

Desarrollo de un inmunizante microbiano para plantas de manzano



Javier Chilian
Licenciado en Genética, Dr.
Investigador INIA Quilamapu



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



María Eugenia Romero R.
Ingeniera Agrónoma, Dra.
Investigadora INIA Quilamapu



Andrés France I.*
Ingeniero Agrónomo, Dr.
Investigador INIA Quilamapu



* Andrés France se acogió a retiro mandatorio el 28-02-2022.

Este proyecto permitió identificar microorganismos capaces de controlar el plateado del manzano, siendo un potencial modelo para enfrentar una de las más complejas enfermedades de la madera que afecta a las principales especies frutales de Chile.

En los últimos años, las enfermedades de la madera han mostrado una gran expansión, transformándose en uno de los principales problemas que afectan a los huertos frutales, incluso hasta el punto de tener que eliminar plantaciones completas (Figura 1). En la actualidad no existen

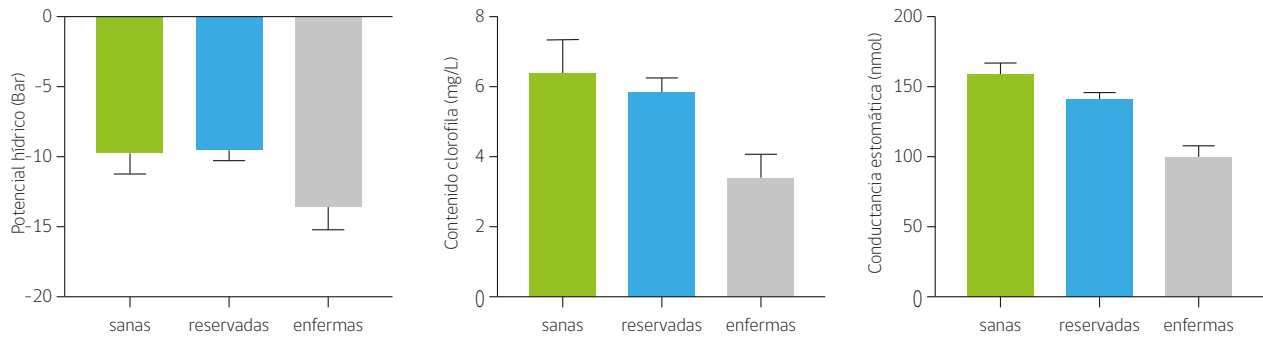
métodos eficaces para el control de estas enfermedades, ya que los agentes patógenos que las ocasionan se desarrollan en el interior de la madera, donde es muy difícil llegar con algún tipo de producto.

Es en este contexto que el Laboratorio de Fitopatología de Frutales de INIA Quilamapu inició,

hace algunos años, una serie de estudios destinados a lidiar con estos patógenos, tomando como modelo la enfermedad del plateado de los frutales, cuyo agente causal es el hongo Basidiomicete *Chondrostereum purpureum*. Las primeras líneas de investigación estuvieron dirigidas a entender la dinámica de esta



➤ **Figura 1.** Especies frutales con madera necrosada por distintos hongos patógenos. (A) Ciruelo. (B) Cerezo. (C) Duraznero. (D) Manzano.



📌 **Figura 2.** Recuperación de parámetros fisiológicos en plantas de manzano, con reversión de síntomas de plateado.

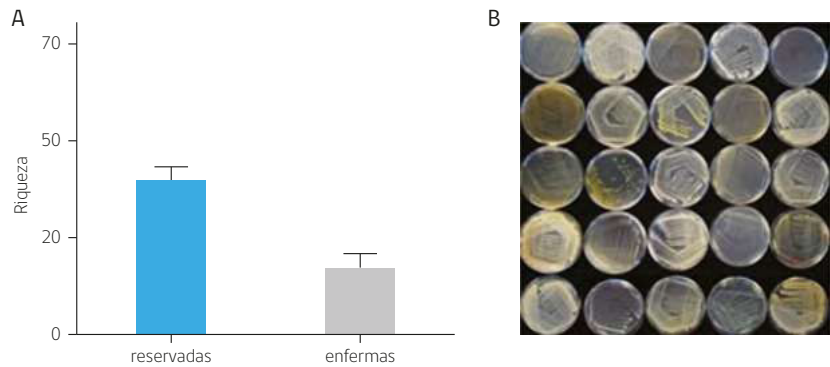
enfermedad y al establecimiento de diferentes estrategias de diagnóstico y detección, para luego avanzar hacia el desarrollo de una herramienta de control.

