

Ensayos

Implementación en Cuba de una técnica para el diagnóstico de *Leifsonia xyli* en caña de azúcar

Recibido: 31-10-2017 Aceptado: 28-01-2019 (Artículo Arbitrado)

Resumen

La enfermedad raquitismo de los retoños es causada por la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko en caña de azúcar la cual presenta síntomas internos y externos inespecíficos, por lo que éstos no son suficientes para su identificación. El objetivo de este trabajo fue implementar la técnica de Inmuno Impresión Directa de Tejidos para el diagnóstico masivo de la bacteria causante de esta patología en Cuba. Se utilizaron los cultivares CP31-294 (infectado) y My5514 (sana). Se probaron diferentes diluciones de anticuerpos específicos. En la confirmación de la técnica serológica mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se utilizaron 140 muestras de tallos (70 positivas y 70 negativas). Quedó establecida la técnica de diagnóstico serológico con los anticuerpos específicos. Se encontró alta correspondencia entre los resultados del diagnóstico de las muestras por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los resultados demostraron la posibilidad de utilizar la Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en caña de azúcar, un procedimiento simple que permite analizar un gran número de muestras en corto tiempo, a menor costo y con alta confiabilidad.

Abstract

Ratoon stunting disease is caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko in sugarcane that presents unspecified internal and external symptoms which are insufficient for its identification. The objective of this work was to establish the tissue blot immunoassay technique (TBIA) for the large-scale diagnosis of the bacterium that causes this pathology in Cuba. The cultivars CP31-294 (infected) and My5514 (bacterium free) were used. Different dilutions of specific antibodies were tested. The serological technique was applied by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in which 140 samples of sugarcane stems were used (70 positive and 70 negative), and this serological diagnosis technique with specific antibodies was established. The results of the diagnosed samples indicate a level high of agreement between the tissue blot immunoassay technique and the Polymerase Chain Reaction. These results demonstrate that the tissue blot immunoassay technique may be used for the detection of the bacterium *L. xyli* in sugarcane. This simple procedure allows for a large number of samples to be analyzed over a short period of time, as well as being low cost and highly reliable.

Résumé

Le rachitisme des pousses est causé par la bactérie *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko chez la canne à sucre qui présente des symptômes internes et externes non spécifiques ; ces symptômes ne sont donc pas suffisants pour permettre une identification. L'objectif de ce travail est de mettre en œuvre la technique d'Impression Directe de Tissus Immuno pour le diagnostic de masse de la bactérie responsable de cette maladie à Cuba. Les cultivars CP31-294 (infecté) et My5514 (sain) ont été utilisés. Différentes dilutions d'anticorps spécifiques ont été testées. Pour la confirmation de la technique sérologique au moyen de la réaction en chaîne de la polymérase, 140 échantillons de tige ont été utilisés (70 positifs et 70 négatifs). La technique de diagnostic sérologique avec des anticorps spécifiques a été établie. On a trouvé une correspondance élevée entre les résultats du diagnostic des échantillons pour l'Immuno Impression Directe des Tissus et pour la réaction en chaîne de la polymérase. Les résultats ont démontré la possibilité d'utiliser l'Immuno Impression Directe des Tissus pour la détection de la bactérie *L. xyli* chez la canne à sucre, une procédure simple qui permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en un temps record, à un coût moindre et avec une grande fiabilité.

Javier Delgado Padrón¹
Juana de las M. Pérez Pérez
Osmany de la C. Aday Díaz
Mario Casas González
Lázaro Pardo Mora
Tania Casero Rodríguez
Yaquelin Puchades Izaguirre
María de la Luz La O-Hechavarría

Correspondencia:

¹javier.delgado@inicamy.azcuba.cu

Palabras clave: Raquitismo de los retoños, inmuno impresión directa, reacción en cadena.

Keywords: Ratoon stunting disease, tissue-blot enzyme immunoassay, polymerase chain reaction.

Mots-clés: Rachitisme des pousses, immuno impression directe, réaction en chaîne.

