

# FITOPATOLOGÍA MOLECULAR: MECANISMOS Y APLICACIONES

acción, empleados en su control en trigo. Se trata de herbicidas inhibidores de la enzima Acetil coenzima A carboxilasa (afectan la biosíntesis de ácidos grasos), entre los cuales están diclofop y clodinafop; inhibidores de la enzima ácido acetohidroxi sintasa o acetolactato sintasa (afectan la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada) como iodosulfuron y flucarbazone; y del grupo de la glicina (glifosato, como principal representante) que inhiben la enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintasa (afectan la síntesis de aminoácidos aromáticos).

## El diagnóstico molecular, ventajas y beneficios

Tradicionalmente la determinación de biotipos R se ha realizado mediante laboriosas pruebas con plantas en maceteros. La metodología, aunque efectiva, por lo general no logra ofrecer respuestas en la misma temporada de desarrollo del cultivo y no permite dar servicio directo al agricultor.

Afortunadamente en Chile, después de amplias prospecciones, se ha determinado que muchos biotipos presentan la capacidad de resistir a los herbicidas estudiados por el mecanismo asociado al sitio de acción, es decir debido a mutaciones o sustituciones aminoacídicas que originan cambios estructurales en el sitio de unión de la molécula herbicida y la proteína blanco en la planta. Lo anterior abre una ventana importante para ofrecer respuestas rápidas mediante el empleo de herramientas basadas en la tecnología del ADN y parti-

cularmente mediante la técnica conocida como PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Existen muchos procedimientos del PCR. Entre otros, se ha evaluado la detección mediante:

- PCR-alelo específico: permite discriminar entre el alelo mutado del gen y el normal, mediante el diseño de partidores específicos.
- CAP-PCR: amplificación del fragmento de ADN donde está presente la mutación. Luego se corta con enzimas restricción para discriminar entre el alelo mutado y el normal o sensible
- dCAP-PCR: variante del método anterior, donde se crea artificialmente un sitio de reconocimiento para una enzima, para luego cortar y discriminar entre el alelo mutado y el normal.

La evaluación de la reproducibilidad, robustez y costo ha llevado a elegir uno de ellos, el que prontamente se ofrecerá como un servicio de diagnóstico y será, sin duda, una importante herramienta de apoyo para los agricultores.

Este moderno servicio requerirá tejido foliar de un número representativo de plantas que estén infestando un campo de cultivo. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, se procederá a partir del ADN y a determinar la presencia o ausencia de mutaciones que confieran resistencia a algunos herbicidas. La ejecución no superará las 48 horas, lo cual permitirá al agricultor tomar de forma inmediata una acción correctiva si el diagnóstico resulta positivo. **Ta**

**Marlene Rosales V.**  
mrosales@inia.cl

**Elizabeth Peña  
Claudia Medina  
Roxana Mora  
Carolina Araya**

INIA La Platina

de la polimerasa" y su capacidad de amplificar el ADN blanco millones de veces.

Gracias a la genómica y la bioinformática, en el futuro cercano se espera una nueva revolución tecnológica, la que permitirá una detección ilimitada de agentes por ensayo, con gran sensibilidad, exactitud y rapidez.

## Aplicaciones en los programas de INIA

Uno de los requerimientos más importantes para manejar una enfermedad es la identificación del agente que la causa (fitopatógeno). En algunos casos puede hacerse por medio de una examinación visual, pero en otros se requieren pruebas de laboratorio. Estos procedimientos a veces toman varios días o semanas, y en ciertas oportunidades no poseen la sensibilidad suficiente para un diagnóstico oportuno.

