

13.- Avances en las tecnologías de diagnóstico en el laboratorio de Fitopatología, técnicas moleculares: PCR-REAL TIME

INTRODUCCIÓN.

En el año 2012 el Laboratorio de Fitopatología comienza a establecer la PCR como técnica de rutina para el diagnóstico de virus.

Comparada con la técnica ELISA, técnica empleada hasta el momento para la identificación de virus, la PCR es más sensible, precisa, rápida, aplicable a un mayor abanico de muestras y, por tanto, más económica a la larga.

Ese mismo año se adquiere un equipo de PCR en su variante a Tiempo Real (PCR – Real Time), reduciendo el tiempo y el coste del análisis.

FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA PCR.

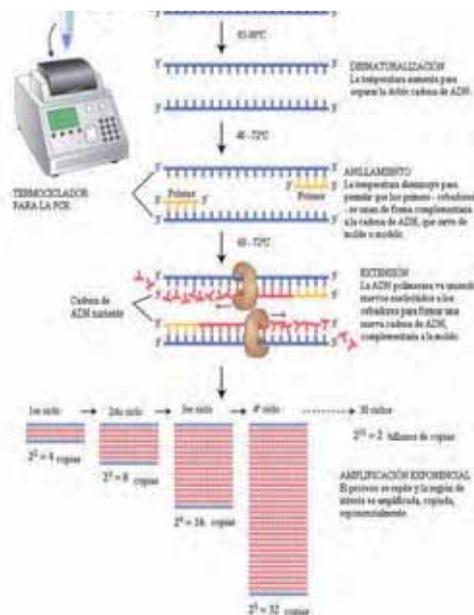
Partiendo de un material genético (ADN) extraído previamente, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método para la amplificación de regiones específicas del ADN produciendo cantidades perceptibles y medibles. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN. Es una técnica que recrea una actividad propia de las células utilizando para ello ciclos de diferentes temperaturas. Se emplean termocicladores que permiten alternar ciclos de altas y bajas temperaturas para la separación ó desnaturalización del ADN, unión de los cebadores y finalizar con un paso de extensión o copia completa del fragmento identificativo de la especie a determinar. Estos tres pasos se repiten hasta obtener la cantidad de material genético (copias del fragmento) perceptible por el ojo humano tras su tinción.

Las temperaturas, el tiempo aplicado y el número de repeticiones dependen de la especie a identificar.

La PCR se considera una técnica más versátil y económica que la técnica ELISA para la variedad de muestras a procesar, debido a que los reactivos necesarios para una especie u otra de patógeno difieren únicamente en los fragmentos espe-

cíficos o cebadores, de precio menor y durabilidad mayor que los sueros para la técnica ELISA. El resto de variables, como los parámetros de temperatura, tiempo y nº de repeticiones, son perfectamente ajustables y optimizables a través del sistema informático del equipo de la PCR.

La mayoría de virus poseen ARN como material genético, en vez de ADN, y para ello se necesita un paso previo para pasar el ARN a ADN que es el punto de partida para la técnica PCR.



Esquema del proceso de la PCR.

VARIANTE PCR A TIEMPO REAL

La única diferencia radica en el método de detección de los fragmentos amplificados, simplificando la técnica en cuanto a equipo, materiales, tiempo y manejo de las muestras, disminuyendo así las posibilidades de error y/o de contaminación. La PCR a Tiempo Real (Q-PCR) se basa en el uso de una sustancia fluorescente visible y medible por el equipo y que el técnico visualiza a través de un programa informático a la vez que ocurre la

amplificación, de ahí su denominación “a Tiempo Real”. Se trata de una detección más sensible que en el caso de la PCR convencional, confiriendo la ventaja principal de detectar cantidades de ADN ínfimas del orden de nanogramos (10^{-9} g).

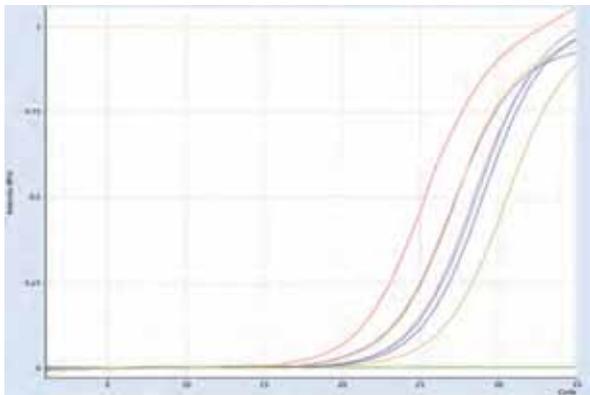
La ausencia o presencia de la señal fluorescente indica la ausencia o presencia de la especie a identificar y/o confirmar. Esta técnica es una herramienta ampliamente utilizada en la confirmación o en el descarte de un diagnóstico sintomático previo.