Es por ello que resultó de gran interés el haber podido corroborar en terreno que algunas plantas de manzano, previamente diagnosticadas con plateado, habían sido capaces de revertir los síntomas foliares de la enfermedad, además de recuperar los parámetros fisiológicos y de rendimiento normales (**FIGURA 2**).

Así como los seres humanos tenemos una flora bacteriana (microbiota) asociada a nuestro intestino, que nos protege de organismos patógenos, se estableció que las plantas también poseen verdaderas microbiotas endófitas (microorganismos que viven dentro de las plantas), que actúan como sistema de defensa de algunas enfermedades y que, incluso, las hacen más productivas. Estos significativos estudios se enmarcaron en la ejecución del proyecto Fondef ID19110315 "Inmunización microbiana para el control de plateado en frutales", en el que se comprobó que las plantas que habían revertido los síntomas poseían una población bacteriana distinta y más rica que aquellas plantas enfermas (**FIGURA 3**).

Evaluación de bacterias como agentes controladores

Actualmente, y gracias al apoyo del proyecto Fondef y de nuestros



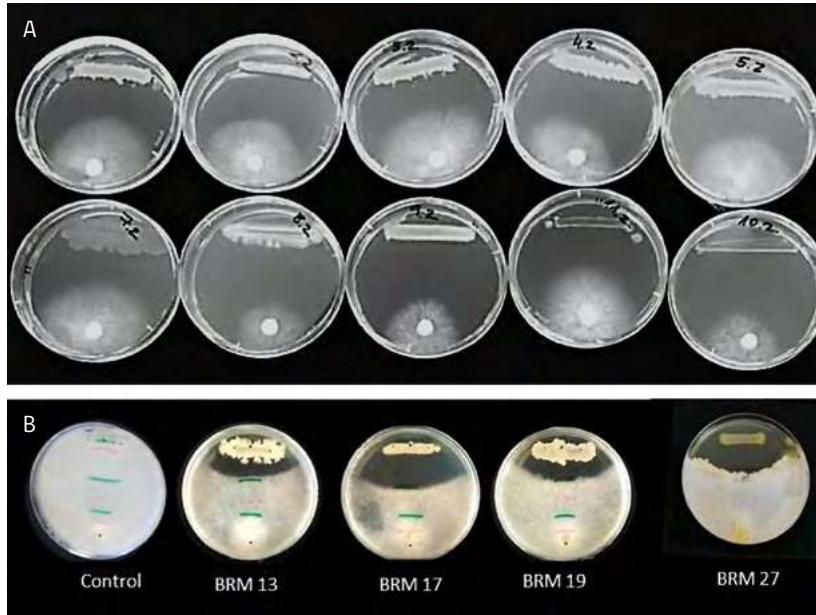
📌 **Figura 3.** Población de bacterias en plantas de manzano con reversión de síntomas. (A) Riqueza bacteriana. (B) Aislamientos de bacterias endófitas.

asociados¹, se está trabajando en la caracterización de los aislamientos bacterianos recuperados desde las plantas con reversión. Estas bacterias se han hecho crecer en medios de cultivo y evaluado sus características morfológicas (forma y color de las colonias) y moleculares (**FIGURA 3**). Considerando que algunas de estas bacterias podían estar involucradas en el fenómeno de reversión, se analizó también su capacidad de control (antagonismo) de cepas de *C. purpureum*, mediante ensayos de confrontación. Esta es una práctica bastante común en los laboratorios de microbiología y que consiste en utilizar placas con medios de cultivo, en las que en un extremo se coloca el patógeno que se quiere controlar y en

el extremo opuesto, la bacteria que se está evaluando (**FIGURA 4**). Luego se le dan las condiciones necesarias para su crecimiento y, posteriormente, se analizan los resultados para ver quien "ganó" (**FIGURA 4**). Así, se pudo establecer que algunas bacterias inhibieron hasta en un 50 % el crecimiento micelial de *C. purpureum*, en comparación con el control.

