

14.- Detección de *Phytophthora cinnamomi* por técnicas moleculares.

1.- Introducción.

Phytophthora spp es uno de los patógenos más importantes que afectan a los vegetales, tanto cultivos agrícolas, ornamentales como árboles forestales, provocando graves pérdidas económicas.

En Gran Canaria, las especies de *Phytophthora* más importantes por los daños y cultivos a los que afectan son *P. infestans* en papa, *P. cinnamomi* en aguacatero, así como varias especies de *Phytophthoras* en cítricos, entre otros cultivos.

Las especies de *Phytophthora* se clasificaban hasta hace poco en el Reino Fungi, pero actualmente se han integrado en el Orden Peronosporales, dentro de la Clase Oomycetos del Reino Cromista. De manera que no son verdaderos hongos, por lo que se requieren técnicas especiales para su aislamiento.

A excepción de determinadas *Phytophthoras* como *P. infestans*, cuyos síntomas y daños afectan fundamentalmente a la parte aérea, ramas jóvenes y brotes, la mayoría de especies de este Oomycete producen pudriciones de la raíz y base del tallo. Las plantas que sufren dichas pudriciones, principalmente árboles y arbustos, por lo general muestran síntomas típicos de sequía y deficiencia nutricional, tales como clorosis o amarilleo, hojas y frutos de pequeño tamaño. Cuando estos síntomas aparecen, la enfermedad ya está avanzada, y la necrosis en las raíces absorbentes es evidente.

El control de las enfermedades producidas por este Oomycete es difícil y se debe basar en la prevención, por ello su detección temprana es

fundamental para evitar su dispersión al resto del cultivo.

La detección de este patógeno es complicada debido a su ciclo biológico y a su lento crecimiento en cultivo *in vitro* frente a numerosos hongos (*Pythium*, *Fusarium*...) y bacterias saprófitas lo cual dificulta y enlentece su aislamiento. A esto se suma la laboriosa y compleja identificación morfológica inter e intraespecífica.

Por todo ello se han desarrollado distintas técnicas de aislamiento como es el uso de cebos (baiting) o medios de cultivos selectivos. Estos métodos conllevan el empleo de materiales no siempre disponibles en nuestras condiciones climáticas, tal es el caso de determinados tipos de cebos como hojas de *Quercus spp* y/o el uso de antibióticos de elevado coste, como la pimaricina. Además, estos métodos clásicos de detección de *Phytophthora* son muy tediosos, necesitan emplear mucho tiempo y son propensos a producir falsos negativos (Huberli et al. 2000).

Por otro lado, se han desarrollado distintos test serológicos para la detección rápida de especies de *Phytophthora*. El problema asociado a estos test es la falta de sensibilidad y especificidad (Pettit et al., 2002). Por ejemplo, se produce reacción cruzada con *Pythium spp*. Este último es mucho más abundante en el ambiente que *Phytophthora spp*. por lo que utilizar este kit implicaría obtener falsos positivos.

Actualmente, la técnica molecular PCR, reacción en cadena de la polimerasa, cada vez está siendo más usada para la identificación y detección de patógenos debido a su alta sensibilidad y rapidez, pudiendo incluso tener los resultados en 1-2 días. Estas

nuevas técnicas moleculares pueden determinar diferencias genéticas o similitudes entre especies y en combinación con datos morfológicos permiten resolver cuestiones relativas a la separación y/o fusión entre especies (Erwin and Ribeiro, 1996).

2.- Objetivos.

La dificultad de detección de *Phytophthora* mediante baiting y la compleja identificación morfológica mediante microscopía óptica ha llevado a tratar de implementar dichas técnicas con la PCR. Este ensayo se ha basado en identificar a *Phytophthora cinnamomi* mediante PCR a través del uso directo de pétalos inmaduros de clavel procedentes de baiting.

3.- Materiales y métodos.

Muestras

Se utilizó suelo procedente de la rizosfera de aguacateros y otros frutales próximos a ejemplares con decaimiento, típicos síntomas de *Phytophthora*.

Baiting

El baiting es un método indirecto de aislamiento consistente en utilizar cebos biológicos como trampas. Las muestras de tierra tamizadas se depositaron en contenedores plásticos y se cubrieron con el mismo volumen de agua destilada. Asentada la tierra se retiraron los restos de materia orgánica de la superficie del agua y se pusieron los pétalos de clavel inmaduros.