USO EN EL LABORATORIO FITOPATOLÓGICO - Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate: TYLCV

Para la implantación de la PCR de forma rutinaria, en el 2012 se optimizó el protocolo de diagnóstico del virus de la cuchara en el tomate, TYLCV. Para verificar el éxito de la técnica se planteó comenzar con dicho virus debido a:

- amplia distribución en la isla
- sintomatología típica y fácilmente reconocible
- distribución homogénea en la planta
- apoyo bibliográfico importante
- único virus hortícola conocido con ADN en vez de ARN como material genético.

Tras la extracción del ADN del TYLCV por el método optimizado de Accotto et al., y la amplificación del mismo por Q – PCR, se comprobó que se trata de una técnica que implica menor tiempo y gasto para la detección de este virus en comparación con la técnica ELISA, anteriormente utilizada.



Gráfica de la amplificación por Q – PCR de diferentes muestras de plantas de tomate. La presencia de una curva exponencial implica la presencia del virus TYLCV en las muestras. Las dos mues-

tras que no presentan una curva, en verde, corresponden a un negativo y a un blanco, cuya ausencia de amplificación indica que no ha habido contaminación y que los cebadores no amplifican otra región del genoma y, por tanto, los resultados son fiables. Así mismo, hay un control positivo que se corresponde a la curva roja.

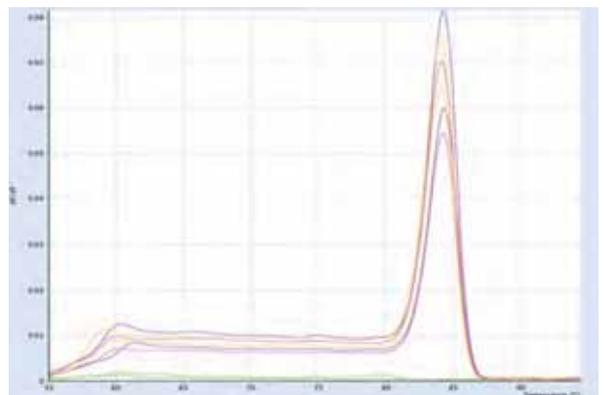
Eje Y: unidades de fluoróforo SYBR Green captadas por el sensor del equipo de la Q – PCR emitidas durante la amplificación. Sin amplificación no hay emisión, RFU = 0.

Eje X: indica el ciclo durante el cual la cantidad de copias del fragmento en cuestión supera el umbral de copias cuya fluorescencia puede ser captada.

- Virus de la clorosis del tomate: ToCV

Después del éxito con el TYLCV se comenzó a optimizar la detección por PCR - RT del virus de la clorosis del tomate, ToCV. Este virus, como la gran mayoría, presenta ARN como material genético.

El interés en la identificación del ToCV mediante la PCR se debe a que no se han descrito otras técnicas para su detección. De las muestras recogidas para la prueba hubo resultados positivos y negativos. La PCR es una técnica fiable en cuanto a resultados positivos, sin embargo en casos como el ToCV, cuya distribución en las plantas es poco



Gráfica de la Tm de unas muestras de plantas de tomate. Las muestras están por duplicado, mismo color., así como el blanco, en verde. Tras la PCR en sí podemos hallar la Tm, que es la temperatura a la cual la mitad de las copias de ADN están desnaturalizadas.

La Tm es una herramienta muy útil que en nuestro caso la utilizamos con el fin de comprobar la “pureza” de la amplificación. Dado que copiamos siempre el mismo fragmento, una amplificación correcta implica la aparición de un solo pico y a una temperatura prácticamente igual en todas las muestras donde haya habido amplificación. El tamaño del pico es proporcional a la cantidad de copias del fragmento en esa muestra. La temperatura del pico es también proporcional al tamaño del fragmento, lo que nos ayuda a diferir entre amplificaciones erróneas o por contaminación en el caso de aparición de otros picos, que en teoría siempre serán de menor altitud y a diferente temperatura, normalmente menor.

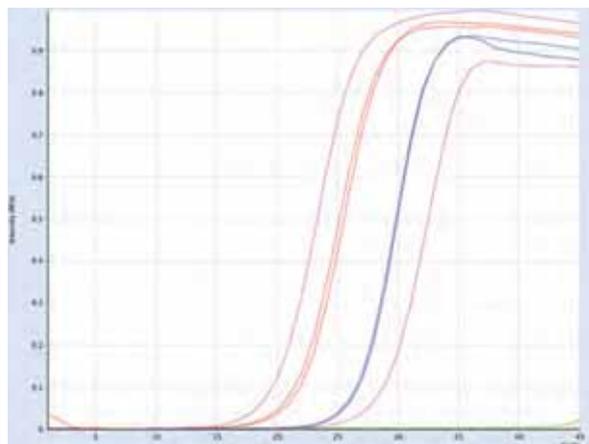
Hongos: *Fusarium spp.*

La identificación de hongos fitopatógenos a nivel de especie requiere de un largo proceso de siembras y resiembras en diferentes medios de cultivo con el fin de observar el crecimiento y la expresión del hongo en cada uno de ellos. Todo el proceso implica mucho tiempo de espera y un gasto de material y medios elevado, sin la certeza de obtener una conclusión clara.

