



ASCOLFI - XIV CONGRESO
SANTA MARTA, AGOSTO 25, 1993

APLICACION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR EN LA Fitopatología

SEMINARIO

1. INTRODUCCION - M. A. Pastor Corrales
2. MATERIALES Y METODOS - J.E. Mayer
3. APLICACIONES EN ESTUDIO DE VIRUS Y BACTERIAS - M.M. Otoyá
4. APLICACION EN ESTUDIO DE HONGOS - C. Rojas
5. RESUMEN - M.A. Pastor Corrales
6. MESA REDONDA - Los Participantes

222224

INTRODUCCION

Marcial A. Pastor Corrales, Fitopatólogo, programa de frijol, CIAT

El objetivo de este seminario es presentar una visión panorámica de la biología molecular y de sus principales aplicaciones en la fitopatología.

La fitopatología es el estudio de las enfermedades de las plantas, sus agentes causales, las condiciones ambientales que las favorecen y los métodos para prevenirlas, manejarlas o controlarlas. Aunque algunas condiciones ambientales o factores abióticos, como la sequía o el exceso de agua, los extremos de temperatura, o de fertilidad del suelo, pueden causar enfermedades o predisposición a ellas, la mayoría de los fitopatólogos trabajan con enfermedades causadas por factores bióticos o patógenos como hongos, virus y bacterias. Por eso la importancia de conocer la diversidad y los mecanismos de los patógenos para causar enfermedad. Es igualmente importante el conocimiento adecuado de la interacción hospedero-patógeno..

Para la solución de muchas enfermedades, la fitopatólogos se han beneficiado del aporte de muchas ciencias como la micología, virología, química, genética, fisiología y las matemáticas. Sin embargo desde aproximadamente la década de los años setenta y sobretodo durante los años ochenta, la biología molecular esta influenciando profundamente la manera como los fitopatólogos estudian las enfermedades. Para muchos de los fitopatólogos que trabajan en las universidades y centros de investigación de los llamados países desarrollados de Europa y Norteamérica, la biología molecular representa el mas grande avance de las ciencias biológicas en el siglo XX y la principal razón de los grandes cambios que muchos departamentos de fitopatología siguen experimentando.

La profunda influencia de la biología molecular no se limita a la fitopatología. Continuamente se lee y escucha de nuevos avances generados por la biología molecular en las ciencias biológicas en general, así como en medicina, agricultura, zootecnia, industria y aun en la rama de la justicia (a través de la medicina forense). Por ejemplo en los Estados Unidos y en el Reino Unido, las cortes de justicia y las oficinas de inmigración, admiten evidencia obtenida con técnicas moleculares para resolver casos de criminalidad, parentesco dudoso y relación genética entre personas. Para los casos de criminalidad, los investigadores buscan en la víctima o en el lugar del crimen alguna evidencia (sangre, saliva, pelo, etc) de donde se pueda extraer ADN para construir una dactiloscopia genética o de ADN. La misma dactiloscopia genética (en Inglés es conocida como DNA fingerprinting), una técnica de la biología molecular que será explicada durante el seminario, también es utilizada en los laboratorios de fitopatología para la identificación y diagnóstico de patógenos.

Lo que ha hecho posible los avances de la biología molecular es el creciente y profundo conocimiento de la regulación de la expresión génica o sea de todo lo relacionado con el ADN. El ADN es la molécula biológica mas trascendental. En su estructura esta la información genética que determina la estructura de las proteínas, las instrucciones para que las células crezcan, se dividan y se diferencien en tejidos especializados así como en plantas, animales y otras seres vivientes. La molécula de ADN también tiene en su estructura las bases de la evolución y adaptación de las entidades biológicas al medio en que habitan.

Los avances de por ejemplo la biología molecular en algunos casos son espectaculares. Hasta hace muy poco en este siglo, la transferencia de genes específicos de un organismo cualquiera a otro no era posible. Ahora por el mejor entendimiento de la regulación de genes, en procariotos y eucariotos, esta transferencia de genes y su expresión en el organismo recipiente es posible usando técnicas, herramientas y procesos de la biología molecular. Como resultado de estos avances, se tienen por ejemplo plantas transgénicas a las cuales se les ha incorporado genes de otras especies de plantas o de bacterias, virus etc. Es así que, ya se tienen cultivos como tomate, tabaco, maíz, soya y otros a los que se les ha incorporado genes de resistencia a herbicidas obtenidos de microorganismos. Igualmente hay ahora plantas transgénicas de tomate y tabaco a las que se les ha incorporado el gen del capsido del virus comun del tabaco o del tomate. La expresión de estos genes en plantas de tabaco y tomate han resultado en plantas transgénicas con resistencia a estos virus de donde se obtuvo el gen transferido.

