

ALEIKA YGLESIÁ,
MARICELA DÍAZ
Y MANUEL RAMOS*

VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL RAQUITISMO EN LOS RETOÑOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN CUBA

RESUMEN

El diagnóstico del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar (RSD), se dificulta por la poca especificidad de sus síntomas y la naturaleza fastidiosa de la fitobacteria (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), por lo que los métodos moleculares continúan siendo los más empleados para su detección. En este trabajo, se realiza la estandarización, evaluación y comparación de tres métodos moleculares (PCR, PCR anidada e hibridación no radiactiva, HANnr). Para el desarrollo de las técnicas de PCR se emplearon iniciadores específicos, derivados de la región intergénica de los genes ARN ribosomal 16-23S, que permitieron la amplificación de las bandas de 438 y 229 pb que identifican a *L. xyli* subsp. *xyli*. El producto de amplificación fue utilizado como sonda específica para el desarrollo y validación de la HANnr. Se validaron los métodos con valores de eficacia superiores a 95 % y parámetros de desempeño que se mantuvieron entre 98 y 100 %. Estos valores de sensibilidad obtenidos, unidos a las posibilidades que presenta la HANnr de realizar diagnósticos masivos, la convierten en la alternativa de mayor preferencia para la detección rápida y sensible de esta bacteria en los programas nacionales de certificación de semilla, cuarentena y mejoramiento.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de la caña de azúcar constituyen, mundialmente, uno de los principales factores negativos para la producción azucarera. Entre las patologías bacterianas, se encuentran la escaldadura foliar, provocada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby Dowson), y el raquitismo de los retoños (RSD) (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) (Davis). Esta última está presente en Cuba desde 1953 y en la actualidad se considera una de las más importantes, por sus altos índices de propagación e intensidad, así como por las considerables pérdidas que ha provocado (60 %), en los últimos años (China y col., 2005).

El diagnóstico del RSD se ha dificultado, debido a la ausencia de síntomas que puedan ser atribuidos específicamente a la enfermedad y las propias características de la fitobacteria que lo produce —que se desarrolla pobremente en medios de cultivo y se multiplica lentamente en el hospedante—. (Davis, 2005).

Como consecuencia, durante varios años, esta enfermedad se ha diagnosticado, fundamentalmente, mediante el empleo de la microscopía de contraste de fase y, más recientemente, con el uso de métodos inmunoquímicos y moleculares, cuya efectividad ha sido parcialmente estudiada (Pan y col., 1998), es decir, que no se han evaluado los parámetros de desempeño de estas técnicas a partir de los extractos vegetales.

La agroindustria azucarera cubana experimentó un gran descenso, a partir de la década de los 90, debido a diversos factores, entre los que se encuentran los fitosanitarios (Iglesia, 2007). Esto requiere, indudablemente, de mayores cantidades de caña de azúcar, mediante el incremento

Palabras clave: raquitismo de los retoños, hibridación no radiactiva, diagnóstico molecular, validación, PCR.

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apdo. 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
aiglesia@censa.edu.cu

del rendimiento agrícola, buen manejo de la política de variedades, aumento de las atenciones al cultivo y de los volúmenes de siembra, así como de un conocimiento más profundo de las principales patologías del cultivo, con la finalidad de disponer de mejores métodos de manejo y dirigir más adecuadamente el programa nacional de obtención de variedades y la estructura varietal en el país.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue lograr una validación completa y comparación de procedimientos moleculares de diagnóstico (PCR e hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva), para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de caña de azúcar procedentes de la Estación Experimental de Jovellanos, Matanzas, pertenecientes a las variedades C 111-79, C 323-68, C120-78, My 5514 y CP 31-294, previamente inoculadas con jugos de plantas de caña de azúcar infectadas severamente por el RSD (Chinea y col., 2005). Se tomaron secciones de tallos de la zona del entrenudo de estas muestras, las que se lavaron con agua destilada estéril y se desinfectaron con etanol absoluto, durante 1 *min*. Los jugos se obtuvieron bajo condiciones asépticas, mediante el corte de pequeñas secciones de tallos con un *bdador* de 5 *mm* de diámetro, que se colocaron en un sistema doble de tubos (uno de 0,5 *mL* perforado por el fondo, dentro de otro de 1,5 *mL*) para recoger los fluidos por centrifugación a 10 000 *rpm*, durante 5 *min*. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente a 10 000 *rpm* y el precipitado se resuspendió en 100 μ L de agua destilada estéril, se incubaron durante 10 *min*, a 100 °C, con el propósito de disminuir el efecto inhibidor de los taninos, la sacarosa y los fenoles que se encuentran en los fluidos de la caña de azúcar.

