



**Por Héctor García O., Fundador y Gerente Gral.
Laboratorios Diagnofruit Ltda.
hgarcia@diagnofruit.cl**

Las últimas semanas hemos visto el avance del Coronavirus desde China (el principal destino de nuestras cerezas) hacia el resto del mundo; lo que ha implicado extremas medidas de contención en el gigante asiático.

Lo anterior podría generar problemas en la comercialización de la última parte de las exportaciones y al mismo tiempo ha dado relevancia a las ventas por internet de fruta fresca.

Como podrán haber observado, una de las técnicas para detectar el virus y diagnosticar de forma segura la enfermedad se basa en el análisis de [Reacción en Cadena de la Polimerasa](#) más conocida por sus siglas en inglés como PCR ([no confundir con Proteína C Reactiva](#)); una técnica desarrollada por el controvertido Premio Nobel, [Kary Mullis](#), que luego de un viaje lisérgico inventó una herramienta que marcó un antes y un después en la biología.

La técnica, obviamente, con la capacidad inventiva humana hoy posee muchas variantes y formas de uso, y como no, la agricultura no está exenta de sus beneficios.

A continuación revisaremos algunos avances en fruticultura que hemos podido desarrollar gracias a esta gran tecnología; con ejemplos aplicados y transformados en servicios, que nos ayudarán a entender su funcionamiento y nos inspiran a crear nuevos alcances para el trabajo en laboratorio y campo; siempre con el objetivo de crear una agricultura sustentable.

PCR para identificar y diagnosticar

Si bien los análisis taxonómicos para identificar patógenos o plagas siempre son importantes, la verdad es que las técnicas basadas en estudios genómicos rápidos nos dan la oportunidad de acercarnos al género y muchas veces a la especie del agente causal en cuestión de días, donde PCR juega un rol fundamental.

Existen zonas en el genoma de bacterias, hongos, virus y todos los microorganismos conocidos que les llamamos conservadas, en otras palabras, que para la especie poseen mínimas o inexistentes variaciones por lo tanto, si las leemos nos acercarán a su individualización.

Entonces, buscamos estas zonas, las amplificamos millones de veces a través del sistema PCR para poder visualizarlas o en este caso secuenciarlas en un proceso posterior.

De forma práctica es como buscar el RUT o DNI de la especie, que de forma metafórica está en un tamaño de letra microscópica, el PCR lo que hace es agrandar esas letras para que nosotros podamos verlo a simple vista. Una vez que amplificamos y por lo tanto visualizamos ese RUT o DNI lo enviamos a descifrar a través de secuenciación en ese momento comienza a aparecer lo que sería un código y luego lo enviamos al “Registro Civil” que sería [GenBank](#).

Si tenemos suerte, alguien en el mundo ya identificó taxonómicamente el microorganismo, que es muy común que ocurra, y subió la información del “RUT o DNI” a GenBank y lo que hacemos nosotros es comparar información genética de nuestro candidato y comparar con lo previamente establecido; entonces si tenemos match podríamos establecer un diagnóstico rápido sobre qué patógeno estaría causando una enfermedad.

En enero de 2018, técnicos de [Exportadora Rancagua \(Ranco Cherries\)](#) nos enviaron muestras de cerezo con un ataque severo de manchas necróticas foliares; pudimos aislar bacterias desde las mismas, secuenciamos una región genómica denominada 16S que nos resultó en un match con [Pseudomonas syringae pv. morsprunorum](#), por la importancia del hallazgo, primera y única vez en Chile, secuenciamos un par de genes más y logramos establecer con seguridad el diagnóstico, lo que generó [un plan de medidas por parte del SAG](#).

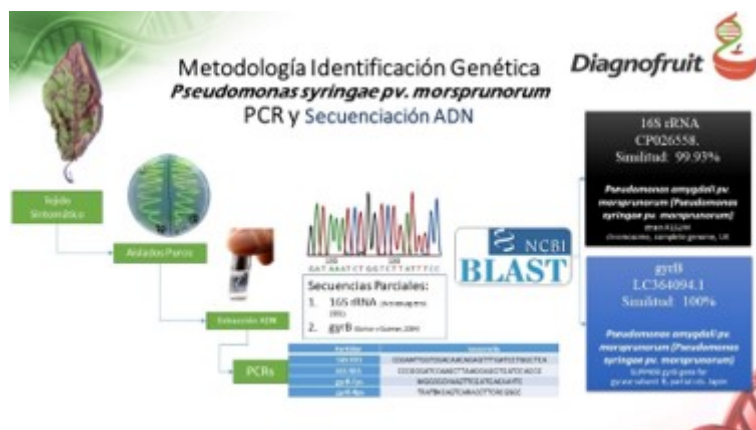


Figura 1. Esquema base de trabajo para detección y diagnóstico de Psm a través de PCR y posterior secuenciación de genes.