Otro de los usos mas comunes de la biología molecular en fitopatología es en el diagnóstico y en estudio de la diversidad de los patógenos. Técnicas conocidas como RFLP, PCR, RAPD, y otras se usan para la identificación de patógenos. Estas técnicas también están siendo muy utilizadas para entender la diversidad (razas, biotipos) y evolución de los patógenos. Este conocimiento es esencial cuando se utiliza la resistencia genética del hospedero para el manejo de los patógenos.

En resumen, los procedimientos, herramientas y técnicas de la biología molecular están influenciando y avanzando tremendamente el conocimiento en las ciencias biológicas incluyendo la fitopatología. Estas técnicas no son un reemplazo de las técnicas tradicionales de la fitopatología sino un complemento, que le permiten al fitopatólogo tener a su disposición métodos muy avanzados que hacen posible estudios y resultados hasta hace poco imposibles.

MARCADORES MOLECULARES: Metodología Jorge E. Mayer, CIAT

Los marcadores clásicos utilizados en el mejoramiento vegetal son los morfológicos y las isoenzimas. Ambos tienen la ventaja de ser simples en su evaluación y económicos en la ejecución. Sin embargo, ambos presentan la gran desventaja de que su cubrimiento del genoma sea más que deficiente. En el caso de la yuca por ejemplo, tenemos once marcadores morfológicos y una veintena de marcadores isoenzimáticos. Esto significa ante un genoma de alrededor de 10^9 bases, que en promedio tendríamos un marcador cada 3×10^7 bases. La realidad es aún peor, ya que generalmente algunos marcadores se aglomeran, dejando grandes regiones del genoma sin cubrir.

Cuáles son las exigencias impuestas a los marcadores moleculares y cuáles sus usos. Durante el proceso de la recombinación sexual de dos organismos, segmentos cromosomales del padre y de la madre se intercambian. Durante el proceso de segregación en las progenies avanzadas que resultan de cruces, grandes segmentos cromosomales de uno u otro padre se heredan, mientras que otros se pierden. En el mejoramiento vegetal es necesario hacer un seguimiento detallado de la herencia de características agronómicas importantes, tal como genes de resistencia, mientras que es deseable perder otras características, tales como bajo rendimiento. El seguimiento de múltiples características agronómicas al mismo tiempo es una labor muy ardua, a veces casi imposible cuando se trata de loci cuantitativos, es decir características multigénicas, que sólo se revelan en combinación.

Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para hacer un seguimiento detallado de cada una de estas características por separado, dada su herencia mendeliana, así como su independencia de factores externos, los cuales por el contrario sí influyen sobre los marcadores morfológicos e isoenzimáticos.

Una gran ventaja de los marcadores moleculares es su amplio cubrimiento del genoma. En principio depende del investigador, cuántos marcadores desea emplazar sobre el genoma. Cultivos importantes en los cuales se ha trabajado intensamente poseen entre 500 y 1000 marcadores diseminados por todo el genoma, lográndose así una densidad de un marcador cada 1-2 cM, lo que significa, dependiendo del tamaño del genoma, una distancia de alrededor de 10^5 - 10^6 bases entre marcador y marcador. Una característica agronómica flanqueada por dos marcadores a una distancia de 1 cM, tiene una probabilidad de 10^{-4} de no hallarse en el individuo que posea estos marcadores; esto se debe a que las probabilidades en este caso son multiplicativas.

Qué son los marcadores moleculares. Estos marcadores son secuencias de ADN localizables en el genoma. Para poder localizar su posición dentro del genoma, es necesario estudiar su ligamiento con otros marcadores. Para que un marcador sea útil, éste debe poseer alguna diferencia detectable entre los dos parentales que se están estudiando. Esto es lo que se denomina un polimorfismo. Un marcador polimórfico en una pareja de parentales, puede no serlo en otra, de modo que antes de utilizarlos para analizar una progenie, se debe escoger un set de marcadores polimórficos entre los parentales.

