

Nueva herramienta para evaluar la sanidad del tubérculo semilla de papa mediante qPCR



Camila Sandoval S.
Bioquímica, M.Sc.
Investigadora INIA Remehue



Ivette Acuña B.
Ingeniera Agrónoma Ph.D.
Investigadora INIA Remehue



Este procedimiento permite detectar y cuantificar el nivel de contaminación bacteriana del tubérculo semilla de papa, proporcionando información para tomar decisiones de manejo preventivo y disminuir el riesgo de expresión de la enfermedad.

En el cultivo de papa se describen más de un centenar de problemas sanitarios diferentes, incluyendo enfermedades causadas por hongos, virus, bacterias y nemátodos, entre otras, las que pueden tener diferente importancia y efecto en la producción, tanto en el rendimiento como en la calidad.

Necesariamente, el control de estas enfermedades considera un manejo integrado, es decir, se debe utilizar un sistema que incluya todas las alternativas posibles para controlar o combatir una enfermedad, ya que una sola medida no es suficiente para obtener un buen resultado. Para tomar medidas preventivas adecuadas es fundamental identificar el agente causal de la enfermedad, su sintomatología, la relación patógeno-hospedero-medio ambiente, las condiciones favorables, resistencia o susceptibilidad de las variedades y el objetivo de la producción, entre otros factores. Además, se debe tratar de buscar opciones de bajo costo y compatibles con el medio ambiente.

Gran parte de las enfermedades de la papa se transmiten a través del material de propagación, de modo que el principal factor que define el potencial de rendimiento de un

cultivo y, por ende, su éxito comercial, es la calidad sanitaria del tubérculo semilla. A su vez, una buena sanidad permite disminuir el uso de productos utilizados para desinfección de semillas, los que no reemplazan de ninguna manera el uso de una semilla de buena calidad.

Hoy en día, uno de los principales problemas sanitarios y que están asociados a la calidad de la semilla son las pudriciones blandas y pie negro, causadas por las bacterias *Pectobacterium atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Estas enfermedades han aumentado en los últimos años en la zona sur de Chile, debido a la baja calidad de semilla, uso inadecuado del riego y el cambio climático, causando pérdidas de hasta 30 % en cultivares susceptibles, además del 24 % de rechazo de semilleros en certificación.

Pie negro y pudriciones blandas de la papa

El término pie negro se asocia a los síntomas ocasionados en la parte aérea de la planta, mientras que pudriciones blandas, a los ocasionados en los tubérculos. Los tallos de las plantas infectadas muestran una pudrición de color

negro que comienza con la pudrición del tubérculo madre y se extiende hacia el tallo, causando clorosis y marchitez del tejido foliar, debido a la obstrucción de los haces vasculares, y muerte de la planta (**FIGURA 1**). En tubérculos, los síntomas pueden variar desde una ligera decoloración vascular al extremo del estolón hasta una pudrición que compromete todo el tubérculo. El tejido afectado es húmedo, de color crema y consistencia blanda (**FIGURA 2**).

La bacteria puede localizarse superficialmente en los tubérculos, en lenticelas, heridas, o bien, en el sistema vascular. En tanto, su expresión dependerá de factores ambientales como la humedad del suelo, la temperatura, la susceptibilidad del cultivar y condiciones de crecimiento del cultivo y almacenamiento. Muchas veces los tubérculos semillas infectados de forma latente parecerán sanos y la sintomatología se observará más tarde, cuando se den las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad. Por esta razón, muchas veces no se detecta el problema tempranamente.

Se ha descrito que la incidencia de estas enfermedades está estrechamente relacionada con el

nivel de contaminación de la semilla por *Pectobacterium*. Una plantación de tubérculos semillas de papa contaminados con altas cantidades de la bacteria, puede resultar en una reducida emergencia de plantas y pudrición de tubérculos en campo. Cuanto mayor sea el nivel de inóculo bacteriano, mayor es el riesgo de que se desarrolle la enfermedad en el campo luego de plantar, más aún si existen factores adicionales que beneficien la multiplicación del patógeno como, por ejemplo, temperatura sobre 25 °C y el exceso de humedad en el suelo.

