereoscópica (BOECO Germany) en busca de lesiones no visibles a simple vista. Las zonas de tejido lesionado se cortaron con un bisturí y, posteriormente, se realizó la extracción de las proteínas totales siguiendo el método propuesto por Rollins et al.¹⁴.

El tiempo de muestreo de 4 días se seleccionó teniendo en cuenta los resultados logrados por Latorre Rapela⁷, y la técnica de Dot blot se llevó a cabo según el diseño previamente

descrito por este mismo autor. A modo de resumen, sobre una membrana de nitrocelulosa se depositaron los extractos proteicos solubles puros y cantidades decrecientes de aquellos (1/2, 1/8, 1/32 y 1/64). Posteriormente, la membrana se secó a temperatura ambiente y se bloqueó con solución salina de fosfatos (PBS)-leche 5%. Después de 3 ciclos de lavado con PBS-Tween 20 (PBS-T) durante 5 min, se incubó con suero de conejo anti-CFP diluido 1/500 en PBS-leche al 1%. Luego de una nueva etapa de lavado (3 veces), se incubó con suero anti-IgG total de conejo conjugado con peroxidasa, diluido 1/500 con PBS-leche al 1%. Tras otra etapa de lavado (3 veces), se agregó como reactivo revelador una solución de tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno (Invitrogen Argentina S.A.). La reacción se detuvo con una etapa de lavado con agua. Todos los pasos de incubación se realizaron en agitación moderada. Como control positivo se utilizó el extracto proteico de *C. kikuchii* NBRC 6711 y como controles de especificidad de género, los extractos proteicos de *Penicillium* sp. y *Alternaria* sp.

Para facilitar la lectura visual y disminuir la subjetividad de las observaciones, se estableció un *score* o puntaje asignando valores a las señales obtenidas y multiplicándolos entre sí. Cada señal obtenida sobre la membrana se consideró que tenía una base numérica igual a 4, 2 o 1, dependiendo de si la señal era muy fuerte, tenue/baja o no visible, respectivamente. Luego, los puntajes asignados a cada una de las 5 observaciones correspondientes a cada muestra (la original y sus 4 diluciones) se multiplicaron y el resultado se consideró su *score* final. Por ejemplo, en la [figura 1](#), para la muestra correspondiente a la calle 7, el *score* se determinó de la siguiente manera, $4 \times 2 \times 1 \times 1 \times 1 = 8$.

Se definió una línea de corte a través de la curva ROC utilizando el programa MedCalc y se consideró un *score* ≤ 2 para las plantas sanas y uno ≥ 4 para las plantas enfermas. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una

Tabla 1 Tabla de contingencia de presencia de enfermedad por técnica diagnóstica

	Síntomas típicos		Total
	Presencia	Ausencia	
<i>Dot blot</i>			
Positivo	28	1	29
Negativo	2	29	31
Total	30	30	60

tabla de contingencia de las variables enfermedad y técnica de detección o de diagnóstico¹⁰.

Los parámetros de validación evaluados fueron:

- $DSe = VP / (VP + FN)$.
- $DSp = VN / (VN + FP)$.
- Eficacia = $(VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$.
- $VPP = VP / (VP + FP)$.
- $VPN = VN / (VN + FN)$.

El VP correspondió al número de los verdaderos positivos, el VN al de los verdaderos negativos, el FP al de los falsos positivos y el FN al de los falsos negativos.

Se calcularon los intervalos de confianza para la DSe y DSp empleando las ecuaciones 1 y 2, considerando una confianza del 95%:

$$IC_{95\%}(DSe) = DSe \pm 1,96 \sqrt{\frac{DSe(1-DSe)}{VP+FN}} \quad (1)$$

$$IC_{95\%}(DSp) = DSp \pm 1,96 \sqrt{\frac{DSp(1-DSp)}{FP+VN}} \quad (2)$$

A manera de ejemplo, se muestra en la figura 1 el Dot blot aplicado a extractos de plantas sanas e infectadas con *C. kikuchii* NBRC 6711.

De las 29 muestras de plantas enfermas analizadas, solo 2 presentaron un score ≤ 2 , lo que indica que hubo solo 2 falsos negativos con este método, y de las 31 muestras de plantas sanas, solo una arrojó un resultado falso positivo, al presentar un score ≥ 4 (fig. 1, calle 3), estos resultados se volcaron en la tabla 1.

Con los resultados obtenidos se calcularon luego los parámetros de validación antes mencionados, que se expresan en la tabla 2.

Las estimaciones de la DSe (proporción de plantas que se sabe que están infectadas y que dan positivo en una prueba) y de la DSp (proporción de plantas que se sabe que no están infectadas y que dan negativo en una prueba) son los indica-

Tabla 2 Calidad de la detección con la técnica propuesta

Parámetros de validación	
Sensibilidad diagnóstica	93,3% (IC _{95%} = 84,4-100)
Especificidad diagnóstica	96,7% (IC _{95%} = 90,3-100)
Eficacia	95,0%
Valor predictivo positivo	96,6%
Valor predictivo negativo	93,5%

IC_{95%}: intervalo de confianza del 95%.

dores principales del rendimiento durante la validación de una prueba⁵.