Cuál es el origen de los polimorfismos. Con el transcurso del tiempo van sucediendo una serie de mutaciones en los genomas de genotipos divergentes. Estas mutaciones pueden ser cambios simples de nucleótidos, inserciones o deleciones de secuencias más largas, o también inversiones o transposiciones de segmentos cromosomales. La frecuencia con que dos marcadores polimórficos se heredan juntos en una progenie, indica la distancia relativa que dos marcadores moleculares tienen entre sí, los más cercanos se encontrarán más frecuentemente juntos en individuos de la F₂ o en dobles haploides. La secuencia de marcadores a lo largo del cromosoma se va logrando calculando la frecuencia de cosegregación de tres puntos a la vez. Estos cálculos se llevan a cabo con programas de computador bastante sofisticados, ya que el número de operaciones es inmenso (progenies de alrededor de cien individuos y cientos de marcadores en cálculos reiterantes e iterativos).

Cómo se detectan los polimorfismos. La metodología más conocida es la del análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs). Una variante muy popular hoy en día son los RAPDs (random amplified polymorphic DNA), en la que se detectan polimorfismos amplificando segmentos de ADN al azar, utilizando diversos iniciadores de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Si los segmentos amplificados tienen longitudes distintas en los genotipos analizados, se detectará el polimorfismo. Alternativamente se pueden detectar cambios internos utilizando enzimas de restricción; si aparecen fragmentos de distintos tamaños, éstos se pueden detectar fácilmente por electroforesis. Una vez identificados los iniciadores que muestran polimorfismos, estos se evalúan igual que los RFLPs.

Técnicas utilizadas en marcadores moleculares

Transferencia capilar de ADN, también llamada Southern blot, en honor al que la publicó por vez primera, y además para distinguirla de la transferencia de ARN y de proteínas a membranas. Los fragmentos de ADN generados por las enzimas de restricción pueden ser separados de acuerdo a su peso molecular por electroforesis, utilizando como matriz geles de agarosa o de poliacrilamida. Una vez separados, los fragmentos se transfieren por capilaridad a membranas de nitrocelulosa o de nylon, obteniéndose de este modo una copia fiel del gel. El movimiento capilar del ADN puede ser pasivo o activo, utilizándose para ello vacío o presión positiva. El ADN transferido se fija a la membrana por acción de calor o de radiación UV.

Hibridización con sondas de ADN. Las hebras del ADN adherido a la membrana se pueden separar por la acción de sustancias denaturalizantes, por ejemplo alcali. Una vez separadas, éstas son accesibles a fragmentos de ADN complementarios. Las membranas pueden ser tratadas con un exceso de un fragmento de ADN conocido; solamente aquellos que hayan encontrado una región complementaria podrán adherirse fuertemente a la membrana y tolerar lavados con soluciones que desplazarán a los fragmentos que no hayan encontrado regiones complementarias. Si el fragmento está marcado, ya sea con isótopos radiactivos o con enzimas capaces de producir reacciones cromo- o luminogénicas, esto es lo que llamamos una sonda de ADN, se podrá detectar su posición sobre la membrana por autoradiografía o color.

Reacción de la Polimerasa en Cadena. La utilización de una polimerasa termoestable permite la repetición de múltiples ciclos de iniciación, polimerización y desnaturalización, sin necesidad de reponer la enzima. En cada uno de estos ciclos, la polimerasa utilizará oligonucleótidos iniciadores como matriz para empezar la síntesis de una cadena de ADN complementaria al segmento que le sigue al iniciador. Al utilizar dos oligonucleótidos que actúen como iniciadores de la reacción, al principio y al final del segmento a amplificar, se logra en cada ciclo duplicar la cantidad del segmento. En cuarenta ciclos se logra un factor de amplificación de alrededor de 10^{12} ; un femtogramo de ADN se convertiría en un miligramo, el cual fácilmente puede ser visualizado sin necesidad de marcaje radiactivo; esta es la gran ventaja de la técnica de PCR, ya no es necesaria la transferencia capilar ni la hibridización. La técnica además tiene usos múltiples en la clonación de genes.

