

Enfermedades de la madera en frutales: herramientas para un diagnóstico oportuno



Javier Chilian P.
Licenciado en Genética, Dr.
Investigador INIA Quilamapu



Daina Grinbergs S.
Ingeniera Agrónoma, Dra.
Investigadora INIA Quilamapu



Andrés France I.
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.
Investigador INIA Quilamapu



Al crecer dentro de la planta, los hongos que afectan la madera desarrollan enfermedades asintomáticas que, una vez descubiertas, se tornan irreversibles. Al carecer de síntomas visuales externos, las técnicas moleculares son herramientas específicas para el diagnóstico temprano y oportuno de estas patologías.

En las últimas temporadas (7 a 8 años), y en las diferentes prospecciones y evaluaciones de huertos de manzanos, cerezos, ciruelos, arándanos y durazneros, al igual que en las visitas a viveros y productores del rubro frutícola, se ha evidenciado el aumento constante en el número de plantas con enfermedades de la madera.

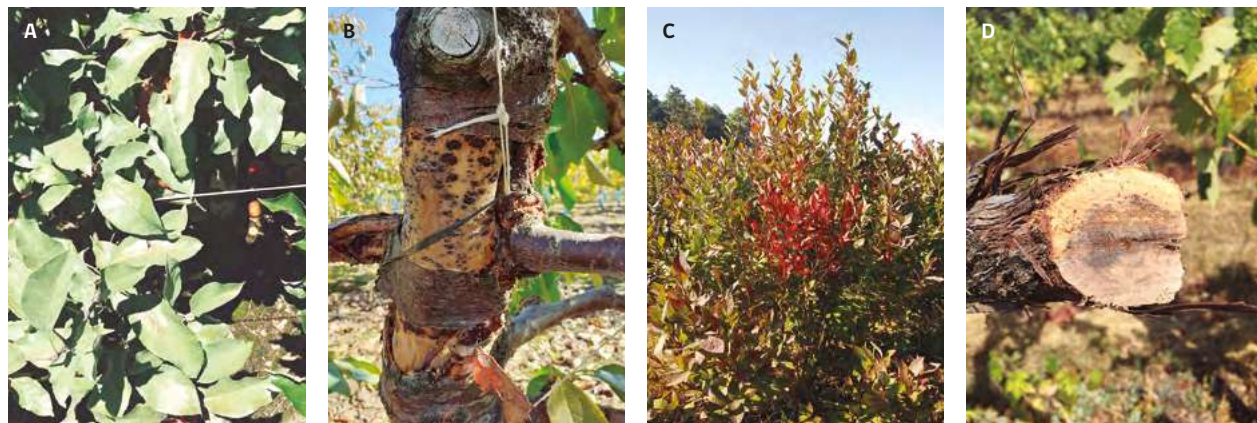
Las razones de ello son variadas y tienen relación con la búsqueda de mayores rendimientos, incorporación de sistemas de producción cada vez más intensivos, nuevas variedades

más susceptibles, huertos con mayor densidad de plantas y muy sobre estimuladas a crecer, excesos de fertilización, y manejos de podas y conducción muy agresivos, todo lo cual genera un incremento en la cantidad de sitios de entrada para los patógenos.

Estos cambios generados en los manejos productivos, sumado al hecho de que se restringió el uso de fungicidas de amplio espectro –que atacaban varios patógenos–, por el impacto negativo que tenían en su entorno, ha traído el resurgimiento

de antiguas enfermedades como el plateado en distintos frutales, *Cytospora* en cerezos, el cancro del cuello en arándano y la cancrrosis de la madera en vides (**FIGURA 1**).

A pesar de que en el mercado existen diversas alternativas químicas para combatir las enfermedades de la madera, ninguna de ellas es 100 % efectiva, debido a que es muy difícil que puedan penetrar al interior de la madera. Ante esta situación, las estrategias de manejo para estas enfermedades deben estar dirigidas a la prevención y el control cultural.



