The image shows several clear plastic petri dishes containing bacterial cultures. The cultures are visible as white, fuzzy growth on the agar surface. One dish in the foreground is labeled 'MALTOSA' in black marker. The dishes are arranged on a surface with a perforated metal grid in the background.

Identificación y monitoreo de enfermedades por medios moleculares

Financiadores: Kopia Center, Cooperación Corea del Sur e International Foundation for Science, Suecia

Cita correcta del artículo:

Castillo, J.A.; Montero, M.; Veramendi, S. y Sequeiros, C. (2015). Identificación y monitoreo de enfermedades por medios moleculares (pp. 26-31). *En: Fundación PROINPA. Informe Compendio 2011-2014. Cochabamba - Bolivia.*

Contacto:

ja.castillo@proinpa.org

Por primera vez en Bolivia se cuenta con un método de detección por técnicas moleculares de *A. tumefaciens* y *R. solanacearum* para muestras de suelo y de tejido vegetal. Este método es altamente sensible, rápido y muy específico.

Los patógenos de plantas (hongos, bacterias, virus y viroides) causan enfermedades importantes en muchas plantas en todo el mundo, con pérdidas significativas en el rendimiento y en la calidad comercial de los productos. Los hongos son controlados mediante fungicidas y bioinsumos; en el caso de virus y bacterias no se tienen disponibles sustancias de uso masivo, por esta razón, la prevención es la mejor estrategia para evitar la diseminación de estos patógenos. La prevención demanda métodos de detección de patógenos de alta sensibilidad, especificidad y fiabilidad, debido a que muchos pueden permanecer latentes y sólo manifestarse en algunos estados fisiológicos de la planta.

Entre las técnicas más eficientes desarrolladas para la detección de patógenos se encuentra la tecnología molecular que ofrece gran sensibilidad y precisión en el diagnóstico y mayor rapidez que las técnicas convencionales a un costo equivalente a éstas. Esta tecnología también aumenta la comprensión de la biología y la estructura de las poblaciones de los

patógenos y provee respuestas rápidas a preguntas epidemiológicas sobre enfermedades de plantas y ayuda a la toma de decisiones sobre el control.

Utilización de técnicas moleculares en la detección de patógenos de importancia para Bolivia

A continuación se presentan dos casos del empleo de tecnología molecular en el diagnóstico de algunas enfermedades de importancia económica para Bolivia.

Agalla de Corona. Existen cerca de 2.500 ha de plantaciones de durazno en el valle de Cochabamba. Esta extensión produce alrededor de 20 mil toneladas de fruta por año que genera un monto económico aproximado de 10 millones de dólares. Entre los principales problemas fitosanitarios del duraznero se encuentra la Agalla de Corona.

El agente causal de la Agalla de Corona en duraznero es la bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*, que ataca a una amplia gama de plantas siendo las más susceptibles las de la familia *Rosaceae*. *A. tumefaciens* es una bacteria Gram-negativa que vive en el suelo y entra a las plantas a través de heridas en raíces o tallos. *A. tumefaciens* induce la proliferación de las células de las plantas usando fitohormonas que forman tumores o agallas generalmente en el tallo a la altura del suelo pero también en las raíces o en tallos aéreos y ramas. Las plantas afectadas pueden quedar enanas, débiles, cloróticas y eventualmente morir.

La detección temprana y oportuna de *A. tumefaciens* permite obtener los siguientes beneficios:

- 1 Previene la producción de plantines enfermos en viveros y su posterior comercialización.
- 2 Permite el establecimiento de nuevos huertos en suelos limpios y con plantas sanas.
- 3 garantiza la sanidad del material vegetal utilizado para realizar injertos.
- 4 Ayuda a conservar el óptimo estado sanitario de suelos y aguas de riego en invernaderos, viveros y huertos frutales.
- 5 Reduce las pérdidas ocasionadas por la Agalla de Corona.
- 6 Permite acreditar a los servicios nacionales de certificación de la calidad sanitaria de plantas.