En base a estas evaluaciones de antagonismo y a la priorización de características deseables para la elaboración del inmunizante (fácil manipulación, aptitudes para ser masificados y formulados), se seleccionaron de forma preliminar, dos de las bacterias que mostraron un mejor comportamiento: BRM17 y BRM27 (**FIGURA 4**).

¹ Viveros el Tambo, Viveros Copequen, Fundo El Encanto, BioInsumos Nativa.



➤ **Figura 4.** Ensayos de confrontación. (A) Etapas iniciales con aislamientos bacterianos y fúngicos. (B) Bacterias ejerciendo diferentes grados de control sobre el crecimiento de *Chondrostereum purpureum*.

Bacterias como moduladoras de la respuesta inmune

Cuando una planta es expuesta a algún patógeno, se activan distintos mecanismos de defensa. En primer lugar, se producen cambios estructurales en la pared celular y/o muerte celular en el sitio de infección (respuesta hipersensible). Luego continúan los cambios fisiológicos y químicos que involucran: la generación de moléculas reactivas de oxígeno, la síntesis de moléculas defensivas (taninos y fitoalexinas) y la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, conocidas como proteínas PR (quitinasas y glucanasas). Todo esto acompañado por el “encendido” o activación de genes involucrados en la respuesta inmune de las plantas.

Considerando la evidencia científica que señala que algunas bacterias endófitas protegen a sus plantas hospedantes mediante la activación de genes de defensa, se desarrollaron investigaciones vinculadas con la capacidad de las bacterias, previamente seleccionadas,