Los baiting se mantuvieron a temperatura ambiente y diariamente bajo lupa binocular se observó la presencia de los esporangios típicos de *Phytophthora* próximos en los márgenes de los pétalos de clavel.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de CTAB (Möler et al., 1992) a partir de pétalos con esporangios procedentes de los baiting.

Primer y amplificación de ADN

Los primers utilizados para llevar a cabo la PCR pertenecen al gen Lpv (P. Kong et al., 2003), el cual codifica para una proteína de las zoosporas, específica de *P. cinnamomi*. El fragmento que amplifica es de 450-pb (tabla 1).

Se realizaron dos tipos de PCR, convencional y a tiempo real.

Condiciones de PCR convencional: 20 µl de reacción de PCR conteniendo 2 µl de muestra de DNA, 10 µl KOD Hot Start Master Mix, 0,6 µl de cada primer forward y reverse, y 6,8 µl agua de PCR. La reacción fue llevada a cabo en un MasterCycler personal (Eppendorf).

Condiciones de PCR a tiempo real: 20 µl de reacción de PCR conteniendo 2 µl de muestra de DNA, 10 µl Fast Faster Essential DNA Green Master, 1 µl de cada primer forward y reverse y 6 µl agua de PCR. La reacción fue llevada a cabo en un LighCycler Nano (Roche).

Programación de los termocicladores: desnaturalización inicial de 96 °C 2 min, seguido por 39 ciclos a 94 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, y una etapa final de extensión de 72 °C durante 10 min.

5 µl del producto de PCR convencional de cada reacción fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Primer	Sentido	Secuencia (5'-3')	Localización	Tamaño
LPV3	Forward	GTGCAGACTGTCGATGTG	Lpv (AF315064) 117-134 nt 550-567 nt	450 bp
	Reverse	GAACCACAACAGGCACGT		

Tabla 1. Primers utilizados para la identificación de *Phytophthora cinnamomi*.

4.- Resultados.

Los baiting (figura 1) que manifestaron esporangios a la lupa (figura 2) se capturaron para su caracterización morfológica mediante microscopía óptica (figura 3). Esta primera observación permite una aproximación al diagnóstico y/o complementa a la identificación molecular. No obs-

granja

14.- Detección de *Phytophthora cinnamomi* por técnicas moleculares

tante, debido a que la observación de esporangios de los baiting es compleja y, por otro lado, a que la técnica PCR es de una alta sensibilidad, se analizaron también mediante PCR baiting sin emisión aparente de esporangios.



Fig.1: Baitings.



Fig.2: Esporangios observados a la lupa.

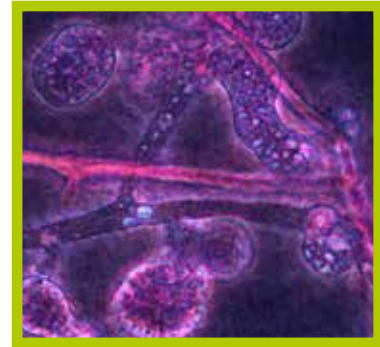


Fig.3: Morfología de *Phytophthora cinnamomi* al microscopio óptico

Respecto a la PCR a tiempo real, se analizaron varias especies de *Phytophthoras*, otros hongos como control negativo (*Fusarium*, *Thielaviopsis*), pétalos estériles y un blanco. Los resultados permitieron detectar a *P.cinnamomi* con un valor de

CT de 23 y una Tm de 91 °C aprox (figura 4). Resto de *Phytophthoras*, otros hongos, pétalo estéril y blanco amplificaron con una Tm de 78 °C aproximadamente, sin embargo, las CT fueron mayores o próximas a 35.

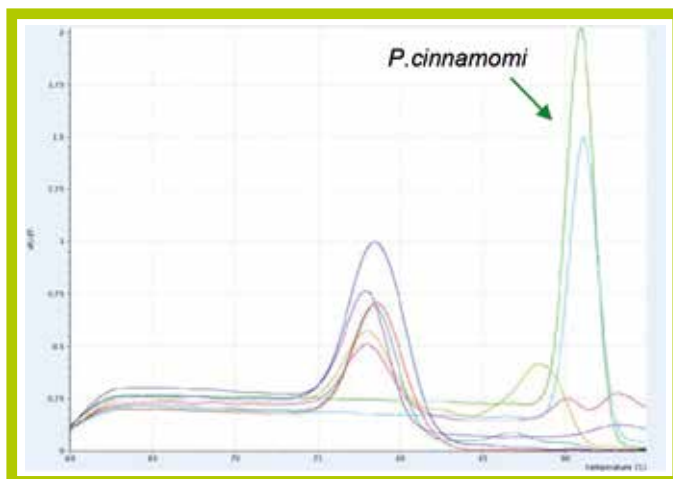


Fig.4: Especificidad del primer *Phytophthora cinnamomi* en PCR a tiempo real. Líneas verdes muestran la detección del patógeno.