1. Reacción en cadena de la polimerasa: variantes simple (PCR) y anidada (nPCR)

La validación de los métodos moleculares de las variantes de PCR simple y anidada se realizó según los procedimientos descritos por Pan y col. (1998) y Davis y col. (2005), respectivamente. Se utilizaron las muestras de ADN, suspensiones bacterianas y jugos de las variedades de caña de azúcar en estudio.

En ambas variantes de PCR (simple y anidada), se utilizaron iniciadores específicos, diseñados a partir de la región intergénica 16-23S del ARNr, que generan productos de amplificación de 438 y 229 *pb*, respectivamente. Los iniciadores responden a secuencias únicas de *L. xyli* subsp.

xyli (Cxx1: 5' CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC 3' ; Cxx2: 5' ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG 3') (Pan y col., 1998) y RST59: 5'-CGT CTT CAA GAC ACA GCG 3' ; RST60: 5'-TCA ACGCAG AGA TTG TCC AG 3' (Astua-Monge, 1995)

La mezcla de reacción estuvo compuesta por tampón PCR 10x, 1,5 *mM* de MgCl₂, 0,2 *mM* de cada dNTPs, 0,5 *mM* de cada iniciador, 0,6 *U* de Taq polimerasa y 50 *ng* de ADN, para un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de ciclaje de la reacción simple consistieron en un ciclo de inicio de desnaturalización de 94 °C, 5 *min*; seguido de 40 ciclos de 94 °C, 30 s; 55 °C, 1 *min*; 72 °C, 90 s y, posteriormente, un ciclo de extensión final de 72 °C, 3 *min*. La reacción anidada se realizó siguiendo el mismo protocolo, pero con una reducción del número de ciclos a 35 (Davis y col., 2005, Iglesia y col., 2008).

Los fragmentos de PCR amplificados fueron analizados en un gel de agarosa a 1,2 %, preparado con TBE 0,5x (45 *mM* Tris, 45 *mM* de ácido bórico y 1 *mM* EDTA) y teñidos con bromuro de etidio 10 μ g/*mL* en TBE 1x. Se determinó el límite de detección de los procedimientos en varios momentos.

2. Hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva (HAN-NR)

Para la estandarización del método de HANnr, se emplearon preparaciones de ADN de las cepas *Lxx-1* y *Lxx-B* y 20 controles positivos y negativos de jugos utilizados y comprobados por nPCR. Se aplicaron 50 μ L en una membrana de nylon positivamente cargada (Hybond NX+, Amersham), previamente tratada con solución de Dodecyl sulfato de sodio (SDS) 2 %, y utilizando un equipo de Dot Blot Manifold o similar, acoplado al vacío. (Arocha y col., 2006).

La sonda utilizada para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* se obtuvo a partir de la purificación del fragmento de ADN de 229 *pb* amplificado mediante 10 reacciones de PCR como mínimo. La purificación del fragmento de PCR se realizó a partir de un gel de agarosa a 1 %, utilizando el juego comercial QIAquick Gel Purification kit (QIAGEN, UK), según las especificaciones del productor. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN total mediante espectrofotometría, a una longitud de onda de 260 *nm*.