En la actualidad, no existe control químico ni biológico eficiente para el control de pie negro y pudrición blanda, y la única recomendación es utilizar tubérculo semilla libre del patógeno, junto con un manejo productivo que disminuya su expresión en un ambiente determinado.

Calidad y diagnóstico sanitario de la semilla

Para conocer el estado sanitario de la semilla es fundamental realizar un diagnóstico fitopatológico, ya que este identifica cuáles son los patógenos presentes en el material reproductivo; información de gran ayuda para evaluar el riesgo sanitario antes de plantar.

Por muchos años, las enfermedades bacterianas han sido diagnosticadas mediante el aislamiento del patógeno en medio de cultivo, seguido de análisis microscópicos, bioquímicos, serológicos y bioensayos. Estos procesos demandan días, o incluso, semanas de trabajo para obtener un diagnóstico, así como la identificación del agente causal, debido a que se requiere de una purificación y crecimiento de la bacteria, previo al análisis; lo que muchas veces se ve afectado por el crecimiento de otros patógenos secundarios presentes en la muestra, que enmascaran el crecimiento del patógeno primario, dificultando un correcto y oportuno diagnóstico.



📍 **Figura 1.** Pudrición de tallo causada por *Pectobacterium* spp. Se aprecian los síntomas de necrosis ascendente en los tallos, causados por la pudrición del tubérculo madre.



📍 **Figura 2.** Pudrición de tubérculo semilla de papa causado por *Pectobacterium* spp.

Hoy en día, los laboratorios buscan implementar técnicas más específicas y sensibles que permitan aumentar la fiabilidad y precisión, y disminuir los tiempos de espera de sus resultados. Esta necesidad ha derivado en el uso progresivo y más frecuente de

técnicas moleculares, basadas en la detección de ácidos nucleicos (ADN o ARN) como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que amplifica muchas copias de un fragmento determinado de ADN, a partir de una muestra que tiene cantidades

diminutas de este. En palabras simples, es un tipo de fotocopiadora molecular que puede generar millones o miles de copias, a partir de una secuencia de ADN en menos de dos horas. Esta amplificación de ADN es usada como una prueba de diagnóstico molecular altamente específica y sensible, ya que permite detectar un fragmento del material genético de un patógeno presente en una muestra vegetal, poniendo en evidencia su presencia.

El uso de metodologías de detección y cuantificación del nivel de contaminación por *Pectobacterium* en el material reproductivo, proporcionaría información confiable sobre la calidad de la semilla y el riesgo potencial de desarrollar la enfermedad en campo. Lo anterior, ayudaría a que productores/as puedan tomar decisiones informados/as, implementando estrategias de control preventivo y manejo rentables que ayuden a reducir las potenciales pérdidas en el cultivo.

Nuevas metodologías para detectar y evaluar el nivel de *Pectobacterium* en el tubérculo semilla

Existen distintas metodologías descritas en la literatura para detectar y evaluar contaminación de *Pectobacterium* en tubérculos de papa, tales como el recuento de colonias bacterianas en medios de cultivo selectivo, inducción de pudrición de tubérculos, métodos serológicos como ELISA o inmunofluorescencia, PCR, entre otras.

Por años, en el Laboratorio de Fitopatología de INIA Remehue se han utilizado rutinariamente las metodologías de recuento de colonias bacterianas en medio de cultivo y, en especial, la inducción de tubérculos bajo condiciones de humedad y temperatura favorables para su pudrición. Esta última consiste en envolver individualmente los tubérculos en toalla de papel mojada, film plástico y bolsa plástica, para luego incubarlos a 26 °C por cinco días y, por último,

contabilizar los tubérculos con y sin infección, además del porcentaje de tejido podrido, pudiendo así estimar el potencial de infección latente. Ambas técnicas utilizadas son laboriosas y de procesamiento lento. Además, existe la posibilidad de que la semilla de papa pueda estar contaminada con otras especies bacterianas, que pueden influir en la pudrición del tubérculo, obteniendo resultados no precisamente dados por *Pectobacterium*. Con el fin de mejorar la sensibilidad, especificidad y tiempos de respuesta, es que INIA con el apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) mediante la iniciativa PYT-2017-0204, ha trabajado en la implementación de una metodología basada en PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar el

inóculo bacteriano de *Pectobacterium* en una muestra de tubérculos semilla de papa, pudiendo determinar la calidad de semilla antes de plantar y los potenciales riesgos de expresar pie negro y pudriciones blandas.