En la Fundación PROINPA se ha puesto a punto un método de detección de *A. tumefaciens* por medios moleculares. Los resultados indican que por medio de la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando partidores específicos para *A. tumefaciens*, los aislamientos bacterianos 1, 6 y 7 corresponden a *A. tumefaciens* (Figura 1). Estos tres aislamientos fueron confirmados por su capacidad de formar tumores en las plantas indicadoras *Datura stramonium* y *Solanum lycopersicum* (Lazcano, 2008 y Plata). Se han usado dos parejas de partidores: A-E' y CYT-CYT' [5] que detectan específicamente el gen *virD2* involucrado en la virulencia de la bacteria y el gen *ipt* implicado en la formación de tumores respectivamente.

Para la detección de *A. tumefaciens* en suelo, muestras de suelo provenientes de parcelas con durazneros afectados por agalla y suelo esterilizado fueron utilizadas para extraer ADN total. El ADN fue amplificado selectivamente mediante un PCR semi-anidado usando los pares de partidores A-E' y A-C' [5]. Se detectó la presencia de la bacteria en suelos de parcelas con agalla pero no en el suelo control (Figura

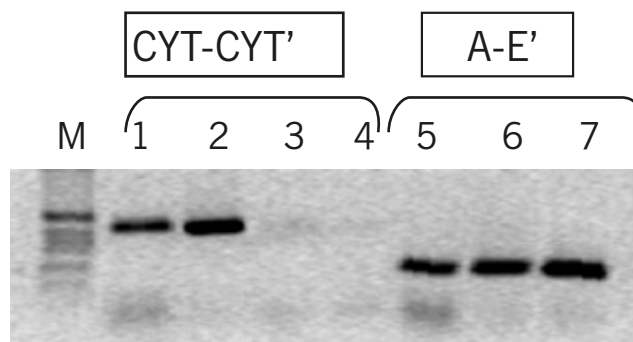


Figura 1. Detección de *A. tumefaciens* usando los partidores para el gen *ipt* (CYT-CYT') *virD2* (A-E'). Carriles: M marcador de peso molecular, 1 aislamiento 1; 2 aislamiento 7; 3 C58C1 (control positivo); 4 agua (control negativo); 5 aislamiento 1; 6 aislamiento 7; 7 C58C1 (control positivo).