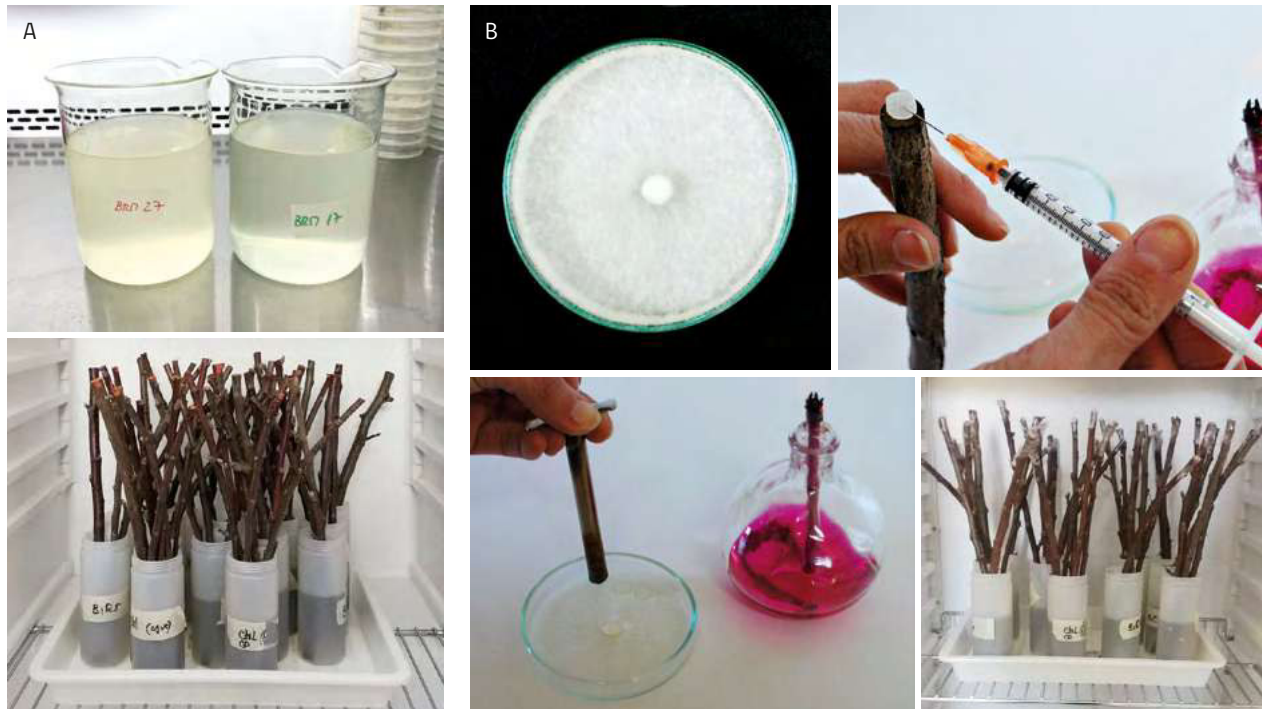
para “encender” algunos de estos genes en respuesta a la infección de *C. purpureum*. Para ello se establecieron diferentes ensayos, el primero de los cuales tuvo por finalidad evaluar la respuesta de manzano frente a la presencia de las bacterias. El segundo se destinó a evaluar el comportamiento de la planta frente a la infección del hongo, mientras que un tercer ensayo buscó dilucidar de qué forma la interacción bacteria-patógeno podía afectar la respuesta inmune. Para el primero, se sumergieron ramillas sanas de manzano de la variedad ‘Gala Brookfield’ en suspensiones separadas de las bacterias BRM17 y BRM27, y se incubaron en condiciones controladas de humedad y temperatura. Posteriormente, la suspensión se reemplazó con agua destilada y se incubaron por distintos períodos, tras los cuales se tomaron muestras de madera. En el segundo ensayo, las ramillas se inocularon con discos de micelio de *C. purpureum*, se incubaron en condiciones controladas y se tomaron muestras de madera en los tiempos antes definidos (FIGURA 5).

Sobre las muestras colectadas se implementaron protocolos de laboratorio que permitieron, a través del análisis de PCR en tiempo real (qPCR), evaluar el comportamiento de algunos genes involucrados en la respuesta inmune de las plantas como el gen PR2, relacionado con la producción de glucanasa, el gen SOD (súper oxido dismutasa), que participa en la vía de detoxificación de moléculas reactivas de oxígeno (ROS), y el gen PAL (fenilalanina amonio liasa), involucrado en la producción de compuestos fenólicos y en la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR).

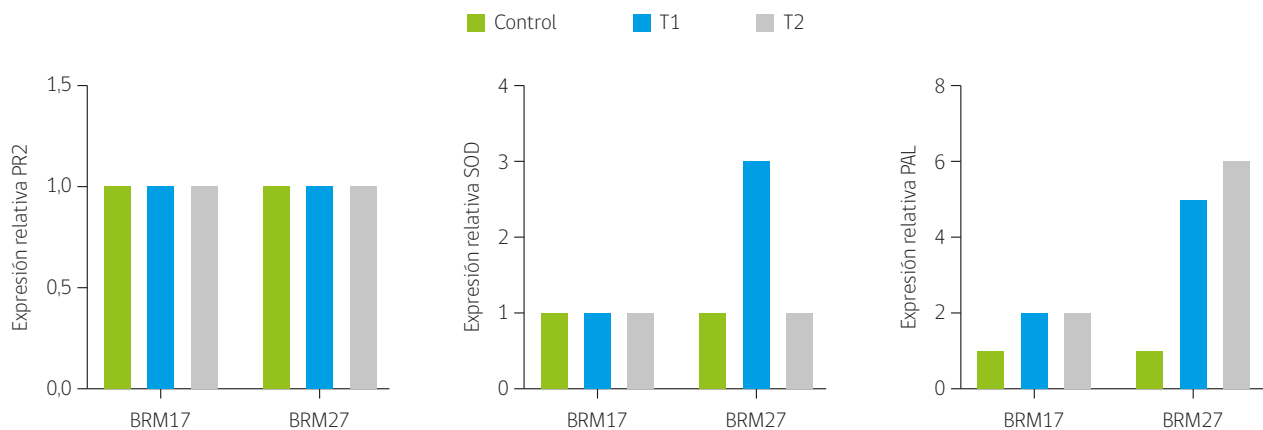
Esta evaluación permitió demostrar que en las plantas inoculadas con bacterias, el gen PR2 no cambiaba su nivel de expresión con respecto al testigo; que el gen SOD, en las plantas inoculadas con el aislamiento BRM27, mostraba un aumento en el tiempo 1, para después descender al nivel de las plantas control; en tanto que el gen PAL tuvo un incremento sostenido para ambos aislamientos (FIGURA 6). Con respecto al comportamiento de los mismos genes en las ramillas inoculadas con el hongo, fue posible observar que el gen PR2 incrementó levemente en el tiempo 2; el gen SOD no mostró variaciones; y que el gen PAL se comportó de forma similar a los ensayos con bacterias (FIGURA 7). Todo indica que el comportamiento del gen PAL en los tiempos evaluados, activó el sistema inmune de la planta.