La técnica de Dot blot empleada presentó una DSe del 93,3% (IC_{95%} = 84,4-100) y una DSp de 96,7% (IC_{95%} = 90,3-100), valores inferiores al 98% estimado. Sin embargo, dichos valores sí están comprendidos dentro del IC seleccionado para la validación de la técnica (95%).

Estas estimaciones son la base del cálculo de otros parámetros, como los VPP y los VPN, a partir de los cuales se realizan inferencias sobre los resultados de la técnica⁵. El VPP del 96,6% y el VPN del 93,5% indican que la probabilidad de que la planta esté realmente infectada (VPP) o realmente sana (VPN) es muy alta cuando se aplica esta técnica diagnóstica y los scores antes señalados.

La eficacia de la prueba fue del 95%, lo que revela que la probabilidad de que el patógeno sea detectado correctamente es también elevada¹⁵.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Peretti Canale et al.¹¹ para la técnica de PCR, se puede observar que ambas metodologías presentaron parámetros de validación similares. No obstante, el Dot blot es una prueba de diagnóstico económica y de fácil ejecución en laboratorios de baja complejidad¹³. Al generar un precipitado coloreado, también podría ser utilizada en el campo como un método de *screening*⁹, sin la necesidad de disponer de equipos específicos.

Por lo tanto, el método de Dot blot descrito y validado es una metodología útil para la detección de *C. kikuchii* en plantas de soja, ya que ofrece resultados positivos y negativos que permiten confirmar o descartar la presencia de este patógeno con un elevado nivel de confianza en etapas tempranas de infección.

Además, esta metodología podría ser utilizada para la detección de otras especies de *Cercospora* productoras de cercosporina, como es el caso de *C. sojina*. Cabe destacar que durante la optimización del método, Latorre Rapela obtuvo similares resultados para ambas especies⁷.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo son los primeros de su tipo en Argentina para el diagnóstico de esta importante enfermedad de fin de ciclo de la soja y brindan la posibilidad de contar con una valiosa herramienta para el perfeccionamiento de los procedimientos fitosanitarios actuales, ya que el diagnóstico precoz de las enfermedades, de forma rápida y precisa, evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos como plaguicidas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto CAI + D 2011, financiado por Universidad Nacional del Litoral, Argentina y del Proyecto Federal de Innovación Productiva PFIP 2009-1 evaluado/financiado por COFECYT.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Roxana Maumary por la desinteresada provisión de las semillas utilizadas.

Bibliografía

- Callahan TM, Rose MS, Meade MJ, Ehrenshaft M, Upchurch RG. CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *Mol Plant Microbe Interact.* 1999;12:901–10.
- Calzada J. Argentina y su posicionamiento en el mercado mundial de granos, aceites y subproductos. *Informativo semanal BCR.* 2014;1687:5–7.
- Distefano SG, Gadban LC, Lenzi LG. Panorama fitopatológico del cultivo de soja. Campaña 2013/14. *Agrositio.* [On-line] 2014 [consultado 07 Dic 2015]. Disponible en: <http://www.agrositio.com/vertex/vertex.php?id=159081&se=1000>
- Iglesia A, Díaz A, Peralta EL. Validación de métodos inmunológicos para el diagnóstico de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. *Rev Prot Veg.* 2002;17:20–4.
- Jacobson RH, Wright P. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: *OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*, editores. París: OIE Biological Standards Commission; 2008. p. 34–45.
- Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech.* 1998;17:469–526.
- Latorre Rapela MG. Diversidad mofo-genética de *Cercospora* en soja. Detección precoz de la infección por *C. kikuchii*. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas 2013. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-Universidad Nacional del Litoral.
- Macías Figueroa OL, Delgado Calvo Y, Peña Marrero E, Betancourt RL, Barreto RE. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos 2006. Matanzas, Cuba, p. 30 [on-line] [consultado 23 Ene 2016]. Disponible en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2006/Agronomia/Tcnicas%20para%20el%20diagnostico%20y%20determinacin%20de%20variabilidad%20genetica%20de%20fitopatgenos.pdf>
- Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: Old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:278246.
- Olmos Castelló A, Bertolini E, Cambra, Álvarez M. Validación de métodos de detección y diagnóstico de patógenos y costes de la especificidad y sensibilidad. *Boletín Informativo de la SEF.* 2008;63:7–11.
- Peretti Canale MV, Mattio MC, Lurá MC, Latorre Rapela MG. Validación de un método de detección precoz de *Cercospora* en plantas de soja basado en una técnica de PCR. *Rev FABICIB.* 2015;19:55–64.
- Pérez Fernández J, Figueruelo AM, Lejarraga MB. Soja: resultados del control de enfermedades de fin de ciclo. EEA INTA, Anguil. 2005. p. 9 [On-line] [consultado 25 Ene 2016]. Disponible en: <http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publi61.pdf>
- Piña RR, Gutiérrez AH, Gilman RH, Rueda D, Sifuentes C, Flores M, Sheen P, Rodríguez S, García HH, Zimic M. A Dot-ELISA using a partially purified cathepsin-L-like protein fraction from *Taenia solium* Cysticerci, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011;105:311–8.
- Rollins JA, Ehrenshaft M, Upchurch RG. Effects of light- and altered-cercosporin phenotypes on gene expression in *Cercospora kikuchii*. *Can J Microbiol.* 1993;39:118–24.
- Ruiz de Adana Pérez R. Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. *JANO.* 2009;1736:30–2.