La PCR en tiempo real —también llamada PCR cuantitativa o qPCR— es una variante de la PCR convencional que se caracteriza por detectar y cuantificar simultáneamente el material genético de un patógeno en una muestra vegetal con una alta especificidad, sensibilidad y rapidez. Para ello se utiliza los mismos reactivos que la PCR convencional (molde de ADN, partidores específicos, dNTPs, solución tampón, cofactores y ADN polimerasa), con la diferencia que se le adiciona un fluoróforo que permite medir la tasa de generación

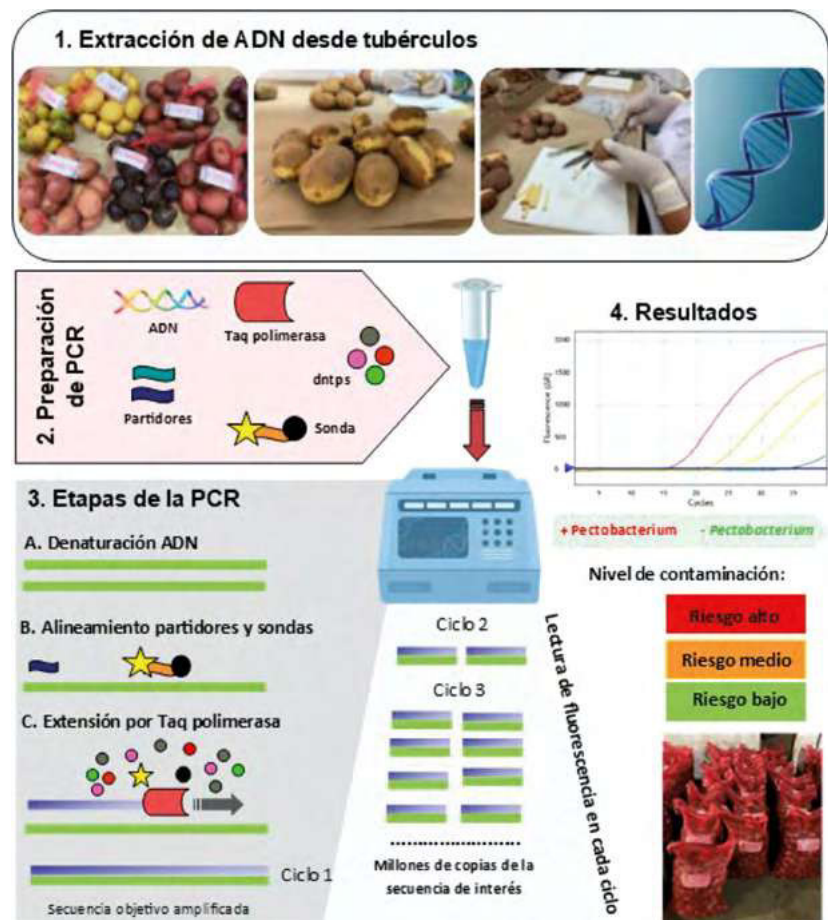


Figura 3. Esquema de metodología de cuantificación mediante qPCR en tubérculo semilla de papa.

del producto de interés en cada ciclo de amplificación, pudiendo correlacionar la amplificación con una señal de intensidad de fluorescencia. Por ejemplo, si se detectara material genético de *Pectobacterium* en una muestra de tubérculos, la fluorescencia aumentará conforme el producto de PCR amplifica. Todos estos reactivos o "ingredientes" se depositan en un microtubo, que es llevado a un equipo termociclador, donde se programan los ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis de ADN, e incluye un sistema óptico capaz de detectar señales fluorescentes para monitorear el progreso de la reacción de amplificación (FIGURA 3). La cuantificación de ADN del patógeno presente en la muestra se efectúa mediante la elaboración de una curva estándar de amplificación, a partir de diluciones seriadas de ADN de concentración conocida, en la que se interpolan los valores de las muestras a evaluar, obteniendo la concentración de ADN del patógeno. La aplicación de qPCR permite determinar la cantidad de ADN de *Pectobacterium* en una muestra de tubérculos de papa.