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA)
La Habana, Cuba.

Introducción

Entre las enfermedades de mayor importancia que constituyen un factor limitante en la producción de la caña de azúcar en Cuba, se encuentran el carbón [*Sporisorium scitamineum* (Piepenbr) Sydow], la roya parda (*Puccinia melanocephala* Sydow y P. Sydow), la escaldadura foliar [*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson], el virus de la hoja amarilla [SCYLV (Lockhart) Dárcy] y el raquitismo de los retoños [*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko] (Pérez et al., 2013).

El agente causal del raquitismo de los retoños es una bacteria que se disemina en la planta a través del xilema e impide su normal funcionamiento, lo que interfiere el transporte de agua y nutrientes. Generalmente, produce fluido fibrovascular que originan puntos, comas y líneas cortas de color anaranjado-rojizo en la base de los nudos de tallos, retraso del crecimiento, disminución del número de tallos por cepa y plantas raquíticas (Alvez et al., 2016).

Las pérdidas del rendimiento agrícola son entre 10 y 60%, dependiendo de la resistencia del cultivar a la bacteria, la cantidad de retoños cosechados sin reponer la cepa, las atenciones agronómicas efectuadas al cultivo, los estados de estrés, así como la utilización de material de propagación infectado y los instrumentos de corte que facilitan su diseminación en las plantaciones cañeras (Garcés et al., 2013).

Los síntomas externos e internos de la enfermedad raquitismo de los retoños son inespecíficos, pueden estar enmascarados y originarse por varias causas (Silva, 2013). Debido a que éstos no son suficientes para su identificación, es necesario el empleo de métodos de diagnósticos seguros y precisos. En éstos es vital realizar un adecuado reconocimiento de su agente causal para elaborar un programa de manejo de la misma. Este hecho pone de manifiesto la importancia de realizar análisis apropiados en el laboratorio con el fin de determinar tempranamente el estado sanitario de las plantaciones cañeras (García, 2014).

El tratamiento hidrotérmico a la semilla agámica de caña de azúcar es un método de manejo que se utiliza en todo el país en los bancos de semilla básica y

registrada (Santana et al., 2014), sin embargo, no se logra controlar totalmente a esta bacteria debido a su permanencia en hospedantes alternativos, residuos de cosecha y plantaciones vecinas. A pesar de que existe el Servicio Fitosanitario (SEFIT) para la caña de azúcar, el diagnóstico del raquitismo de los retoños se realiza visualmente, y no existe un sistema de detección específico que alerte la presencia del patógeno para implementar las medidas de manejo que se requieran. Así, el presente estudio tiene el propósito de evaluar la técnica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para el diagnóstico masivo de la bacteria causante del raquitismo de los retoños en la caña de azúcar en Cuba y su confirmación por la reacción en cadena de la polimerasa.

Materiales y métodos

Establecimiento de la Inmuno Impresión Directa de Tejidos

Se utilizó el primer entrenudo del tercio basal de cuatro tallos de caña de azúcar de los cultivares: CP31-294 (positivo, susceptible infectado) y My5514 (negativo, sano) (Rufin, 2011) procedentes de la Colección de Germoplasma del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar en Matanzas. Con un horador estéril se extrajo un cilindro de cinco centímetros de longitud y uno de diámetro de una sección cercana a la banda de raíces. Con los cilindros extraídos se realizaron las impresiones sobre las membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Protran BA85 Nitrocellulose 10401265 Whatman Schleider & Schuell) siguiendo la metodología descrita por Funes et al. (2012).

Se probaron diferentes diluciones (1/3000, 1/4000 y 1/5000) del anticuerpo específico anti *L. xyli* subsp. *xyli* (cabra), obtenido del Centro Internacional para el Desarrollo Agronómico (CIRAD), en Francia. Para cada combinación del anticuerpo primario con el anticuerpo específico anti cabra conjugado con fosfatasa alcalina se utilizaron las diluciones 1/700, 1/800, 1/900 y 1/1000.