📌 **Figura 1.** Enfermedades de madera: A) Plateado en manzano. B) Cancro común en cerezo. C) Cancro del cuello en arándano. D) Cancrosis de madera en vides.



📌 **Figura 2.** Síntomas de plateado en manzano: A) Desprendimiento de la capa externa de la hoja. B) Necrosis de la madera.

En ese sentido, y considerando que una de las primeras medidas es asegurarse que las plantas con las que se establecerá el huerto no estén infectadas con patógenos de la madera, hace algunos años, a través de proyectos con apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondef), iniciamos trabajos para implementar estrategias de diagnóstico temprano para enfermedades de madera, utilizando como modelo la enfermedad del plateado de los frutales.

Detección y síntomas del Plateado de los frutales

El plateado de los frutales es una enfermedad fungosa causada por el hongo *Chondrostereum purpureum* que ataca a diferentes especies frutales, ocasionando pérdidas de producción y calidad de la fruta. Esta enfermedad se caracteriza por tener un avance relativamente lento, comparado con patógenos foliares. Una vez que este hongo alcanza los haces vasculares de la planta comienza su crecimiento, degradando parte de los tejidos vegetales y comprometiendo el movimiento de agua y nutrientes.

La detección temprana de este patógeno es muy difícil de realizar en las plantas, debido a que inicialmente

no hay síntomas externos, y la productividad aparentemente no se ve afectada. A ello se debe sumar el hecho de que el manchado de la madera, uno de los primeros síntomas de esta enfermedad, se da al interior de las ramas. Bajo estas circunstancias, pueden pasar hasta tres temporadas antes que las plantas enfermas comiencen a evidenciar los síntomas externos. Cuando los productores se dan cuenta que sus plantas están afectadas, normalmente ya está comprometida toda la estructura interna del árbol, lo que se traduce en un menor rendimiento y calidad productiva y, posteriormente, la muerte total o parcial del ejemplar.

Los síntomas de la enfermedad son transversales a todos los frutales. Las plantas afectadas muestran ramas con menor vigor, destacándose el cambio de color de las hojas, las que se tornan de grises a plateadas y se acompañan del desprendimiento de la epidermis -capa externa de la hoja- (FIGURA 2) y la necrosis de la madera. Éstos se evidencian en los cortes transversales y longitudinales como zonas marrones, más o menos difusas, y que parten en forma circular desde el centro de la madera o formando anillos concéntricos (FIGURA 2).

Si bien la necrosis de la madera y el plateado de las hojas son fáciles de identificar, en la práctica es difícil realizar un adecuado reconocimiento

temprano de esta enfermedad. En ausencia de síntomas foliares, la única manera de saber precozmente si el árbol está infectado es cortando la madera, para observar el característico manchado, lo cual es un análisis destructivo e impracticable desde el punto de vista práctico.

Tradicionalmente, las enfermedades de madera son diagnosticadas mediante el aislamiento del patógeno en medio de cultivo y su identificación morfológica, lo que requiere de un período de incubación en medios específicos. La obtención de resultados puede llevar días o incluso semanas y puede dar lugar a falsos negativos, debido al crecimiento excesivo de otros hongos que pueden enmascarar el crecimiento del patógeno primario. Por otro lado, una vez que se obtienen los aislamientos, la identificación precisa de las especies puede ser difícil, debido a la falta de caracteres morfológicos, especialmente con *Chondrostereum purpureum*, ya que la mayoría de los aislamientos generalmente no desarrollan estructuras reproductivas *in vitro*, las que son necesarias para su identificación. Para reducir esta laboriosa tarea y aumentar la precisión y fiabilidad del diagnóstico, se busca implementar técnicas más precisas, como aquellas relacionadas con los métodos moleculares y las técnicas serológicas.