Se utilizaron 10 *ng*/ μ L de la sonda. El procedimiento de marcaje se realizó mediante el sistema directo de sondas ADN con fosfatasa alcalina y detección quimioluminiscente con CPD-Star (AlkPhos, Amersham LIFE SCIENCE, UK), según las especificaciones del productor.

Las muestras fueron desnaturalizadas a 100 °C, durante 5 min, con solución desnaturalizante [hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M y cloruro de sodio (NaCl) 1,5 M] y neutralizadas con solución neutralizante [tris-ácido clorhídrico (HCl) 1 M pH8,0 y NaCl 0,5 M], según la metodología descrita por Arocha y col., 2006. Posteriormente, fueron aplicadas a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond NX+, Amersham), previamente tratada con solución de dodecyl sulfato de sodio (SDS) 2 %. Se realizó la fijación a la membrana mediante la exposición a 80 °C, durante 2 h.

Para la estandarización y establecimiento del método, se probaron diferentes temperaturas (50, 55 y 60 °C) y un tiempo de incubación de 16 h. Seguidamente, se realizaron dos lavados de alta astringencia durante 10 min a 55 °C con solución primaria (urea 2 M, SDS 0,1 %, NaH₂PO₄ 150 mM, pH 7, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM y agua desionizada estéril, pH 7,0) y después, dos lavados de baja astringencia, durante 5 min, a temperatura ambiente, con solución secundaria (tris-ácido clorhídrico 1 M, NaCl 2 M y MgCl₂ 1 M).

La detección de la señal de hibridación se realizó empleando 4 mL del reactivo CDP-Star (AlkPhos, Amersham LIFE SCIENCE, UK) según especificaciones del juego comercial. La membrana se colocó en un casete de autoradiografía y se expuso con filmes de rayos X (35-43 CM-Amersham LIFE SCIENCE), a temperatura ambiente, durante 1 h. El revelado se realizó bajo condiciones de oscuridad, con las correspondientes soluciones reveladora y fijadora (SIGMA), según las especificaciones del productor. Los filmes de rayos X se observaron a contraluz para una mejor visualización de la señal.

3. Validación de los métodos y comparación

Para definir los parámetros de desempeño de ambos métodos, se utilizaron 300 controles positivos (20 de suspensiones bacterianas y ADN de *L. xyli* subsp. *xyli* y 280 de jugos procedentes de cañas infectadas de las variedades CP 31-294, C 120-78) y 115 controles negativos (20 de suspensiones bacterianas y ADN de otras especies bacterianas y 95 de jugos sanos de las variedades My 5514, C 323-68, y C 111-79). Se realizaron cinco repeticiones de 10 controles positivos y 10 negativos.

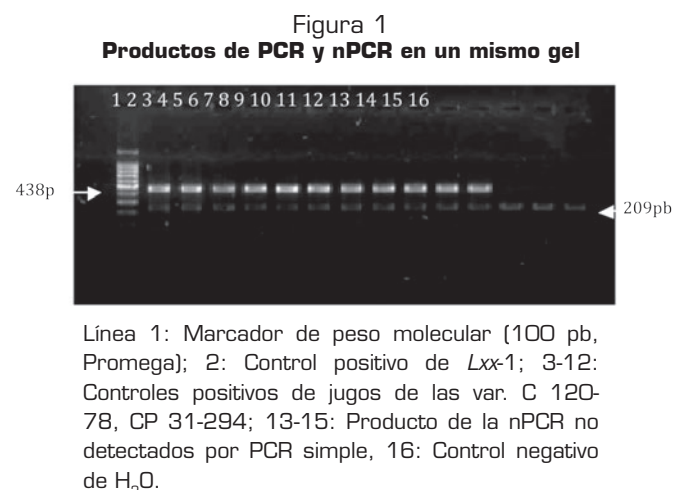
Se realizó la comparación de los métodos de diagnóstico moleculares evaluados, sobre la base de los indicadores de validación, la complejidad de manipulación, rapidez y

costo de los equipos requeridos. Además, se analizaron las ventajas y desventajas tecnológicas de cada uno.