Los resultados se observaron en un microscopio estereoscopio con ocular de 10 μm . La reacción positiva se confirmó con la aparición de puntos violetas sobre los haces vasculares impresos en las membranas de nitrocelulosa. La prueba se consideró válida

cuando el control negativo permaneció incoloro y el positivo desarrolló la reacción característica con puntos violetas.

Confirmación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron 140 cilindros de tallos de caña de azúcar diagnosticados para *L. xyli* por Inmuno Impresión Directa de Tejidos (70 positivos y 70 negativos), que estaban conservados a -20°C de un muestreo a 14 cultivos en plantaciones comerciales de caña de azúcar (Tabla 1). Se utilizó la combinación de diluciones de los anticuerpos específicos que alcanzó los mejores resultados en el revelado y los cilindros de los tallos de caña de azúcar utilizados en las impresiones.

Los jugos de los cilindros de los tallos, se obtuvieron en condiciones asépticas (gabinete de bioseguridad), haciendo presión en los cilindros con una pinza estéril, según metodología de Taher (2010).

De los fluidos extraídos se tomó una porción de 200 μ L y se centrifugaron a 10 000 rpm. El precipitado se resuspendió en 100 μ L de agua destilada estéril, se incubó durante 10 min a 100°C. El protocolo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizado fue el propuesto por Iglesia et al. (2011) con los iniciadores específicos que responden a secuencias únicas de la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli*, Cxx-1: 5' CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC 3' y Cxx-2: 5' ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG 3', diseñados a partir de la región intergénica 23S del RNAr que generan productos de amplificación de 438 pb. Se empleó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega).

En el diagnóstico, se consideraron verdaderas positivas a las muestras que resultaron positivas por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y por Reacción en Cadena de la Polimerasa; verdaderas negativas, las negativas por ambas técnicas, así como falsas positivas, las muestras que resultaron negativas por Reacción en Cadena de la Polimerasa que habían sido diagnosticadas positivas por la técnica serológica; las falsas negativas, a las que habían sido diagnosticadas negativas por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y resultaron positivas por la técnica molecular.

Tabla 1. Cultivos diagnosticados por Inmuno Impresión Directa de Tejidos procedentes de las plantaciones comerciales de caña de azúcar

Cultivos	Muestras Positivas	Muestras negativas
C132-81	0	10
SP70-1284	10	0
CP52-43	10	0
C85-102	0	10
C86-56	10	0
C87-252	0	10
C1051-73	5	15
C87-51	10	0
C86-503	5	15
C90-469	10	0
C86-531	0	10
C88-380	10	0
Total	70	70

Se calcularon según las siguientes fórmulas referidas por Peralta y Villoch (1999):

- $D-SP = [Vn / (Vn + Fp)] \times 100$
- $D-SN = [Vp / (Vp + Fn)] \times 100$
- $E = [Vp + Vn / (Vp + Vn + Fp + Fn)] \times 100$

Valor productivo de positividad

- $(Vpp) = [Vp / (Vp + Fp)] \times 100$

Valor predictivo de negatividad

- $(Vpn) = [Vn / (Vn + Fn)] \times 100$

donde: D-SP: especificidad del diagnóstico; Vn: verdaderas negativas; Fp: falsas positivas; D-SN: sensibilidad del diagnóstico; Vp: verdaderas positivas; Fn: falsas negativas; E: eficacia; Vpp: valor predictivo de positividad; Vpn: valor predictivo de negatividad.

Resultados

Inmuno Impresión Directa de Tejidos

La calidad del revelado de las impresiones efectuadas en las membranas de nitrocelulosa de los cultivos CP31-294 (infectado) y My5514 (sano) difiere en dependencia de las combinaciones de diluciones de los anticuerpos específicos anti *L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) y anti cabra conjugado con fosfatasa alcalina.