Diagnóstico con PCR

La técnica de PCR es una técnica molecular altamente específica y eficiente que busca poner en evidencia la presencia de material genético (ADN) del patógeno que se estudia. Una vez implementada la técnica en condiciones de laboratorio, se procede al muestreo de distintas especies frutales en huertos comerciales y en plantas madre de diferentes viveros. Para ello, y con la ayuda de un taladro, se extrae aserrín desde las plantas en evaluación. A partir de estas muestras se obtienen los ADN sobre los que se hizo el PCR. Con esta técnica es posible identificar un segmento específico de ADN de *Chondrostereum purpureum* en las distintas especies frutales evaluadas (FIGURA 3).

El análisis a través de esta técnica mostró ser más eficiente que el método tradicional de aislamiento en medio del cultivo. Con el método tradicional se detectó el hongo en el 80 % de los árboles infectados en huertos comerciales y en el 92 % de las plantas de vivero, mientras que con el método basado en PCR se detectó la enfermedad en el 100 % de las muestras. Es importante señalar que un gran porcentaje de las plantas de vivero no presentaban los síntomas externos de la enfermedad, por lo que este método cumpliría con el requisito de diagnosticar de forma temprana la enfermedad. Sumada a esta eficacia, el método molecular demostró ser más rápido, ya que con la técnica de PCR es posible obtener el resultado hasta en un plazo de 12 horas, a diferencia de los días e incluso semanas que pueden necesitarse para la identificación con las técnicas microbiológicas convencionales.

Aunque la técnica de PCR demostró ser eficiente, su aplicabilidad en campo está restringida porque, finalmente, es una técnica destructiva, ya que para diagnosticar la presencia del hongo se debe coleccionar madera desde el centro del tronco, generando un daño en la planta que, aunque pequeño,

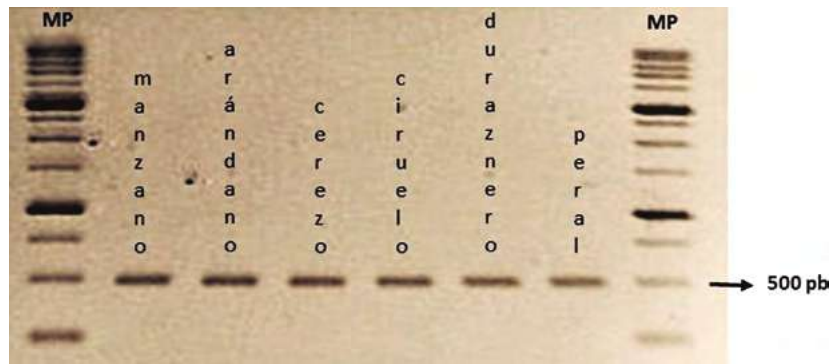


Figura 3. Gel de agarosa mostrando los resultados de una reacción de PCR en diferentes especies frutales en huertos comerciales. Para cada una de las especies indicadas se observa un segmento de 500 pares de bases (pb) del material genético de *Chondrostereum purpureum*. Marcador de peso molecular (MP) indica el número de pares de base que pesa el segmento obtenido.

podría impedir la comercialización o productividad de las mismas.

Diagnóstico con test de ELISA

Durante el proceso de desarrollo de la enfermedad, este patógeno libera una enzima de tipo endopoligalacturonasa (endoPG), la que migra por el tejido xilemático y se acumula en las hojas, lo que termina por producir el desprendimiento de la epidermis de la hoja y la característica coloración plateada de las mismas.

Aprovechando esta característica, trabajos realizados en laboratorios de INIA Quilamapu permitieron avanzar en el desarrollo de un método inmunológico (test de

ELISA) para detectar la presencia de *Chondrostereum purpureum* a través de la cuantificación de esta enzima. Es importante considerar que las plantas enfermas solo manifiestan el cambio de coloración en las hojas cuando han pasado de 2 a 3 temporadas desde el inicio de la infección, que es cuando se produce una acumulación suficiente de la enzima en las hojas como para manifestar el síntoma. Producto de que en el campo pueden encontrarse plantas con distinta coloración de hojas, desde las claramente plateadas (grises) hasta las aparentemente sanas (verdes), se estableció una escala de intensidad de síntomas, asignándose a las distintas hojas una nota de 1 a 9 (FIGURA 4).