RESULTADOS

1. Reacción en cadena de la polimerasa: variantes simple (PCR) y anidada (nPCR)

La figura 1 muestra los resultados de la amplificación de 438 pb mediante PCR simple, al utilizar la pareja de iniciadores Cxx1/Cxx2 y los resultados de la nPCR, donde se aprecian bandas de 229 pb, que se corresponden con la amplificación de algunas muestras control que resultaron negativas en la variante simple. En todos los casos, el protocolo establecido funcionó adecuadamente.



El límite de detección al utilizar suspensiones bacterianas fue de 10² UFC/mL para la PCR y 2 UFC/mL para nPCR, mientras que, al evaluar los extractos vegetales, se obtuvo amplificación hasta la dilución 10⁻³ para PCR y 10⁻⁴ para nPCR, lo cual coincide con los datos obtenidos por Li y col. (2004) para la detección de *X. albilineans*. En ambos casos, el límite de detección determinado supera al informado por otros autores, al utilizar la técnica PCR para el diagnóstico de bacterias, lo cual pudo estar dado por el aumento de la concentración bacteriana al realizar la centrifugación de los jugos.

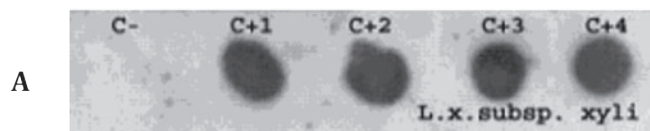
2. Hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva (HANnr)

La figura 2 muestra las señales de hibridación al evaluar la reacción de la sonda obtenida para la detección específica de *L. xyli* subsp. *xyli*, frente a los controles positivos de suspensiones bacterianas y de las muestras de jugos procedentes de plantas infectadas y sanas.

Figura 2

Señales de hibridación con sonda específica para *Lxx*.

1 2 3 4 5



A1: Control negativo de solución TE 1x; A2-A3: ADN de *Lxx*-1; A4: Control positivo de jugo; A5: Control de la sonda.

Las condiciones empleadas durante el proceso de hibridación no radiactiva, permitieron obtener señales fuertes y bien definidas, caracterizadas por su nitidez y limpieza. Esto se puso de manifiesto tanto en las muestras control de suspensiones bacterianas como en las de jugos infectados, no siendo así para los controles negativos y de solución, donde no hubo señal.

3. Validación y comparación de los métodos

Los resultados de la evaluación de los indicadores de validación de las tres técnicas moleculares se muestran en la tabla 1.

Tabla 1
Indicadores de validación determinados para la detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* mediante PCR, nPCR e HAN-NR

Indicadores	PCR	nPCR	HAN-NR
Sensibilidad (%)	97,66	100	100
Especificidad (%)	97,39	99,13	98,26
Eficacia (E) (%)	97,59	99,75	99,51
VPP (%)	98,98	99,66	99,33
VPN (%)	94,11	100	100

Todos los parámetros de desempeño se mantuvieron por encima de 96 %, con un índice de eficacia de 97,59 y 99,75 % y 99,51 para PCR, nPCR e HAN-NR, respectivamente. Las notables especificidad y sensibilidad se encuentran en el intervalo de los índices establecidos para fitopatógenos (Carvalho y col., 2010; Yan y col., 2010; Díaz y col., 2010).

En la tabla 2 se muestran los principales elementos comparativos entre las técnicas inmunoquímicas y moleculares.

Tabla 2
Tabla comparativa de las técnicas inmunoquímicas y moleculares evaluadas para el diagnóstico de RSD

Parámetros	PCR	nPCR	HAN-NR
Indicadores de validación (%)	94-97	99-100	98-100
Complejidad de manipulación	Compleja	Compleja	Media
Rapidez	Alta	Alta	Alta
Costo de equipos y reactivos requeridos	Elevado	Elevado	Medio

Todas las variantes de diagnóstico analizadas presentan una alta eficacia, con parámetros evaluativos estimados por encima de 95 %, lo que las califica como satisfactorias para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*, a partir de tallos de caña de azúcar.