La mejor resolución del revelado se alcanzó con la combinación de los anticuerpos específicos

anti *L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) diluido 1/3000 y el anti cabra conjugado con fosfatasa alcalina 1/800 por mostrar la mejor resolución del revelado. Con esto quedó establecida la técnica serológica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en el cultivo de la caña de azúcar en Cuba con esta combinación de diluciones de los anticuerpos específicos. Los colores nítidos, bien definidos, evidencian la calidad de la determinación y difieren fácilmente entre las muestras infectadas y las sanas (Figura 1 A y B).

Los resultados muestran la efectividad del empleo de la técnica serológica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en la caña de azúcar y la posibilidad de utilizarla eficientemente en los diagnósticos del raquitismo de los retoños.

Confirmación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

El protocolo para la detección de *L. xyli* en caña de azúcar por Reacción en Cadena de la Polimerasa funcionó correctamente, lo que se corroboró con la obtención del producto de la talla esperada (438 pb) (Figura 2); las líneas 1, 3, 8, 11 y 12 son muestras negativas a la bacteria; las 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 son positivas; y la 13 es el marcador de peso molecular.

De los 70 cilindros de tallos de caña de azúcar positivos y 70 negativos a *L. xyli* diagnosticados por Inmuno Impresión Directa de Tejidos, coincidió con el resultado del diagnóstico de las muestras. Solamente dos del cultivar C86-503, que habían resultado negativas

fueron diagnosticadas positivas por la técnica molecular. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se estimaron los parámetros de desempeño, especificidad, sensibilidad, eficiencia y valores predictivos positivos y negativos del diagnóstico por ambas técnicas (Tabla 2).

Todos los parámetros de desempeño se mantuvieron por encima del 97% comprobando la alta correlación que existe entre los resultados del diagnóstico de las muestras por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y Reacción en Cadena de la Polimerasa. Este resultado muestra la eficacia de la Inmuno Impresión Directa de Tejidos en la detección de la bacteria *L. xyli* en el cultivo de la caña de azúcar con un 100% de especificidad.

Los resultados de las muestras analizadas por ambas técnicas tuvieron 98,57% de coincidencia. Además, con la técnica de diagnóstico serológico Inmuno Impresión Directa de Tejidos, se pudieron obtener resultados de alta sensibilidad (97,30%) y especificidad (100%), lo que la convierten en la alternativa de mayor preferencia para la detección rápida y económica de *L. xyli* en las plantaciones de caña de azúcar.

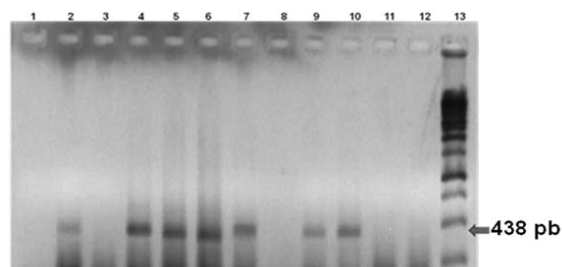


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de la amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de *L. xyli* en jugos de caña de azúcar. Línea 1: control negativo; línea 2: cultivar CP31-294; línea 3: cultivar My5514; línea 4: cultivar C86-56; línea 5: cultivar C87-51; línea 6: cultivar C88-380; línea 7: cultivar C90-469; línea 8: cultivar C132-81; línea 9: cultivar CP52-43; línea 10: cultivar SP70-1284; línea 11: cultivar C85-102; línea 12: cultivar C86-531; línea 13: marcador de peso molecular (1 Kb, Promega).