Cuantificación de *Pectobacterium* en tubérculo semilla de papa mediante PCR en tiempo real

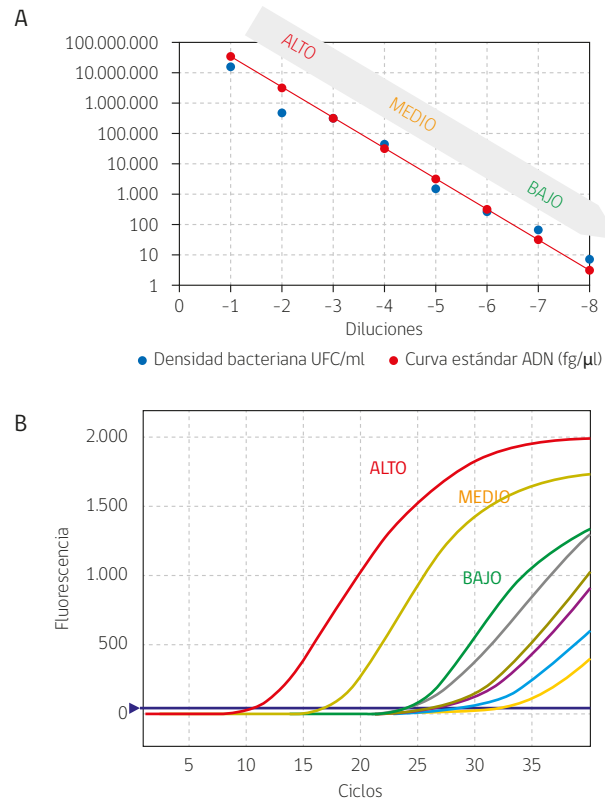
La metodología consiste en procesar una muestra de tubérculos para extracción de ADN (tomando piel del contorno del tubérculo) e inserción del estolón, ya que en esta zona se alberga la bacteria. Posteriormente, esta muestra de ADN se analiza por qPCR, para detectar y cuantificar *Pectobacterium* en los tubérculos, estimando el nivel de riesgo a expresar la enfermedad (alto, medio o bajo).

El límite de detección y cuantificación de la metodología estuvo dado por la correlación entre la curva estándar de cuantificación y el número de células bacterianas, indicativas del nivel de inóculo y riesgo, detectándose

hasta 3 femtogramos¹/μl de ADN equivalentes a 7 UFC/ml. Al testear tubérculos infectados con distintos niveles de inóculo bacteriano, se determinó que la cuantificación de ADN de *Pectobacterium* incrementó conforme aumentó la densidad bacteriana aplicada, indicando que esta herramienta molecular permite discriminar distintas cantidades de bacterias en las semillas, con una buena sensibilidad y especificidad. La validación de la técnica se ha realizado evaluando lotes de semillas destinadas a plantación. Así, lotes

con un bajo nivel de contaminación, indicaron una buena calidad de semilla, con una baja expresión de la enfermedad en campo (FIGURA 4).

Es así como esta herramienta molecular permite conocer la calidad sanitaria de la semilla a utilizar, información que, al conjugarla con otros factores de riesgo como la susceptibilidad varietal utilizada en la plantación, el manejo predial y las condiciones de almacenamiento, permitirá estimar el nivel de expresión potencial en campo de pie negro y pudriciones blandas. **TA**



➤ **Figura 4.** (A) Correlación entre curva de calibración de qPCR y nivel de inóculo de *Pectobacterium*. Valores de riesgo basados en valor de UFC/ml obtenidos desde literatura (Bain *et al.*, 1990; Pérombelon 2000; Toth *et al.*, 2003). (B) Curvas de amplificación para muestras provenientes de lotes de semillas analizadas. Las amplificaciones se observan bajo la curva de color verde representativa de bajo riesgo, indicando un bajo nivel de contaminación por *Pectobacterium* (menor a 3×10^3 Fg de *Pectobacterium*/μl). Esto equivale a menos de 103 UFC/ml extracto de piel; valor considerado en la literatura como de bajo nivel de contaminación de semilla.

¹ Femtogramo (fg): unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades (SI), equivalente a la milbillonésima parte de un gramo.