DISCUSIÓN

La presencia de falsos positivos en la PCR está referida, generalmente, a controles de manipulación o ejecución de la técnica (agua y solución de extracción), con señales de amplificación por las contaminaciones exógenas detectadas. En particular, cuando se emplean muestras de jugos de caña de azúcar, se ha señalado la presencia de inhibidores de la PCR como un factor limitante (Davis, 2005).

La buena repetibilidad de la técnica (100 % de coincidencia en los experimentos realizados), y las posibilidades comprobadas de detectar la bacteria en extractos vegetales, junto con los parámetros analíticos estimados, demuestran la capacidad de los ensayos validados para detectar esa entidad.

Los resultados demuestran las excelentes cualidades de la variante anidada para el diagnóstico de esa enfermedad. La doble amplificación que se realiza al emplear este protocolo, vence las dificultades encontradas para la detección de la bacteria mediante una sola reacción de PCR que, de acuerdo con lo señalado por varios autores (Li y col., 2004; Grisham y Pan 2005), se debe a una mayor concentración bacteriana o de ADN en las muestras analizadas, debido a que el producto de la variante simple es amplificado nuevamente en una segunda reacción, o probablemente, a una disminución del efecto inhibitor que provocan los taninos, la sacarosa u otros compuestos presentes normalmente en los tejidos de varias especies vegetales, incluyendo la caña de azúcar. Además, su uso permitió la detección de muestras con resultados negativos, mediante la variante simple, donde solo pudieron ser detectadas en la segunda amplificación, razón por la cual algunos autores consideran como definitivo el producto de la segunda amplificación.

Por sus características, esta técnica sería de gran utilidad para el análisis de donantes de los

procesos de micropropagación y la evaluación de variedades de interés sometidas a cuarentena post-entrada, ya que se pudo demostrar la disminución o ausencia de resultados falsos negativos.

En la rama agrícola, la información existente sobre la validación de juegos y métodos de diagnóstico es limitada y poco actualizada, de acuerdo con las tendencias mundiales (Iglesia, 2007). Por ello, los resultados de este trabajo no sólo brindan datos concretos sobre el comportamiento de los ensayos desarrollados para la detección específica de *L. xyli* subsp. *xyli*, sino aportan elementos metodológicos que pueden ser empleados para otros trabajos de validación.

En el caso de la HANnr, las dos muestras detectadas como falsos positivos, pudieran deberse a contaminaciones durante su manipulación, ya que todos los controles evaluados evidenciaron los resultados esperados.

Como se muestra en la tabla 1, el uso de la sonda específica para *L. xyli* subsp. *xyli*, permitió obtener una eficacia de 99,51 %, lo que califica al procedimiento como altamente factible para su aplicación en la detección de esa entidad bacteriana. Estos resultados son comparables a los descritos previamente para otros fitopatógenos, con el empleo de metodologías de hibridación no radiactivas, similares a las utilizadas en este trabajo (Arocha y col., 2006).

Hasta el momento, la bibliografía consultada recoge solamente el uso de hibridación radiactiva para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*, cuyo uso se ha hecho cada vez más limitado, debido a las numerosas desventajas en cuanto al impacto ambiental, la seguridad y el costo tecnológico, además de la infraestructura necesaria para su ejecución (Pan y col., 1998).

Los resultados presentados son los primeros de su tipo obtenidos en Cuba para el diagnóstico de esta importante enfermedad de la caña de azúcar, y brindan la posibilidad de contar con una valiosa herramienta para el perfeccionamiento de los procedimientos fitosanitarios actuales, dentro del programa de mejoramiento genético del cultivo (Chinea y col., 2005).