Como ya se mencionó, para analizar la respuesta de manzano frente a la interacción bacteria-patógeno, se realizaron los análisis de qPCR, donde fue posible observar que la respuesta génica fue mucho mayor en presencia de ambos microorganismos, que cuando estos fueron analizados por separado (FIGURA 8).

Estos resultados indican que, en ausencia del patógeno, las plantas inoculadas con bacterias no mostraron mayores cambios en la expresión génica relacionada con mecanismos de defensa. En la FIGURA 6 puede



➤ **Figura 5.** Ensayos de inoculación de ramillas de manzano de la variedad Gala Brookfield. (A) Inoculación con suspensión bacteriana. (B) Inoculación con discos miceliales de *Chondrostereum purpureum*.



➤ **Figura 6.** Análisis de la expresión génica en ramillas de manzano, variedad Gala Brookfield, inoculadas con los aislamientos bacterianos BRM17 Y BRM27, y evaluadas al tiempo 1 (T1) y tiempo 2 (T2).

observarse cómo los valores de expresión de los genes PR2 y SOD se mantienen cercanos a los de las plantas sanas. Por ello, es posible interpretar que las plantas dejaron de “percibir” como patogénicas a las bacterias, cumpliendo de esta forma con uno de los requisitos para que un microorganismo sea identificado

como endófito. Sin embargo, al mantenerse activo el gen PAL y, por lo tanto, activo el sistema inmune frente al ataque de un patógeno como *C. purpureum*, estas mismas plantas dispararon una respuesta de defensa de forma acelerada, proporcionando una respuesta inmune de amplio espectro (FIGURA 8). Esto nos habla del fenómeno

del “priming” o pre-acondicionamiento para obtener una respuesta rápida de la planta frente al ataque de un patógeno. Básicamente, la idea implica que un sistema que ha estado “entrenado” por la interacción con microorganismos beneficiosos, reaccionará de mejor manera al momento de detectar posible amenazas.