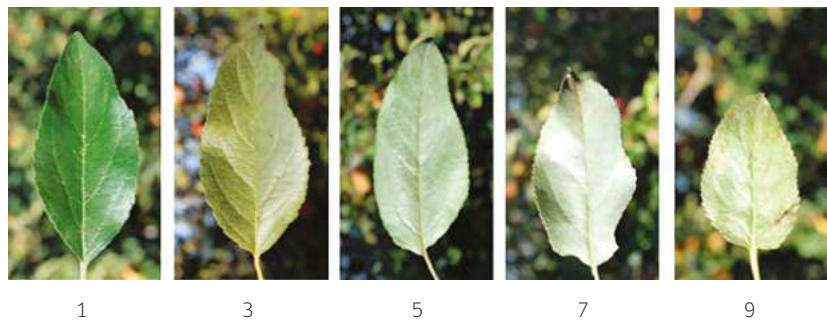
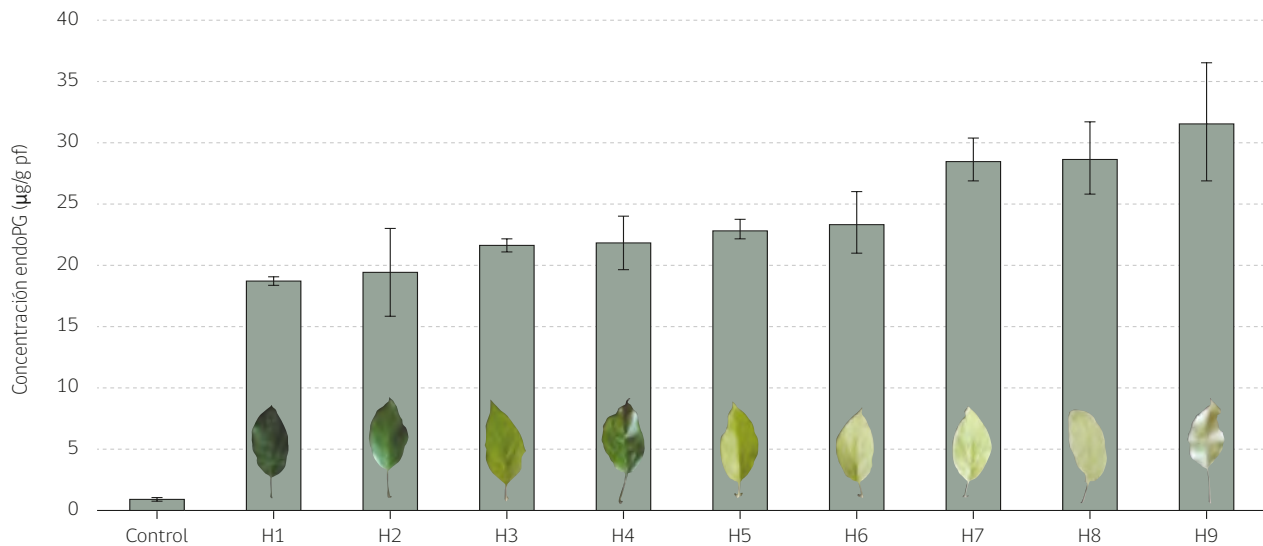