Los valores de especificidad y sensibilidad de estas técnicas moleculares son muy superiores a las técnicas inmunoquímicas empleadas para estos fines, no obstante, tienen en contra los altos requerimientos de infraestructura, el costo del equipamiento y los gastos periódicos por consumo de reactivos. La presencia de inhibidores, unida a las posibles contaminaciones exógenas, son las causas que, probablemente, hayan contribuido a que los porcentajes de sensibilidad y

especificidad de la variante simple sean menores que los de la nPCR (Pan y col., 1998). Por ello, se considera que la variante anidada constituye una alternativa de gran utilidad para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*, fundamentalmente, cuando se trate de donantes o se disponga de muy poco material vegetal, teniendo en cuenta su excelente límite de detección y sensibilidad de 100 %.

Por su parte, la metodología de HANnr presenta ventajas tecnológicas y económicas evidentes sobre los ensayos de PCR, en cuanto a la facilidad de manipulación, la minimización de los riesgos de contaminación, el costo inferior de infraestructura y la posibilidad de procesar un mayor número de muestras (Arocha y col., 2006). Los valores de sensibilidad (100 %) y especificidad (98,26 %), así como las posibilidades de realizar diagnósticos masivos, la convierten en la alternativa de mayor preferencia para la detección rápida y sensible de *L. xyli* subsp. *xyli* en los programas de cuarentena nacional, y en la erradicación de líneas enfermas dentro del esquema general de producción de semillas por técnicas biotecnológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arocha, Y. H., G. H. Jones, and A. Iglesia: "Development of non radioactive nucleic acid hybridization assays for the detection of prokaryotes affecting sugarcane", *Rev. Protección Veg.* 21(1): 52-55, 2006.
- Astua, M. G.: *Detection of Clavibacter xyli subsp. xyli, the causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, based on amplification of DNA in the ribosomal DNA spacer*, Thesis of Master in Science degree, University of Florida, USA, 58 pp., 1995.
- Carvalho, G., F. R. Oliveira, and A. T. Ramos: "Development of a quantitative real-time PCR protocol for the analysis of early colonization of sugarcane plantlets with *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*", *Phytopathology*, vol. 100(6):56-64, 2010.
- Chinea, A., J. R. Pérez, E. L. Peralta y M. R. Matos: "Raquitismo de los retoños de la caña de azúcar: Medio siglo de investigaciones en Cuba". En: *Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*, La Habana, Cuba, pp. 62-64, 2005.
- Davis, M. J.: "Advances in Diagnosis and Management of Leaf Scald and Ratoon Stunting Diseases of Sugarcane". En: *Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*, La Habana, Cuba, pp. 24-28, 2005.

- Díaz, A., M. Quiñones, A. Hernández, y G. Barrio: "Evaluación de los parámetros analíticos para la detección molecular de potyvirus que afectan al cultivo del pimiento en Cuba", *Rev. Protección Veg.*, 25(1): 69-79, 2010.
- Grisham, M. & Y. B. Pan: "Detection and quantification of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane by real-time PCR", *Phytopathology*, 95(6): 36-40, 2005.
- Iglesia, A. L.: "Isolation and morphological, biochemical and molecular identification of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Cuba", *Rev. Protección Veg.*, 22(1): 29-33, 2007.
- Iglesia, A. L., E. Álvarez, Y. Martínez y A. García: "Diagnóstico molecular de la marchitez bacteriana", *Rev. Protección Veg.*, 23(2): 75-79, 2008.
- Li, T. Y., P. Yin, Y. Zhou, Y. Y. Zhang, and T. A. Chen: "Characterization of the replicon of a 51-kb native plasmid from the gram-positive bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *Cynodontis*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 236(1): 33-39, 2004.
- Pan, Y. B., M. P. Grisham, D. M. Burner, K. E. Damann Jr., and Q. Wei: "A Polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease", *Plant Dis.*, 82(3): 285-290, 1998.
- Yan, M.Y., W. H. Huang, and Z. Y. Deng: "Application of PCR based disease detection methods in sugarcane", *Agricultural Sciences*, 12:123-129, 2010.



ATALAC - TECNICAÑA 2012
DEL 10 AL 14 DE SEPTIEMBRE DE 2012
CALI, COLOMBIA