Secuenciación del ADN. La amplificación al azar de segmentos de ADN generalmente produce varios fragmentos, de los cuales sólo uno muestra polimorfismo. En la técnica de los SCARs (sequence characterized amplified random DNA), se aísla el fragmento polimórfico y se procede a secuenciar por lo menos los extremos. Esta información luego se utiliza para generar oligonucleótidos más largos, que sólo amplifiquen el fragmento específico.

La técnica más utilizada para secuenciación del ADN es la de "terminación de cadenas por didesoxinucleótidos", de Sanger. El segmento a secuenciar se clona en un plásmido y la reacción se divide en cuatro partes iguales. Se procede a generar copias complementarias a la hebra a secuenciar utilizando una ADN polimerasa. La síntesis se interrumpe al azar utilizando cuatro didesoxinucleótidos, análogos a los cuatro desoxinucleótidos naturales. Cuando uno de estos análogos es incorporado en la cadena por la polimerasa, se interrumpe la elongación de la cadena. Los fragmentos así generados se separan por electroforesis, un carril para cada reacción. Si se incorporan nucleótidos o iniciadores marcados con radiactividad o fluorescencia, se podrá leer la secuencia del ADN localizando la posición relativa de los fragmentos; en un mismo carril todos los fragmentos terminan con el mismo nucleótido.

USO DE TECNICAS MOLECULARES PARA DIAGNOSIS E IDENTIFICACION DE PATOGENOS

María Mercedes Otoyá

Ciertos avances tecnológicos en el campo de la Biología Molecular fueron posibles en parte por los progresos en el campo de la Inmunología. Así mismo la Biología Molecular ha contribuido a entender mejor las bases de la diversidad de anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas que se producen en respuesta a la presencia de moléculas extrañas o antígenos, en el sistema circulatorio de los animales. Los anticuerpos funcionalmente se pueden caracterizar por su habilidad de fusionarse específicamente a los antígenos o a otras células. La región de un antígeno que interactúa con un anticuerpo se define como un epítotope y su tamaño depende del tamaño del sitio de unión. La interacción de un anticuerpo con un antígeno forma las bases de todas las técnicas inmunológicas.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Existen anticuerpos que son específicos para muchos antígenos diferentes. El uso de una mezcla de anticuerpos crea en algunos casos una variedad de problemas en técnicas inmunológicas, por esto la preparación de anticuerpos con especificidad definida ha sido la meta de la investigación inmunológica.

El primer aislamiento de anticuerpos vino de estudios de tumores de células tipo B, las cuales se encargan de la producción de anticuerpos específicos para un antígeno. Poblaciones clonales de estas células pueden ser propagadas como tumores en animales o crecidas en cultivo. Como todos los anticuerpos segregados por una célula tipo B son clones idénticos, estas células de los tumores son una fuente de anticuerpos. En el animal, los anticuerpos son sintetizados las células del plasma, las cuales no crecen en cultivo por lo que no pueden ser una fuente en vitro de anticuerpos.

Köhler y Milstein en 1975 desarrollaron una técnica que permite el crecimiento de poblaciones clonales de células que segregan anticuerpos con especificidad definida. La técnica consiste en fusionar o hibridizar células tipo B (segregadas por el bazo del animal inmunizado) con una célula mieloma (que son tumores de células tipo B). Estas células híbridas o hibridomas pueden ser mantenidas in vitro y continúan segregando anticuerpos con especificidad definida. Estos anticuerpos producidos por hibridomas son conocidos como Anticuerpos Monoclonales (AcMo).

La utilidad de los AcMo se debe a su especificidad para fusionarse, su homogeneidad y su habilidad para ser producidos en cantidades ilimitadas.

Las pruebas inmunológicas han sido empleadas en la fitopatología y virología desde hace mucho tiempo en:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| - Identificación | - Parentesco serológico |
| - Taxonomía | - Diagnósis |
| - Evolución | - Purificación de antígenos |
| - Aislamiento de secuencias | |

de virus, bacterias, hongos y micoplasmas.

Para demostrar el uso de AcMo se presentará la manera como estos se usan para identificar los virus que causan la enfermedad del frijol conocida como Mosaico Dorado.

