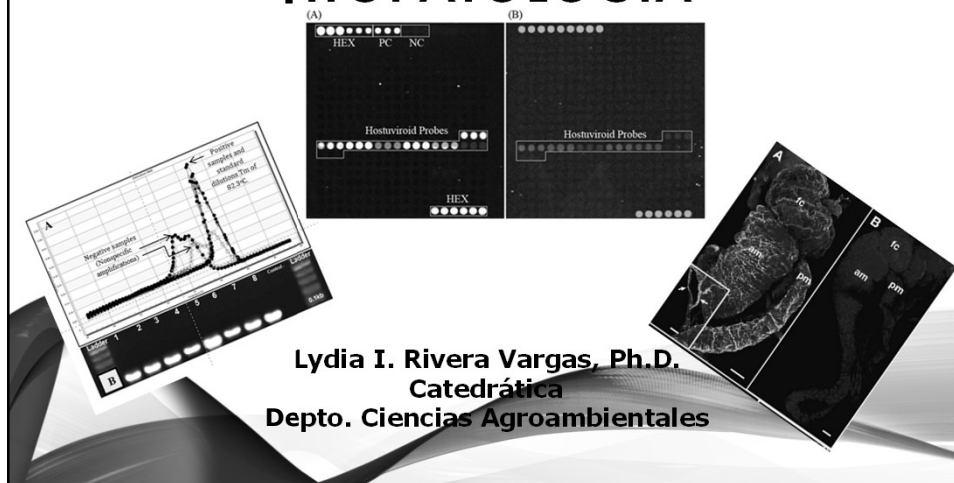


# NUEVAS TECNOLOGÍAS Y CONCEPTOS UTILIZADOS EN FITOPATOLOGÍA



## TEMAS A DISCUTIR

- Nuevas tecnologías y conceptos
  - Narices y lenguas electrónicas
  - Nanotecnología
  - Fitobiomas
  - Leaf doctor - Aplicación interactiva para cuantificar intensidad de la enfermedad
  - Biosensores
- Otros ensayos inmunológicos o serológicos
  - "Dip Stick"
  - Inmunofluorescencia
  - Marcado con oro
- Ensayos que utilizan ácidos nucleicos (DNA o RNA)
  - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variaciones
    - RLFP's
    - Reverse Transcriptase – PCR
    - Multiplex PCR
    - Real-Time PCR
    - Microarreglos

## NUEVAS TECNOLOGÍAS Y CONCEPTOS

### • Narices y lenguas electrónicas

- Son multisensores electrónicos diseñados para examinar ciertos compuestos que sirven de marcadores de calidad, detectan impurezas o infección de plantas y alimentos (i.e. micotoxinas).
- Tecnología de sensores que detectan:
  - Mezclas complejas en el aire (aromas) o en un alimento
  - Compuestos volátiles producidos por maderas en descomposición o plantas enfermas.
  - Levaduras que descomponen el vino (lenguas electrónicas).

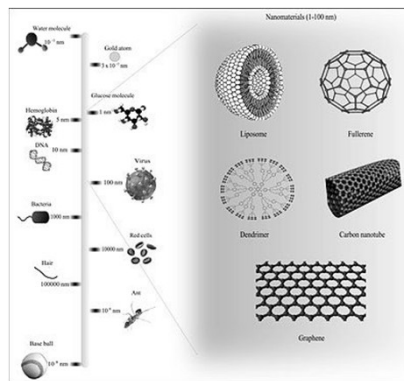
ScenTrak, Cogniscent®



Dr. N. Myung de la Universidad de California en Riverside

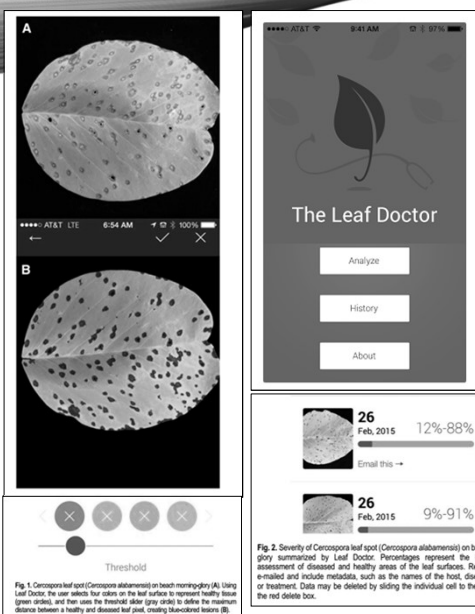
## NANOTECNOLOGÍA

- Se refiere a escalas supramoleculares,
  - un nanometro (nm) es  $10^{-9}$  de un metro.
- En fitopatología se han utilizado:
  - nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de plantas para inhibir bacterias, hongos y oomicetos (i.e. *Phytophthora*) fitopatógenos.
  - nanoemulsiones enlazadas a ampicilina resultando exitosas en el control del HLB o "citrus greening".



[en.wikipedia.org/wiki/Nanotechnology](http://en.wikipedia.org/wiki/Nanotechnology)

## “LEAF DOCTOR”



**Fig. 1.** Cercospora leaf spot (*Cercospora albamerisii*) on beech morning-glory. (A) Using Leaf Doctor, the user selects four sites on the leaf surface to represent healthy tissue (green circles), and then uses the threshold slider (gray circle) to define the maximum distance between a healthy and diseased leaf pixel, creating binarized lesions (B).