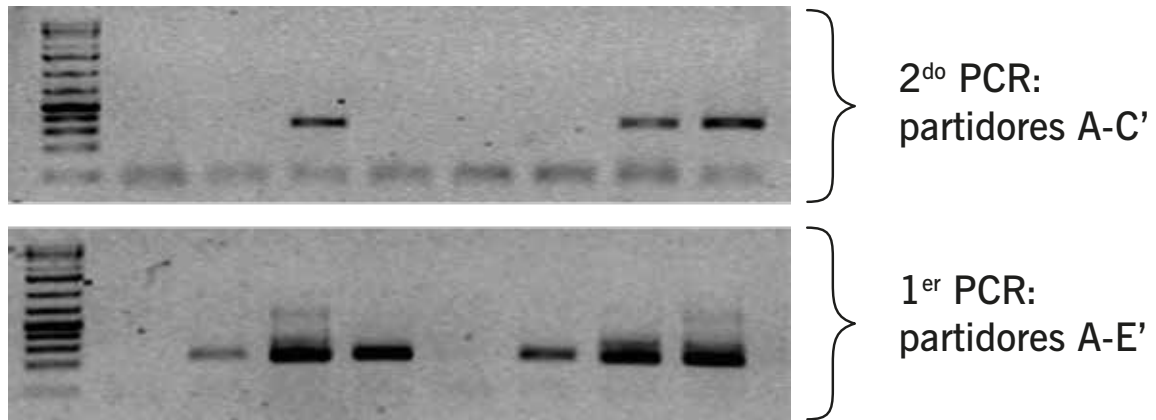


Figura 2. Detección de *A. tumefaciens* en muestras de suelo. Carriles: M marcador de peso molecular; **1** Agua (control negativo); **2** suelo estéril autoclavado; **3** suelo estéril + *A. tumefaciens* sin diluir ($\sim 1 \times 10^8$ ufc/ml); **4** suelo estéril + *A. tumefaciens* dilución 10^{-6} ; **5** suelo estéril + *A. tumefaciens* dilución 10^{-10} ; **6** suelo estéril + *A. tumefaciens* dilución 10^{-8} ; **7** ADN purificado de *A. tumefaciens* C58C1 (control positivo); **8** *A. tumefaciens* C58C1 (control positivo).

2). Con el fin de establecer la sensibilidad de la técnica se inoculó suelo estéril con concentraciones decrecientes de *A. tumefaciens* y se realizó en paralelo recuentos bacterianos en placa para establecer el número mínimo de células bacterianas que puede detectar esta metodología. El resultado indica que el PCR anidado tiene una capacidad de detectar 5 células de *A. tumefaciens* por gramo de suelo (5 ucf/g de suelo).

Para la detección de *A. tumefaciens* en muestras de plantas de duraznero, se extrajo ADN total de raíces, tallos y yemas. El ADN extraído fue sometido a un PCR semi-anidado con los partidores A-E' y A-C'. Se encontró *A. tumefaciens* en tallos y yemas jóvenes y viejas, en yemas apicales, en raíces y en cortezas de tallos jóvenes. No se encontró en cortezas de tallos leñosos. Este resultado es coherente ya que la bacteria necesita tejido vegetal vivo para su subsistencia.

Marchitez Bacteriana. Es una enfermedad causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, que vive en el suelo, ingresa a la planta y ocasiona la marchitez y la muerte de ésta. La Marchitez Bacteriana puede afectar el 75% de la producción de papa de una parcela y el 100% de la papa almacenada en zonas con alta incidencia. Este daño significa una pérdida entre 300 a 1.000 \$us/ha.

Históricamente, *R. solanacearum* se ha clasificado en razas y biovars, pero recientemente un nuevo sistema de clasificación divide a esta especie en cuatro grupos principales llamados filotipos que reflejan las relaciones filogenéticas entre los miembros de la especie y que además coinciden con el origen geográfico de éstos.

De 1992 a 2006, la Fundación PROINPA, en cooperación con el Centro Internacional de la Papa realizó estudios sobre la presencia de Marchitez Bacteriana en Bolivia, identificando las áreas afectadas y las razas de la bacteria; también se trabajó en el desarrollo de propuestas de manejo integrado. Últimamente, los investigadores de PROINPA han desarrollado un método basado en técnicas de biología molecular para detectar la bacteria patógena en tubérculo-semilla. Con esta tecnología se realizó un monitoreo de la enfermedad en las zonas paperas más

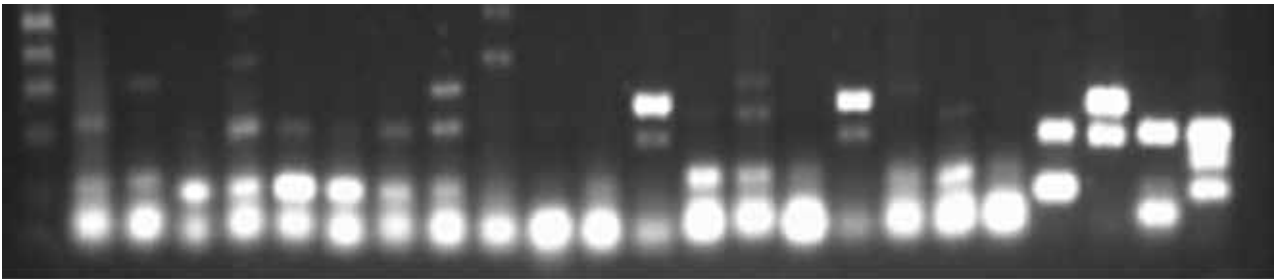


Figura 3. Productos de PCR usando los partidores descritos por Fegan & Prior [2]. Las muestras 1-19 provienen de bacterias aisladas de muestras de tubérculo-semilla, las muestras 20-23 son controles positivos para los filotipos I, II, III, IV respectivamente, **M** marcador de peso molecular.