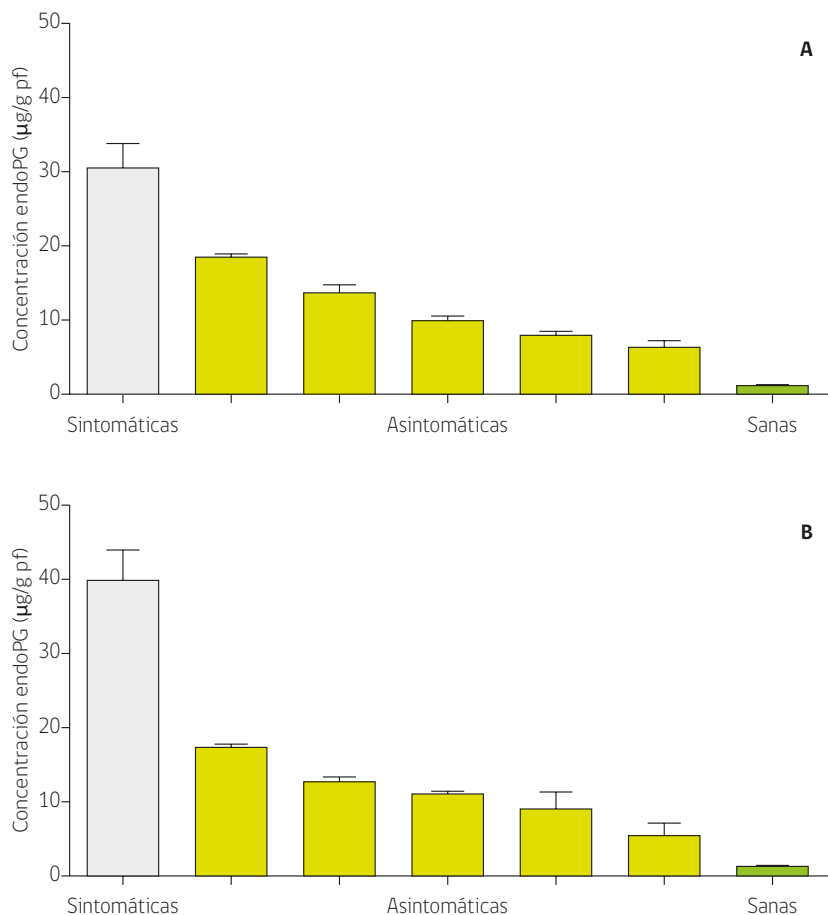
Figura 4. Escala de intensidad de síntomas de plateado en hojas de manzano. En 1 se muestra una hoja sana y en 9 una hoja en un estado muy avanzado de infección.



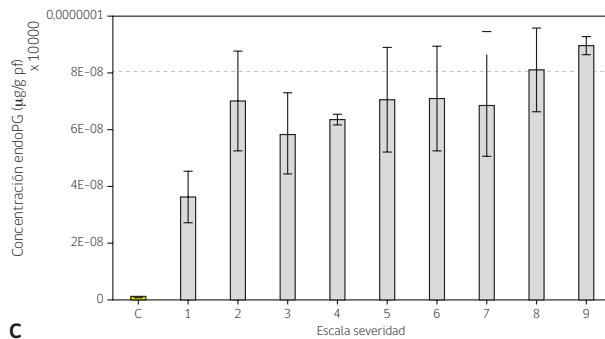
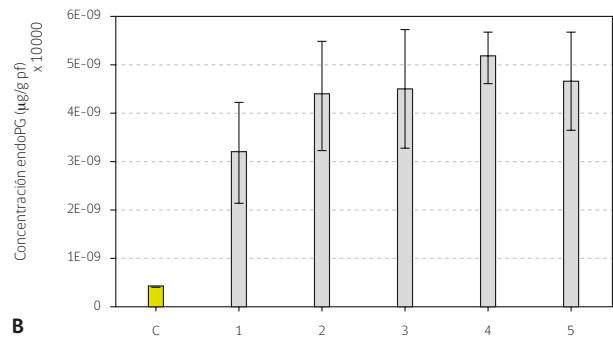
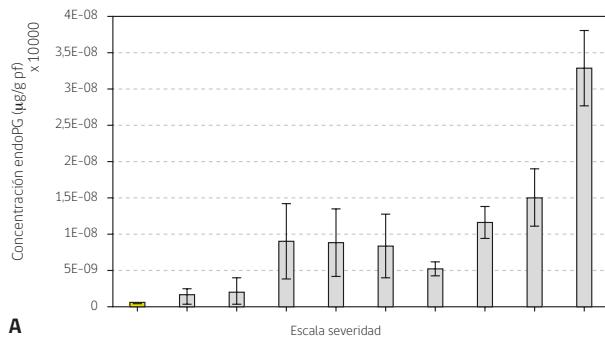
➤ **Figura 5.** Relación entre distintos niveles de intensidad de síntomas de plateado y concentración de endopoligalacturonasa (endoPG) en las hojas.