BGMV (Bean Golden Mosaic Virus)

Virus del Mosaico Dorado del Frijol

La enfermedad conocida como Mosaico Dorado del Frijol es causada por un gemini virus (BGMV) y es gran importancia económica en las costas Pacífica y Atlántica de México, América Central, las islas del Caribe (Cuba y República Dominicana) y Brasil. No ocurre en Africa.

Evidencias recientes muestran que existe variación genética entre los geminivirus que causan el mosaico dorado lo que dificulta el control de esta enfermedad.

Las cepas del virus son diferentes; las de México y América Central se transmiten mecánicamente y son relativamente fáciles de purificar.

Las cepas de Brasil no se pueden transmitir mecánicamente y son difíciles de purificar.

Además, variedades reportadas como resistentes en Centro América desarrollan fuertes síntomas en Brasil.

En este caso en particular se utilizaron tres técnicas diferentes.

1. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)
2. DOT BLOT
3. WESTERN BLOT

1. ELISA

El principio de la técnica de ELISA consiste en un anticuerpo específico, el cual ha sido extraído de ratones después de inocularlo con el virus, es absorbido o colocado en una placa de microtitulación. Luego se añade a la placa una muestra que contenga el antígeno

(virus). El anticuerpo absorbido capturará al antígeno. Después de incubar, se añade a la placa un anticuerpo específico conjugado con una enzima, generalmente fosfatasa alcalina, y es absorbido al virus si es que está presente. Finalmente se fija un sustrato enzimático el cual será modificado por la enzima. El resultado es positivo cuando hay un cambio en la intensidad del color.

Para la técnica ELISA se usan muchos métodos como:

ELISA indirecto, Elisa directo competitivo, ELISA anticuerpo-sandwich, ELISA doble anticuerpo-sandwich y otros. Para este virus en especial se utilizaron protocolos del ELISA indirecto como :

- A. **PLATE TRAP ELISA.** El antígeno a ensayar se fija a la placa. El buffer de bloqueo es 1% BSA (Albúmina de suero bovino). Luego del período de incubación se le agrega el AcMo de ratón y después el anticuerpo antiratón con la enzima fosfatasa alcalina, finalmente se le agrega el sustrato y se mide luego el cambio de color.
- B. **ANTIBODY TRAP ELISA.** Anticuerpos policlonales de conejo se fijan a la placa, la superficie libre se bloquea con 1% BSA. Luego se añaden los antígenos que se van a ensayar (virus), los cuales son atrapados por los anticuerpos. Después se agregan los AcMo de ratón, seguidos por anticuerpos antiratón marcados con fosfatasa alcalina, para luego añadir el sustrato y leer el cambio de color.

Características de los AcMo utilizados en Virología:

3F7. Amplio espectro. Determina epítopes comunes para varios rangos de geminivirus. Parece un policlonal porque reacciona con muchos geminivirus incluyendo los BGMV, no reacciona con el virus del repollo, pero es monoclonal porque tienen una secuencia específica de aminoácidos. Se obtuvo por inmunizaciones con el virus del mosaico dorado parcialmente purificado.

2G5. Espectro limitado. Reacciona con un grupo determinado de cepas del virus de BGMV, como son los de Puerto Rico, Guatemala, República Dominicana, Costa Rica y El Salvador. No reacciona con las cepas de Brasil, México o Florida. También se obtuvo de inmunizaciones con el virus de BGMV completo parcialmente purificado.

5C5. Específico. Sólo reacciona con el virus de BGMV del Brasil. Se obtuvo de la proteína del cápside del virus del Brasil el cual no se pudo purificar por lo cual éste se clonó y la proteína del cápside se expresó en bacterias para luego inmunizar ratones con la proteína.

2. DOT BLOT

Consiste en hacer la misma reacción anterior pero utilizando membranas de nitrocelulosa o nylon como medio de soporte. El antígeno se inmoviliza sobre la membrana y se le agrega el AcMo, añadiendo luego un anticuerpo antiratón de cabra con fosfatasa alcalina contra el monoclonal, dando una coloración púrpura al agregar un sustrato específico de la enzima que generalmente es el BCIP (Bromo Cloro Indoxil Fosfato).

Cuando se quiere hacer una selección de muchas muestras con virus y diferentes anticuerpos se utiliza un aparato llamado Surf Blot el cual permite analizar múltiples anticuerpos sobre múltiples antígenos al mismo tiempo. La coloración púrpura indica reacción positiva.