vulnerables al cambio climático. En el año 2013, se realizó una colecta de semilla de papa de 224 comunidades para conocer la situación actual de la enfermedad en el país. Los resultados indican que en 16 municipios (170 comunidades) de los departamentos de La Paz, Cochabamba, Chuquisaca, Oruro, Potosí y Tarija se detectó la bacteria. La incidencia de la Marchitez Bacteriana por municipios es alta, el 68,75% de ellos presentan evidencias de la enfermedad, sin embargo, la contaminación de los tubérculos con la enfermedad es baja (el 8,72% de los tubérculos contienen al patógeno). Respecto a la diversidad de cepas de *R. solanacearum*, las razas encontradas en el país son 1 y 3, los biovars 1 y 2 y los filotipos I y II. La detección se realizó por técnicas moleculares usando los partidores 759 y 760 y la determinación de los filotipos, de acuerdo a Fegan & Prior (Figura 3).

Conclusiones

Por primera vez en Bolivia se cuenta con un método de detección por técnicas moleculares de *A. tumefaciens* y *R. solanacearum* para muestras de suelo y de tejido vegetal. Este método es altamente sensible, rápido y muy específico. Tiene un nivel de detección de hasta cinco células de *A. tumefaciens* por gramo de suelo. También se pueden analizar muestras provenientes de diversas partes de la planta: raíces, tallos, yemas y otros. Esta versatilidad ofrece ventajas sobre las técnicas de diagnóstico convencional (microbiología) y por serología (ELISA), dado que no se requiere el previo aislamiento, purificación, ni la inoculación.

Aunque no está detallado en este artículo, en el laboratorio de Biología Molecular de PROINPA, se tiene la experiencia en el diagnóstico de otras enfermedades además de las mencionadas: virus PVX, *Erwinia* sp. y *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra) en muestras de planta y *Paenibacillus larvae* (Loque americana) en muestras de abejas (adultas y larvas) y panales.

Literatura consultada

- Barea O., Equise H., Alvarez V. & Gandarillas A. 2008. La marchitez bacteriana en Bolivia: situación actual y sus consecuencias futuras. *Revista de Agricultura (Bolivia)*. 60:10-43.
- Fegan M. & Prior P. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex"? In: Allen C, Prior P, Hayward AC, editors. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St. Paul. pp 449-461.
- Fernandez-Northcote E. N. & Alvarez V. 1993. Situación actual de la marchitez bacteriana causada por *P. solanacearum* en Bolivia, Brasilia, Brasil.
- Goulter K. & Randles J. 1997. Serological and molecular techniques to detect and identify plant pathogens. In: Brown JF and Ogle HJ editors. *Plant Pathogens and Plant Diseases*. APPS Press, Australia. pp 172-191.
- Haas J.H, Moore L., Ream W. & Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ Microbiol* 61:2879-2884
- López M.M., Llop P., Olmos A., Marco-Noales E., Cambra M. & Bertolini E. 2009. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Curr. Issues Mol. Biol.* 11: 13-46.
- Michailides T.J., Morgan D.P., Ma Z., Luo Y., Felts D., Doster M.A. & Reyes H. 2005. Conventional and molecular assays aid diagnosis of crop diseases and fungicide resistance. *Calif. Agr.* 59:115-123.
- Miller S.A. & Martin R.R. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 409-432.
- Opina N., Tavner F., Hollway G., Wang J.F., Li T.H., Maghirang R., Fegan M., Hayward A.C., Krishnapillai V., Hong W.F., Holloway B.W. & Timmis J. 1997. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5:19-30.