PCR asociado a Partidores Específicos

La técnica anterior trabaja sobre la base partidores “universales”, que amplifican zonas del genoma como ITS, 16S y otras que sabemos que independiente del tipo de organismo a analizar se mantienen sectores conservados para la especie, en otras palabras el DNI o RUT está ahí contenido, pero trabajan sobre cualquier organismo.

Este proceso eventualmente puede ser largo, porque necesita aislar el patógeno, generar una extracción limpia de ADN y enviar a secuenciar, lo que demora un análisis de rutina que debe ser rápido por esencia.

Entonces **¿Qué realizamos para acelerar el proceso?** Generamos **partidores específicos**, que ubiquen el código genético exacto que solo posee la especie candidata que podría estar causando la enfermedad. De esta forma, y volviendo a la historia reciente de Coronavirus, desde una muestra de fluidos humanos es posible diferenciar el diagnóstico de una simple gripe en pocas horas y tomar las medidas necesarias en tiempos muy acotados.

En Chile o en cada región de cultivo, los laboratorios fitopatológicos, incluso entomológicos, debieran poseer partidores y protocolos de PCR para cada uno de los organismos causantes de los mayores problemas en el área y sobre todo aquellas que de forma particular están presentes en sectores acotados y que requieren manejos específicos si son detectados, sumando además especies cuarentenarias.

En algunas variedades de kiwis amarillos, como HORT16A, Kiss o Dorí hemos observado susceptibilidad a ataques de *Verticillium gasparii* sp. nov., que muchas veces son confundidos con Psa, estrés o ataques del complejo de hongos de la madera.

A través de un proyecto CORFO (17CH-83909) logramos generar un servicio de detección temprana de este patógeno, a través de PCR y técnicas asociadas; luego de “caminar” por su genoma pudimos establecer una región que lo diferencia de otros patógenos incluyendo individuos del mismo género que en kiwi no causan mayores problemas, como *Verticillium albo-atrum* o *V. dahliae*.

Cuantificación de Patógenos a través de PCR

Una de las variantes más importantes en la técnica, es la denominada **qPCR o PCR en tiempo real**, la “q” proviene de cuantificación en inglés “quantitative” y tiempo real refiere a que a través de un sistema de lectura óptica el aparato estima en tiempo real como aumenta el número de copias de la región que estamos amplificando de forma absoluta.

Esto último nos da la clave sobre cómo funciona la técnica.

Si en una muestra hay muy poco material genético de un patógeno (inicio de una infección o poca contaminación) la lectura se va a “atrasar” en el tiempo de desarrollo del análisis, la amplificación será visible pasado muchos ciclos de amplificación, en cambio si existe abundancia del patógeno la amplificación que es exponencial, será rápidamente visualizada por el sistema.

Nuevamente con el apoyo de CORFO (16CH-61203), logramos establecer umbrales de contaminación crítica de fitopatógenos de postcosecha en líneas de embalaje, herramienta que hoy es utilizada por varias de las más importantes exportadoras de cerezas de Chile.

¿Cómo avanzamos desde una lectura de qPCR a definir cuantos microorganismos hay en una muestra?

En la teoría es bastante simple, generamos curvas de agua con cantidades de inóculo conocidas, por ejemplo, conidias de *Botrytis cinerea*, el resultado de las lecturas de qPCR se relacionan a las lecturas conocidas entonces podemos interpolar resultados a través de una regresión y definir desde una muestra real cuantas conidias de *B. cinerea* están presentes en 1 mL de agua. Luego, bajar esta tecnología para que sea útil a la industria, requirió un trabajo de definición de umbrales de riesgo, en este punto se alcanza la fuente de innovación y riesgo tecnológico, que logramos superar.

Otra aplicación de esta herramienta está asociada a monitoreo de huertos, considerando algunas limitantes prácticas hemos establecido protocolos que nos señalan la cantidad de inóculo de ciertos patógenos en pre-cosecha y hoy estamos en la construcción de umbrales

de riesgo asociado a estos en cerezas.