3. WESTERN BLOT

Se utiliza también una membrana de nitrocelulosa o nylon para fijar el antígeno, pero hay que separar las proteínas del virus por electroforesis y transferirlas a la membrana para luego agregar el AcMo y el antiratón marcado con fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP.

Los AcMo están asociados con la banda correspondiente al peso molecular del virus. No reacciona con otro tipo de proteína.

Muchas veces para aumentar la sensibilidad de la reacción se utilizan anticuerpos marcados con biotina, la cual es reconocida por la estreptavidina, ésta a su vez está cargada de fosfatasa alcalina. Otra alternativa es la quimioluminiscencia, la cual se obtiene utilizando como sustrato para la fosfatasa alcalina un reactivo que emite luz, visualizándose luego sobre películas de rayos x.

SONDAS DE ADN

Una alternativa a las pruebas inmunológicas para diagnóstico e identificación de bacterias, hongos, virus, micoplasmas y otros, es el uso de sondas de ADN.

Como se explicó anteriormente las sondas de ADN son porciones del material genético o genoma de un patógeno, el cual ha sido clonado y amplificado para luego usarlo para detectar o identificar dicho patógeno. El alto nivel de especificidad de la sonda se debe al hecho de que muchas secuencias en un organismo son propias de éste. Esta secuencia específica se usa como sonda para detectar ese patógeno.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Los RFLPs resultan de la presencia o ausencia de sitios de restricción de las endonucleasas en el ADN de las bacterias, hongos, virus o plantas, o de la reorganización genómica que altera la proximidad de estos sitios.

Uno de los mayores problemas que existen en la patología convencional especialmente en cuarentena para certificación de semilla, es la diferenciación entre patovares de las bacterias y si las bacterias son patogénicas o no, además para ver la variación genética entre organismos.

Como ejemplo se mostrará el uso de las sondas y el análisis de RFLP en bacterias específicamente con las bacterias que causan la bacteriosis común del frijol.

CBB (Common Bacterial Blight)

Bacteriosis común del Frijol o Añublo bacteriano común del frijol

La bacteriosis común del frijol es una de las enfermedades de mayor distribución geográfica a nivel mundial, tiene gran importancia económica donde el cultivo de frijol coincide con la época de lluvias, clima cálido y alta humedad relativa. En América Latina es endémica y causa pérdidas en el rendimiento como en la calidad del grano. Esta enfermedad es causada por una bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (XCP) y su variante *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (XCPF) que produce un pigmento melaninoso marrón oscuro en medio de cultivo. Se ha reportado que los aislamientos que producen pigmento son mas virulentos aunque el pigmento no este asociado a la patogenicidad, además ambos patógenos producen en frijol síntomas idénticos.

Existen muchos vacíos en el conocimiento de la distribución y diversidad genética de estos patógenos, el mejoramiento genético para resistencia se ha venido realizando sin un entendimiento adecuado de estos patógenos. El conocimiento de esta diversidad genética es de suma importancia pero se ha realizado con métodos convencionales lo que ha sido muy difícil. No hay evidencia de que estos patógenos posean razas, por lo que las pruebas de patogenicidad no son muy útiles y los métodos bioquímicos y fisiológicos existentes no dan ninguna información sobre su diversidad genética.

Las técnica moleculares utilizadas son:

- | | | |
|------------------|--------|----------|
| 1. SONDAS de ADN | 2. PCR | 3. RAPDS |
| a. DOT BLOT | | |
| b. SQUASH BLOT | | |
| c. RFLP | | |

1.SONDAS DE ADN

Para el caso de XCP y XCPF se obtuvieron dos sondas específicas identificadas como de secuencia medianamente repetitiva. Una fue obtenida del ADN del genoma de XCP (P2) con un tamaño de 3.6 Kb. La otra sonda (P7) fue obtenida de plásmido de XCP y tiene un tamaño de 3.4 Kb. Las secuencias repetitivas contenidas en estos clones son diferentes basadas en su patrón de hibridización con el genoma total de XCP y XCPF.