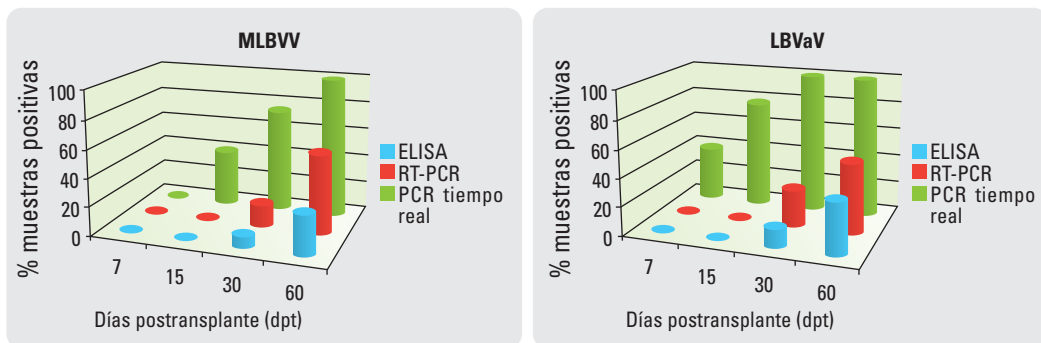
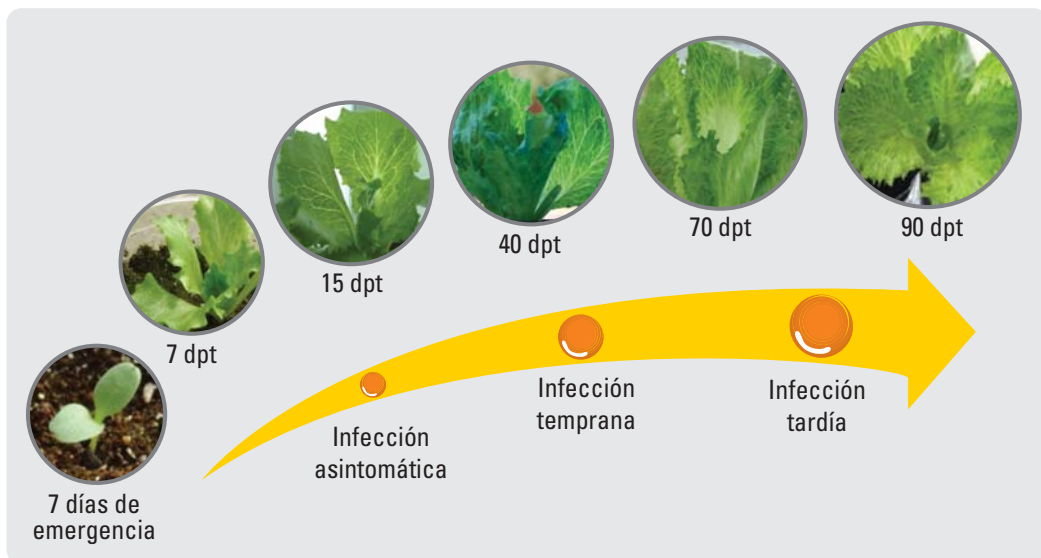
Afortunadamente existen nuevas técnicas biotecnológicas para complementar o reemplazar los procesos tradicionales de laboratorio. Ellas aceleran la obtención de resultados y permiten una identificación más temprana.

Las técnicas moleculares para la detección de fitopatógenos han sido impactadas por dos grandes advenimientos en los últimos 30 años. Primero fue la detección basada en el uso de anticuerpos, con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales y del test de ELISA, avances que influyeron especialmente en la virología y bacteriología. Luego vinieron las técnicas fundadas en la detección de ácidos nucleicos, tales como la "reacción en cadena

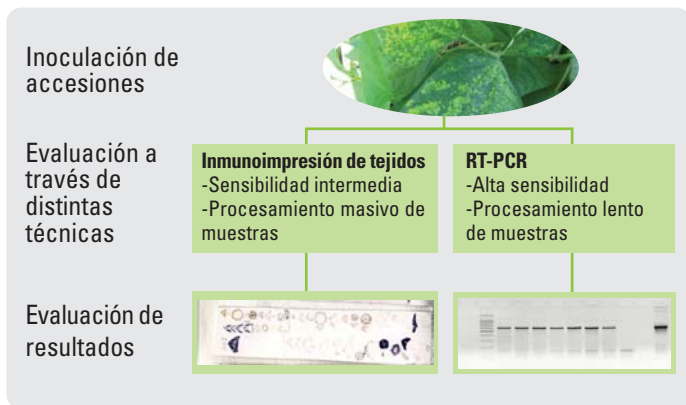
Mediante diversos proyectos, el INIA ha diseñado protocolos y estrategias para diagnosticar distintos patógenos vegetales a través de los estados de desarrollo de una planta.