En el gráfico podemos observar datos reales de como varió la temporada en términos de inóculo de *Alternaria* y *Botrytis* en flores de cerezos, calculados a través de qPCR, la baja considerable de la actual temporada se explica por la escasa humedad ambiental preponderante.



Gráfico 1. Conidias de *Botrytis cinerea* y *Alternaria* spp. promedio por flor, temporadas 2018-19 y 2019-20 calculado a través de análisis de qPCR. Resultados Proyecto Estudio *Alternaria* y Otros Patógenos en Cerezos, Laboratorios Diagnofruit Ltda. Cada temporada incluye 50 unidades de monitoreo, distribuidas desde la Región del Maule a la Metropolitana

PCR asociado a HRM para Detección Rápida de variaciones mínimas en el Genoma

Una mínima variación o mutación dentro del genoma de un patógeno, nos puede ayudar a identificar una especie, o si esa variación produce un cambio en una proteína que es blanco de un fungicida o bactericida podría resultar en resistencia hacia dicho activo.

Sin ahondar en profundidad en como la técnica trabaja, la gracia de qPCR asociado a [HRM \(High Resolution Melting\)](#) es que nos permite visualizar mutaciones en un sector específico del genoma en una sola reacción a muy bajo costo sin la necesidad de secuenciar.

Además de identificar especies como *Verticillium* y *Botrytis* por medio de esta técnica, hemos desarrollado protocolos, gracias también al apoyo de CORFO (17IDAE-74712), para detectar mutaciones que confieren resistencia a fungicidas de importantes grupos químicos como carboxamidas, hidroxianilidas, triazoles y dicarboximidas en *Botrytis cinerea*,

Alternaria spp. y *Penicillium spp.*

La herramienta nos permite de forma rápida efectuar un análisis si una población en campo es resistente a ciertos fungicidas y elaborar programas de manejo específicos de acuerdo a la realidad de cada huerto; reduciendo el tiempo de respuesta en al menos 50% con respecto a un análisis convencional.

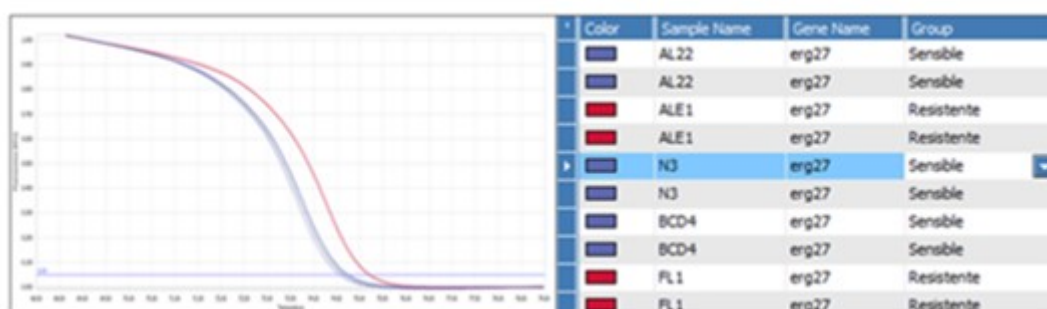


Figura 2. Resultado de análisis qPCR-HRM efectuado a una población de *B. cinerea* para mutaciones en el gen *erg27* que conceden alta resistencia hacia el fungicida fenhexamid. Se puede observar la facilidad de interpretación de resultados, en rojo aquellos individuos mutantes que son resistentes al fungicida.

En un segundo artículo profundizaremos en técnicas asociadas a expresión de genes y otras que incluyen secuenciación masiva, y como estas nos ayudan a estimar por ejemplo si un producto logra generar plantas más resistentes a enfermedades o si la microbiota de un huerto está en equilibrio.

Antes de terminar, el financiamiento de todos estos avances es muy complejo de llevar a cabo, muchos de estos proyectos no llegan a buen puerto, lo que limita el traspaso de recursos desde la banca o inversionistas.

Por esto el fortalecimiento de programas de subsidio público es fundamental para engendrar el desarrollo de la industria frutícola acorde a nuestros tiempos, en época de crisis necesitamos políticas públicas de largo plazo que generen un piso seguro para la investigación, desarrollo, innovación y extensión de este tipo de iniciativas, sobre todo pensados en la pequeña y mediana empresa.



Diagnofruit Ltda.

Profesionales al servicio y desarrollo
de la industria frutícola nacional