Dentro de las técnicas de sondas de ADN podemos mencionar:

a. **SQUASH BLOT.** Método rápido y eficiente para diagnosis e identificación, en el cual se utiliza una membrana de nylon o nitrocelulosa como soporte. Las muestras con síntomas se maceran sobre la membrana hasta formar una mancha, luego el ADN en la membrana se fija, denaturaliza y neutraliza para hibridarlo con la sonda maracada, bien sea radioactiva o se puede utilizar la técnica de sondas frías por medio de la chemiluminiscencia.

Al igual que en los AcMo dependiendo de la especificidad de la sonda los resultados muestran mayor señal.

b. **DOT BLOT.** Al igual que el anterior se utiliza una membrana de nylon pero con la ayuda de un aparato de succión al vacío, en este caso llamado Hybri-Dot, o también se puede manualmente, se coloca el extracto del macerado sobre la membrana formando puntos uniformes. El DNA que está en las membranas se fija, denaturaliza y neutraliza para luego hibridarlo con la sonda de ADN respectiva.

c. **RFLP.** Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción. Este método es también muy utilizado para identificación y diagnosis. Después de una extracción total de ADN de los aislamientos o cepas con que se trabaje, en este caso son aislamientos de XCP y XCPF de varias partes del mundo, se hacen digestiones con enzimas de restricción, como Eco RI, las cuales cortan el ADN en fragmentos de diferentes tamaños. Para verificar estos cortes los fragmentos se separan por electroforésis en geles de que se tiñen con bromuro de etidio para poder observarlos en un transiluminador de luz UV. Como trabajar con estos geles es difícil, los fragmentos observados se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa, usada como medio de soporte, mediante la técnica de SOUTHERN BLOT quedando en la misma posición que estaban en el gel. A esta membrana al igual que las de Squash y Dot Blot se la fija, denatura y neutraliza para hibridarla con las sonda de ADN respectiva.

Con estos resultados se ha permitido diseñar un mapa más detallado de la distribución y de la diversidad de XCP y de XCPF en las regiones frijoleras de América Latina donde la bacteriosis común es importante.

Las sondas de ADN

- Identifican XCP y XCPF
- Diferencian XCP y XCPF patogénicas de las xanthomonas no patogénicas
- No hibridizan con otras bacterias patogénicas del frijol
- No hibridizan con otros patovares de XC por su especificidad
- Muestran diversidad genética de XCP y XCPF
- Separan aislamientos de XCP de los de XCPF
- Muestran polimorfismo entre aislamientos de XCP y entre aislamientos de XCPF

BIOLOGIA MOLECULAR PARA ESTUDIAR DIVERSIDAD GENETICA DE PATOGENOS

Clemencia Rojas

CIAT - Fitopatología de Arroz

Uno de los principales objetivos de la fitopatología es el de buscar estrategias para el control de las enfermedades. En el caso de las enfermedades producidas por microorganismos, como bacterias y hongos, algunas de las estrategias se basan en la resistencia natural de las variedades o en el uso de químicos. Desafortunadamente en muchos casos, estas medidas son de corta duración ya que los patógenos presentan una alta diversidad genética que les permite evolucionar y adaptarse a las medidas de control.

La diversidad genética se origina por diversos mecanismos genéticos que confieren variabilidad. La importancia de estudiar la diversidad genética radica en que permite entender como ha evolucionado, a la diversidad patogénica y como esta distribuida en el espacio y en el tiempo con el fin de establecer una mejor estrategia de control.

Dada la alta diversidad genética que suelen presentar los patógenos y, para simplificar el problema de su estudio, se han agrupado con base en ciertos marcadores que muestran diferencias y similitudes entre los aislamientos (polimorfismo). Los marcadores que se han usado a través del tiempo son: el marcador de virulencia del patógeno, marcadores morfológicos, fisiológicos o bioquímicos. Estos últimos junto con las diferentes pruebas inmunológicas usualmente no se pueden correlacionar con el rango de hospedero y por lo tanto al no ser de gran utilidad para estudiar la diversidad genética se han usado marcadores moleculares.

MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares para estudiar diversidad genética están basados en las diferencias en las separación electroforética de proteínas y de DNA.

- ISOENZIMAS

La diversidad genética se manifiesta en cambios en la estructura del material genético (DNA); puesto que es el DNA el que codifica las proteínas, un cambio en este originara una variación en las proteínas y, de esta manera, para una misma proteína se verán diferencias en su migración electroforética al compararla entre diferentes aislamientos de un patógeno.