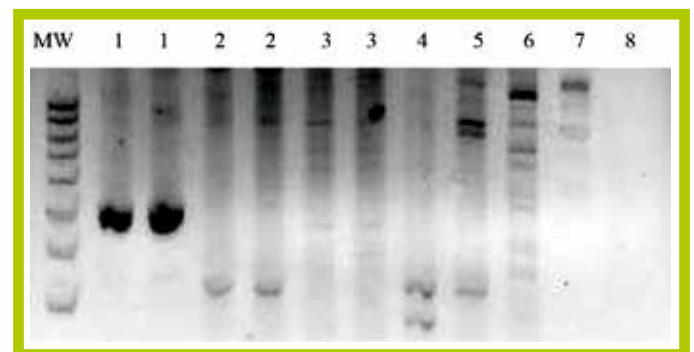


Fig.5: Especificidad del primer de *Phytophthora cinnamomi* en PCR convencional. Se extrajo ADN de distintas *Phytophthora*. MW, marcador; 1, *P. cinnamomi* en aguacate; 2, *P. sp*; 3, *P. sp* en cítrico; 4, *P. sp*, 5, *P. sp* en aguacate; 6, *Pythium*; 7, pétalo estéril; 8, blanco

En cuanto a la PCR convencional, se analizaron 5 especies de *Phytophthora* obtenidas de distintas muestras vegetales, *Pythium* y pétalo esteril. Los aislados fueron analizados con el primer LPV3 con el fin de determinar la existencia de *P. cinnamomi*. La electroforesis obtenida del producto de PCR presentó una sola banda de 450 pb en la muestra número 1 la cual correspondía a *P. cinnamomi*. El resto de muestras resultaron negativas para *P. cinnamomi* debido a la ausencia del fragmento específico 450 pb.

5.- Discusión y conclusión.

Los resultados obtenidos demuestran que es viable realizar tanto PCR a tiempo real como convencional para el diagnóstico de este Oomiceto. La extracción directa de ADN de *Phytophthora* a partir de pétalos de baiting permite la detección de este patógeno sin necesidad de realizar siembras de pétalos y/o esporangios en distintos medios de cultivo. Esto permitiría reducir el tiempo de diagnóstico y costes económicos.

Estos primeros resultados son alentadores aunque para establecer esta metodología de forma rutinaria en la detección del género *Phytophthora* se necesita confirmarlo en un mayor número de muestras.

Por otro lado, habría que tener en cuenta y mejorar para futuros ensayos las condiciones de PCR y cantidad del ADN ya que se están obteniendo bandas inespecíficas. Los primers empleados han sido previamente estudiados para la detección de *P. cinnamomi* en tierras infectadas artificialmente (P. Kong, 2003) obteniéndose resultados satisfactorios.

6.- Bibliografía.

- Drenth, A and Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Versión 1.0. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane. Australia.
- Erwin, D.C. and O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul. Minnesota: APS Press.
- Hüberli D. Tommerup IC, Hardy GESTJ. 2000. False-negative isolations or absence of lesions may cause mis-diagnosis of diseased plants infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Plant Pathology* 29:164-169
- Jung, T. 2013. Training Course "Recognition of Disease Symptoms, Isolation and Identification of *Phytophthora* species". Sustainable Forest Research Institute. University of Valladolid. Palencia. Spain.
- Kong, P., Hong, C.X and Richardson, P.A. 2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the *Lpv* putative storage protein genes. *Plant Pathology* (2003)52, 681-693.
- Möler, E.M, Bahnweg, G, Sandermann, H and Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infect plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20, No. 22 6115-6116.
- Pettitt TR, Wakeham AJ, Wainwright MF, White JG. 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology* 51, 720-7.