Un ejemplo es la enfermedad de la vena ancha de la lechuga. Distribuida en todo el mundo, afecta el cultivo al aire libre, en invernaderos y también en sistemas hidropónicos. Está asociada a la presencia de dos virus en la planta, el virus Mirafiori de la vena ancha de la lechuga (MLBVV) y el virus asociado a la enfermedad de la vena ancha (LBVaV).

En laboratorios de INIA se desarrollaron protocolos de diagnóstico para ambos agentes, utilizando distintas técnicas de detección, y se compararon sus eficiencias en términos de sensibilidad. Al hacer el seguimiento de los virus MLBVV y LBVaV por medio de las técnicas moleculares de DAS-ELISA, RT-PCR (transcripción reversa y PCR) y PCR en tiempo real, se pudo observar que antes de los 30 días posttrasplante



**Figura 1.** En la imagen superior se observan los distintos estados de desarrollo en que se midió la presencia de virus. Abajo se grafica el porcentaje de muestras positivas a los virus asociados a la enfermedad de la vena ancha de la lechuga (MLBvV y LBvAv) detectados al utilizar tres técnicas de detección de distinta sensibilidad: ELISA, RT-PCR (transcripción reversa-PCR) y PCR en tiempo real a lo largo de una cinética de infección. Solo PCR en tiempo real es capaz de diagnosticar la presencia de patógenos en etapas tempranas de crecimiento de la lechuga.



**Figura 2.** Esquema de selección de accesiones de poroto pallar (*Phaseolus coccineus* L.) en búsqueda de plantas que presenten un comportamiento tolerante, inmune o resistente a la infección de los agentes virales CMV y AMV.

sólo el PCR en tiempo real posee la sensibilidad suficiente como para detectar a los agentes virales en la planta (figura 1). Por lo tanto, una identificación de estos agentes virales en estados tempranos, como podría ser en un

"speedling", sólo será posible al utilizar técnicas de alta sensibilidad. Resultados similares han sido ya reportados para otros virus en frutales (Tierra Adentro N°81).

Las herramientas descritas también pueden apoyar al mejo-

ramiento genético. Es fundamental conocer la constitución genética de la planta y su reacción a los patógenos al momento de generar nuevas variedades. Las plantas se pueden comportar como resistentes, inmunes, tolerantes o susceptibles frente a los agentes fitopatógenos. Las herramientas moleculares ayudan a conocer estas características, e identifican tempranamente si un microorganismo puede infectar y multiplicarse en un vegetal.

En INIA La Platina se buscan fuentes de resistencia a dos agentes virales que causan pérdidas importantes en el cultivo del poroto (*Phaseolus vulgaris* L.). Distintas accesiones de poroto pallar (*Phaseolus coccineus* L.) se analizan con el fin de encontrar plantas que presenten un comportamiento tolerante, in-

**Glosario:**

**ELISA.** Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Se utiliza para detectar antígenos específicos. Es una técnica rápida, de sensibilidad intermedia, específica, de fácil ejecución. Permite analizar un gran número de muestras a la vez.

**Inmunoimpresión.** Es una versión simplificada de la técnica ELISA. Evita el paso de preparación de extractos vegetales, lo que permite ampliar el número de muestras a procesar y eliminar tanto la contaminación entre muestras como la posibilidad de liberar inhibidores vegetales.

**PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica rápida y económica para hacer un número ilimitado de copias de cualquier fragmento del ADN. Es de mayor sensibilidad que ELISA.

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico, material genético presente en los cromosomas de animales, plantas y algunos virus.

**PCR en tiempo real.** Se conoce también como PCR cuantitativo. Usa del PCR para determinar la cantidad de ADN o ARN en una muestra.

Se agradece a las siguientes fuentes de financiamiento: proyectos FIA-PI-C-2005-1-A-051, Fondecyt de Iniciación N°11060173 e Innova 07CT9PHT-12.

mune o resistente a la infección de los virus CMV (virus del mosaico del pepino) y AMV (virus del mosaico de la alfalfa). Para ello, se han optimizado sistemas que utilizan la técnica cualitativa de inmunoimpresión en membrana de nitrocelulosa y de PCR en la detección de estos agentes virales (figura 2). Los materiales que presenten el comportamiento deseado, serán usados como progenitores en el programa de mejoramiento genético de porotos. **Ta**