Con *Phaeisariopsis griseola* se muestra una correlación entre dos patrones posibles de isoenzimas con las dos tipos de grano que presentan las variedades de grano que infectan.

Las desventajas de las isoenzimas es que son inestables pues dependen de la expresión génica, son limitadas para muchos patógenos y para otros no ha habido suficiente tiempo en la evolución para que las isoenzimas muestren suficiente polimorfismo .

Para detectar directamente la variación existente en el DNA, se usan dos técnicas:

- RFLP's

Cuando se presentan modificaciones en la secuencia del DNA, se modifican los sitios de corte de las enzimas de restricción y por lo tanto se produce una variación en la migración electroforética de los fragmentos originados de modo que, para los diferentes aislamientos de un patógeno se verán variaciones en la posición de los mismos.

Para agrupar los aislamientos de un patógeno con respecto al patrón de RFLP se tiene en cuenta el numero de fragmentos compartidas entre ellos; la proporción de fragmentos compartidos por dos aislamientos esta correlacionada directamente con el grado de parentesco genético.

Esta técnica ha permitido correlacionar, en muchos casos, los patrones de fragmentos de DNA con un hospedero o un rango de hospedero y por lo tanto es de gran valor al estudiar la diversidad genética.

En el hongo del arroz *Magnaporthe grisea* se observa un numero de fragmentos cuando se trata de aislamientos patógenos de arroz en contraste con los aislamientos patógenos de malezas; también se observa que los aislamientos que presentan un determinado patrón afectan variedades específicas de arroz.

Con *Fusarium oxysporum* se ha mostrado un mismo patrón cuando los aislamientos provienen del mismo lugar geográfico o cuando pertenecen a la misma raza o *formae specialis*.

Con *Erysiphe graminis* la variación se detecta entre cepas de patógeno que afectan diferentes hospederos pero dentro de un mismo hospedero se pueden detectar diferentes patrones ya que este hongo presenta reproducción sexual.

- PCR

Las variaciones en el DNA originan diferencias en los sitios que los primers y la enzima DNA polimerasa reconocen para amplificar de modo que la diversidad genética se detecta como la presencia o ausencia de secuencias amplificadas de DNA y los diferentes aislamientos mostraran un patrón de amplificación.

Con *Cochliobolus carbonum* y *Fusarium oxysporum*, se estudio la relación genética entre razas y entre especies similares con el fin de distinguir las razas por los productos de amplificación de PCR.

Para el primero, los patrones de amplificación diferenciaron mas de 7 especies, pero solamente diferenciaron una de las razas.

Para el segundo, a pesar de que muchos primers mostraron polimorfismo, solo se pudo distinguir una raza la cual mostraba siempre un patrón conservado de amplificación.

El hecho de no poder discriminar entre razas con base en los patrones de amplificación se explica debido a que los diferentes aislamientos muestran un alto grado de parentesco genético y por lo tanto es difícil encontrar primers que los puedan discriminar.

En conclusión, la biología molecular es una herramienta de gran utilidad en el estudio de la diversidad genética de patógenos de plantas pues estudiando directamente la variación en el DNA se pueden encaminar los programas de mejoramiento para obtener variedades resistentes a clones genéticos y no a aislamientos individuales; además estudiando como ocurren las modificaciones en el DNA de un patógeno se puede predecir como ocurrirá su evolución y adelantarse a ella aplicando las medidas de control adecuadas.

Con RAPD para *Fusarium oxysporum* se evaluaron 40 primers y 14 de ellos mostraron mayor polimorfismo; la raza 2 muestra un patrón consercado de 2 bandas(Filmina); las razas 1,5,6 muestran mayor polimorfismo (Filmina).

Con PCR no se detecto un agrupamiento típico de raza en 1,5,6.

Este método presenta las ventajas de ser relativamente simple y que rápidamente se pueden estudiar un gran numero de individuos con una muestra mínima de DNA.

La importancia de usar métodos de biología molecular radica en que, estudiando directamente la variación en el DNA se pueden encaminar los programas de mejoramiento para obtener variedades resistentes a clones genéticos y no a aislamientos individuales; además, estudiando como ocurren las modificaciones en el DNA de un patógeno se puede predecir como ocurrirá su evolución y adelantarse a ella aplicando las medidas de control adecuadas.