Una vez establecida la relación entre la concentración de la enzima y la intensidad del color (**FIGURA 5**), se iniciaron las evaluaciones en terreno, cuantificando la concentración de la enzima en diferentes huertos comerciales y en plantas madres en diferentes viveros del centro sur de Chile. Para ello se utilizaron hojas con distinta intensidad de síntomas, así como también hojas sin síntomas provenientes de plantas infectadas, en las que la infección había sido confirmada por técnicas microbiológicas y por PCR. En todos los casos, se utilizaron como controles hojas de árboles sanos mantenidos en condiciones de invernadero.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que, a través de esta técnica, fue posible detectar exitosamente la enzima en las plantas evaluadas en terreno y que la concentración tiene relación con la intensidad del síntoma observado (**FIGURA 5**). Es importante destacar que en las plantas asintomáticas, pero enfermas, los niveles de toxina observados fueron entre un 20 y un 86 % más bajo que los de una planta sintomática, pero todas con valores mayores al nivel basal que se observa en una planta sana (**FIGURA 6**).



➤ **Figura 6.** Concentración de endopoligalacturonasa (endoPG) en plantas de manzano de la variedad Gala Brookfield en: A) un huerto comercial y B) plantas madres de vivero.



➤ **Figura 7.** Concentración de endopoligalacturonasa (endoPG) en hojas de: A) ciruelo variedad D'Agen. B) cerezo variedad Lapins. C) duraznero variedad Royal Glory.

Lo anterior demuestra la sensibilidad y confiabilidad de la prueba para identificar plantas enfermas antes de la aparición de los síntomas foliares. Paralelamente, y como una forma de validar estos resultados, la enfermedad fue comprobada a través de la observación de la necrosis interna de la madera y de la técnica de PCR.

Estos resultados permitieron disponer en el Laboratorio de Fitopatología de Frutales de INIA Quilamapu, de una plataforma de detección inmunoquímica para plateado. Como se muestra en la **FIGURA 7**, los resultados observados

en otros frutales son bastante consistentes con los obtenidos en manzanos.

Si bien hoy en día se cuenta con métodos de detección para determinar si una planta está sana o enferma, sin la necesidad de esperar el desarrollo de síntomas externos, las técnicas implementadas están restringidas a ser efectuadas en laboratorios equipados para esos análisis, además de personal capacitado para realizar las metodologías.

En consideración a ello, y gracias al apoyo de Fondef, en 2019 fue posible desarrollar el prototipo de un

kit de diagnóstico que, por su facilidad de uso y rapidez, permitirá llevar la tecnología del laboratorio al campo, empleando un método no invasivo a través de la detección de la enzima endoPG en hojas por la técnica de ELISA. Esto ayudará a los viveristas a evaluar las plantas madres antes de propagarlas, y a los agricultores a evitar la compra de plantas enfermas antes de establecerlas en el huerto. Todo incidirá positivamente en una mejor toma de decisiones de manejo, en el caso de tener árboles enfermos, pero aún asintomáticos. **TA**