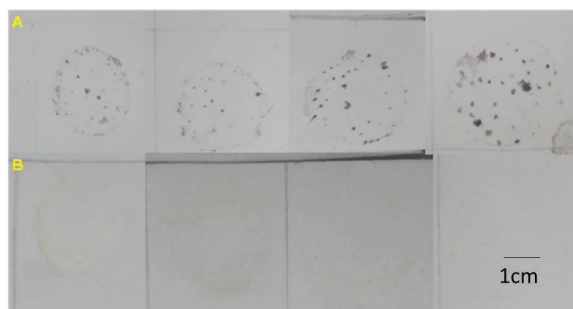


Figura 1. Inmuno Impresión Directa de Tejidos de tallos de caña de azúcar en membranas de nitrocelulosa con la dilución 1/3000 de los anticuerpos específicos anti *L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) con el anti cabra conjugado con fosfatasa alcalina 1/800. A: puntos violetas sobre las impresiones del cultivar CP31-294 (control positivo), B: ausencia de puntos violetas sobre las impresiones del cultivar My5514 (control negativo).

Tabla 2. Parámetros de desempeño del diagnóstico por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *L. xyli*.

Indicadores de validación	Valores determinados por Reacción en Cadena de la Polimerasa
Especificación del diagnóstico	100
Sensibilidad del diagnóstico	97,30
Eficacia	98,59
Valor predictivo de positividad	100
Valor predictivo de negatividad	97,14

Discusión

La Inmuno Impresión Directa de Tejidos ha sido empleada eficientemente en la detección de agentes nocivos en diferentes cultivos incluyendo papa (*Solanum tuberosum* Linnaeus) (Franco et al., 2009); cítricos (*Citrus* spp. Linnaeus) (Peña et al., 2010); frijol (*Phaseolus vulgaris* Linnaeus), pepino (*Cucumis sativus* Linnaeus), pimiento (*Capsicum annum* Linnaeus) y tomate (*Solanum Lycopersicum* Linnaeus) (Sepúlveda, 2013).

Esta técnica es ampliamente utilizada en el diagnóstico masivo de agentes nocivos en caña de azúcar, como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Funes et al., 2012), bacterias como *Xanthomonas albilineans* (Garcés et al., 2013) y el virus de la hoja amarilla (Aday et al., 2014) y con alta sensibilidad y confiabilidad.

Garcés et al. (2013) la utilizaron en el diagnóstico de *L. xyli* en el sistema cuarentenario para la importación segura de cultivares en Ecuador, en el esquema de producción de semilla sana y en la detección de esta bacteria como criterio de selección en el Programa de Obtención de Nuevos Cultivares.

Las técnicas moleculares son más sensibles que las serológicas, lo que ha sido ampliamente documentado, pero presentan los inconvenientes de requerir bastante infraestructura, costos de equipamiento y consumo de reactivos (Fontana et al., 2013); en tanto, las técnicas serológicas son más baratas y se pueden procesar un número mayor de muestras diariamente, mientras que proporciona una sensibilidad y especificidad aceptable (Zardón et al., 2012).

Según Monteiro (2013), la notable especificidad y sensibilidad de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa se encuentra en el intervalo de los índices establecidos para fitopatógenos, los que además la califican como satisfactoria para la detección de la bacteria *L. xyli*, a partir de extractos vegetales de tallos de caña de azúcar, con límites de detección y amplificación hasta la dilución de 10^{-3} UFC.mL⁻¹. Los resultados de este estudio demuestran la posibilidad de utilizar la Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en la caña de azúcar, mediante un procedimiento simple que permite analizar gran número de muestras en poco tiempo, con bajo costo y alta confiabilidad.

Conclusiones

Al considerar los resultados positivos de correspondencia entre las dos técnicas que se utilizaron, y así demostrar la factibilidad del uso de la técnica de Inmuno Impresión Directa de Tejidos en el diagnóstico masivo de la bacteria *L. xyli* en caña de azúcar, lo que permite el establecimiento de esta técnica, debido a que los parámetros de desempeño calculados muestran la efectividad de su empleo en la detección de *L. xyli* en las áreas cañeras de Cuba.