La PCR no sustituye el diagnóstico previo sobre un medio de cultivo, pero sí que permite acelerar el proceso y confirmar o descartar en menor tiempo la presencia de fitopatógenos de interés para el cultivo.

Durante mediados de 2012 se comenzaron los trabajos con el género *Fusarium spp.*, que no sólo es un género muy amplio, sino que incluye especies y subespecies patógenas junto con otras consideras más bien saprófitas, difícilmente diferenciables entre sí por los métodos clásicos de estudio morfológico. Por el momento se ha trabajado con *Fusarium oxysporum f.sp. canariensis*, comprobando la técnica y obteniendo resultados positivos sobre hongos ya identificados de la micoteca del Laboratorio.

El mayor obstáculo por el momento es la extracción del ADN fúngico, pues se pretende ser lo menos dependiente de nuevos aparatos y productos (“kits”), que elevarían el coste de la técnica.



Gráfica de la amplificación por duplicado de 3 muestras de palmera canaria más los 2 blancos sin amplificar. Las curvas rosas y azúles son controles positivos procedentes de la micoteca del Laboratorio de Fitopatología, y las curvas rojas corresponden a una muestra externa.

Hongos: *Thielaviopsis spp.*

Actualmente se está trabajando en optimizar el protocolo para diferenciar, mediante PCR - RT combinada con enzimas restrictasas, entre las dos especies fitopatógenas del género *Thielaviopsis* que amenazan las palmeras, *T. paradoxa* y *T.punctulata*.

Bacterias: *HuangLongBing.*

Triozia erytrae, o Psila Africana de los cítricos, es una plaga que se ha detectado en los últimos años en Canarias. La Psila es un hemíptero, que aparte de “abullonar” las hojas, presenta una amenaza para los cultivos de cítricos al ser un transmisor potencial de una bacteria que causa el “Amarilleo de los brotes”, enfermedad denominada **HLB o Huanglongbing.**

Se trata de una bacteria filamentosa Gram negativa localizada en los tubos cribosos del floema, donde puede ocasionar obstrucciones al crecer y reducir el suministro de nutrientes a los diferentes órganos de la planta, llegando a causar la muerte del hospedador.

El agente responsable del HLB ha sido caracterizado por métodos moleculares como tres espe-

cies “candidatas” (no cultivables in vitro) del género *Liberibacter* (*Ca. Liberibacter africanus*, *L. asiaticus* y *L. americanus*). La *Trioza erytreae* es la especie de Psila identificada en Canarias y es transmisora de la especie *Ca. L. africanus*.

En el Laboratorio de Fitopatología, hemos comenzado a realizar muestreos para evaluar el grado de incidencia de la plaga y la ausencia, o presencia, de *C. Liberibacter africanus* utilizando la técnica PCR-Real Time.

Actualmente no se ha detectado la bacteria en Europa, pero debido a la gravedad de los daños que produce en los cultivos y que es una enfermedad de cuarentena, se ha optado por tomar las medidas preventivas para su temprana detección.



Hoja de cítrico “abullonada”, síntoma típico del ataque por Psila Africana. En la foto se aprecia así mismo, ninfas y un adulto de la plaga.



Sintomatología de la enfermedad HLB sobre hojas de cítrico

BIBLIOGRAFÍA

- GENÉTICA, J.F. Griffiths et al., 7ª edición, Ed. Mc Graw-Hill - Interamericana, 2002.
- ENFERMEDADES DEL TOMATE, D. Blancard et al., Ed. Mundi – Prensa, 2011
- Paolo Accotto, G., Navas Castillo, J., Noris E., Moriones, E., Louro D. “Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe”. *European Journal of Plant Pathology* (2000) 106:179-186.

- M.I. Font, A.M. Vaira, G.P. Accotto, A. Lacasa, J. Serra, J. Gomila, M. Juárez, A.I. Espino, M.C. Jordá. “Amarilleos en los cultivos de tomate asociados a Tomato chlorosis virus (ToCV) y Tomato infectious chlorosis virus (TICV) en España”. *Bol. San. Veg. Plagas*, (2003) 29:109-121.
- J. Hernández, A. Espino, J.M. Rodríguez, A. Pérez, M. León, P. Abad and J. Armengol. “Survey of diseases caused by *Fusarium* spp. on palm trees in the Canary Islands”. *Phytopathol. Mediterr.* (2010) 49, 84-88.
- E. Álvarez, G.A. Llano, J.B. Loke and M.L. Chacón. “Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil”. *J. Phytopathol* (2012) 160:690-700.
- USDA, New Pests Response Guidelines “Citrus Greening Disease”, 1ª edición, 2008.
- M.C. Vives, M.M. López, L. Navarro. “Evitar el HUANGLONGBING”. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA, Revista Levante Agrícola Noviembre 2009.