Microorganismos endófitos

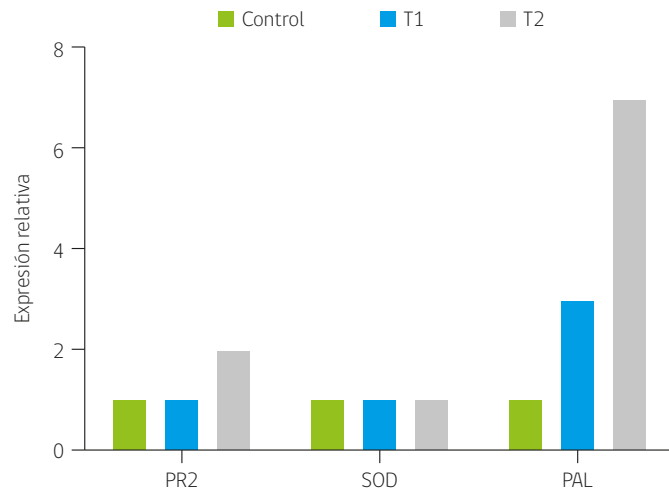
Un endófito es cualquier microorganismo (típicamente un hongo o bacteria) que habita en los tejidos internos de las plantas, sin causarle enfermedades. En la mayoría de los casos, estos microorganismos son transmitidos por las semillas o de forma vegetativa, mientras que en otras ocasiones pueden ser reclutados desde el suelo.

Los endófitos pueden ser patógenos latentes que esperan condiciones óptimas para producir enfermedad,

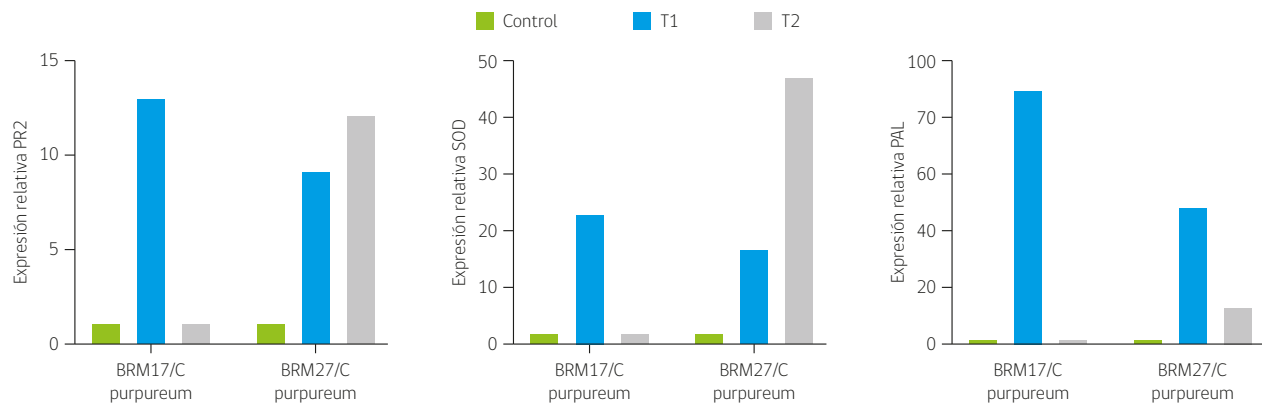
o pueden tener una asociación simbiótica con un fuerte impacto positivo en la salud, en el desarrollo y en el rendimiento de las plantas hospedantes. De esta forma, pueden mejorar las características agronómicas, limitando o previniendo el ataque de patógenos, a través de estrategias como el hiperparasitismo, competencia o antibiosis, y / o induciendo genes de resistencia que desencadenan respuestas de defensa natural de las plantas.

Conclusión

Los resultados obtenidos dejan claro que comprender las interacciones entre las bacterias endófitas y sus plantas hospedantes, ayudará en el diseño de nuevas estrategias productivas para la agricultura. Ejemplo de ello es el desarrollo de un inoculante microbiano que, al ser aplicado en las plantas, les confiere cierta inmunidad a *Chondrostereum purpureum*. De esta forma, tanto los viveristas como los productores podrán disponer de una herramienta segura, eficiente y sencilla de utilizar, para el control y prevención del plateado de los frutales. **TA**



➤ **Figura 7.** Análisis de la expresión génica en ramillas de manzano, variedad Gala Brookfield, inoculadas con *Chondrostereum purpureum* y evaluadas al tiempo 1 (T1) y tiempo 2 (T2).



➤ **Figura 8.** Análisis de la expresión génica en ramillas de manzano variedad Gala Brookfield, durante la interacción bacteria-patógeno. Evaluación al tiempo 1 (T1) y tiempo 2 (T2).