Agradecimientos

Al Dr. Jean-Claude Girard del Centro Internacional para el Desarrollo Agronómico (CIRAD), Francia, quien donó el anticuerpo específico anti *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (cabra). A los especialistas del Servicio Fitosanitario de la caña de azúcar de las provincias y a los de la red de estaciones del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Cuba que colaboraron en la colecta de las muestras

Bibliografía

- Aday, O., M. La O, M. Zardón, E. Rodríguez, J. Mesa, Y. Puchades, J. Delgado y F. Díaz. (2014). Distribución del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. Volumen 29 (3): 177-184.
- Alvez, B., M. Oropeza y G. Alonso. (2016). *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, patógeno de la caña de azúcar en Venezuela agente causal del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. Editorial Académica Española.
- Franco, L., C. Andrés y M. Guzmán. (2009). Detección del virus PVX, PVS, PVY y PLRV en la colección central colombiana de papa por medio de la técnica inmuno (IMI). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 5(1): 130-139.
- Fontana, P., V. Di y R. Sopena. (2013). Cultivo de caña de azúcar. La Gaceta. Argentina, Marzo 22. 12 p.
- Funes, C., R. Bertani, I. Cazón, C. Kairuz, V. González y L. Ploper. (2012). Estado sanitario de lotes comerciales de caña de azúcar destinados a la obtención de caña semilla durante el período 2008-2011 en Tucumán, R. Argentina. *EEAOC, Avance Agroindustrial*. 33 (1): 8-12.
- Garcés, F., F. Fiallos, J. Mendoza, E. Silva, R. Castillo, M. Valdez e I. Viteri. (2013). Manejo preventivo del raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Ecuador. *Memorias del III Congreso AETA*, Guayaquil-Ecuador.

- García, J. (2014). *Diagnóstico de Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson y Leifsonia xyli subsp. xyli en caña de azúcar en la Chontalpa*. Tabasco. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Posgraduados, México.
- Iglesia, A., M. Díaz y M. Ramos. (2011). Validación de técnicas para el diagnóstico del raquitismo en los retoños de la caña de azúcar en Cuba. *Revista Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba*. (3):18-23.
- Monteiro, M. (2013). *Termoterapia asociada al cultivo de tejidos para la obtención de plantas de caña de azúcar de la variedad SP80-3280 libres de Leifsonia xyli subsp. xyli*. Sao Paulo. Tesis de Máster en Agronomía, Univ. Sao Paulo, Brasil.
- Peña, I., J. Pérez, D. López y L. Batista. (2010). Principales enfermedades virales y afines de los cítricos. *European Journal of Plant Pathology*. 110:175-190.
- Peralta, E. y A. Villoch. (1999). Validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados para el diagnóstico de fitopatógenos. *Resúmenes del XXVI Cong. Nac. Soc. Mex. Fitopatol. y X Cong. Asoc. Latinoam. Fitopatol.* Guadalajara, México.
- Pérez, H., I. Santana e I. Rodríguez. (2013). *Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar*. La Habana, Cuba. 290 p.
- Rufin, Y. (2011). *Raquitismo de los retoños de la caña de azúcar: resistencia varietal y comparación de métodos de evaluación*. La Habana. Tesis Máster en Sanidad Vegetal. Univ. Agraria Habana.
- Santana, I., M. González, R. Crespo y S. Guillen. (2014). Instructivo técnico para el manejo de la caña de azúcar. La Habana. *INICA*. 302 p.
- Sepúlveda, P. (2013). Trasmisión de virus por semillas. *Tierra Adentro*. 2:18-21.
- Silva, H. (2013). Enfermedades bacterianas asociadas a caña de azúcar. *Rev. Mex. Fitopatología*. 31 (Suplemento): 63-64.
- Taher, K. (2010). *Bases metodológicas para el manejo integrado del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Irán*. Santa Clara. Tesis Doctor en Ciencias Agrícolas, Univ. Central de las Villas. 107 p.
- Zardón, M., A. Gallo, J. Mesa, A. Arencibia, L. Zamora, Y. Martínez, M. Sautié, M. Casas y M. La O. (2012). Detección de infecciones mixtas en genotipos de caña de azúcar en Cuba. *Rev. Protección Vegetal*. 27 (2): 77-84.