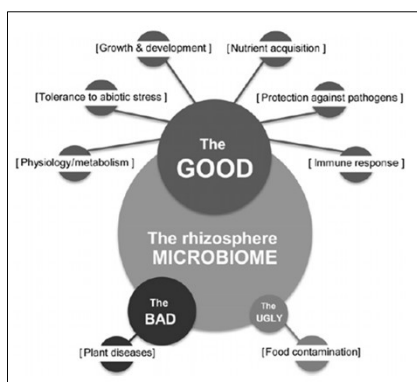
**Fig. 2.** Severity of *Cercospora* leaf spot (*Cercospora albamerisii*) on beech morning-glory summarized by Leaf Doctor. Percentages represent the Leaf Doctor's assessment of diseased and healthy areas of the leaf surfaces. Results may be e-mailed and include metadata, such as the names of the host, disease, location, or treatment. Data may be deleted by sliding the individual cell to the left to reveal the red delete box.

- Aplicación para teléfonos inteligentes y iPads.
- Distingue entre hojas enfermas y sanas.
- Calcula el % de severidad de la enfermedad.
- Ventajas
  - Rápido en el procesamiento de imágenes
  - Preciso
  - Fácil de usar
  - Gratis

Pethybridge and Nelson, 2015. Plant Disease

## FITOBIOMAS

- Se promueve con el estudio de los fitobiomas decifrar las interacciones de las plantas con microorganismos.
- Estas interacciones podrían explotarse en beneficio de las plantas.
- Las comunidades microbianas juegan un rol crucial e importante en el funcionamiento de las plantas ya que influyen en su fisiología y desarrollo.
- Los microbiomas pueden promover, la germinación de semillas, vigor, nutrición, productividad, crecimiento y reacción a enfermedades.



**The rhizosphere MICROBIOME**

**The GOOD**

- [Growth & development]
- [Nutrient acquisition]
- [Tolerance to abiotic stress]
- [Protection against pathogens]
- [Physiology/metabolism]
- [Immune response]

**The BAD**

- [Plant diseases]

**The UGLY**

- [Food contamination]

From: Mendes et al, 2013. FEMS

## BIOSENSORES

- Las cianobacterias bioluminiscentes son utilizadas en la detección de herbicidas y otros contaminantes de aire.
  - Responden a estos reduciendo su crecimiento por ende su bioluminiscencia.
- Hongos (líquenes) son indicadores de salud en el bosque.
- Insectos acuáticos indicadores de pureza en cuerpos de agua.

## ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

- **ELISA** = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
  - **Factores que afectan la técnica de ELISA**
    - Su aplicación, si es a nivel de campo o laboratorio (> control).
    - Muestra: suelo, agua, tejido vegetal.
    - Aunque no distingue entre células viables y muertas, es una ventaja cuando la condición de las muestras es pobre para aislar el patógeno.
    - Nivel de sensibilidad que se requiere
    - La necesidad de resultados rápidos y de cuantificar
    - El técnico
- **“Immunostrips”**
  - Limitante: Detectan un limitado número de especies de virus, bacterias y oomicetos.

## DIPSTICK ASSAY

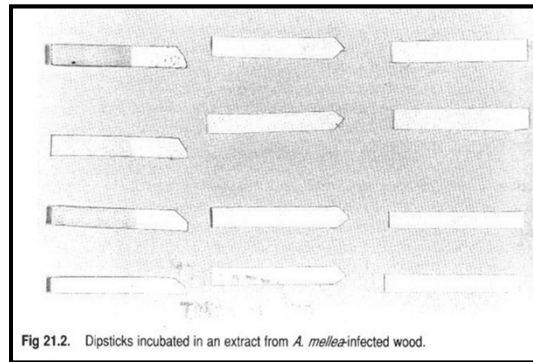


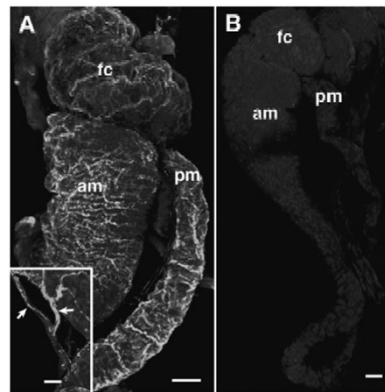
Fig 21.2. Dipsticks incubated in an extract from *A. mellea*-infected wood.



*Armillaria mellea* en tejido de un árbol

## INMUNOFLOURESCENCIA

- Se utilizan fluorocromos de color verde amarillo (fluorescein) o rojos (rhodamine).
- Díficil de estandarizar e interpretar.
- Requiere equipo sofisticado y experiencia para ver y cuantificar la reacción.
- Más sensitiva que la ELISA.
- De uso en investigación.



A. Espiroplasma (verde fluorescente) en sistema digestivo del vector (saltamontes)

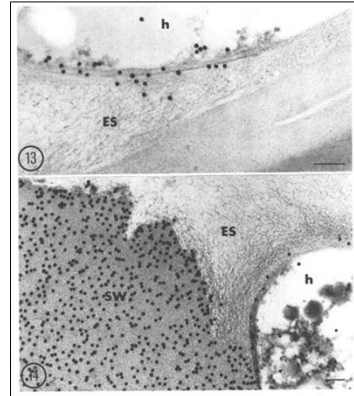
B. Control

Tomado de: Ammar y Hogenhout, 2005. Ann. Entomol. Soc. Am. 98(6): 820-826.

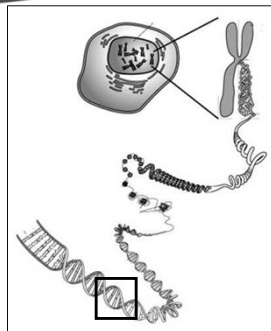
## MARCADO CON ORO (IMMUNOGOLD LABELING)

- Se utilizó por primera vez con el microscopio electrónico, actualmente se utiliza con otros sistemas.
- Se requiere de equipo y conocimiento técnico.

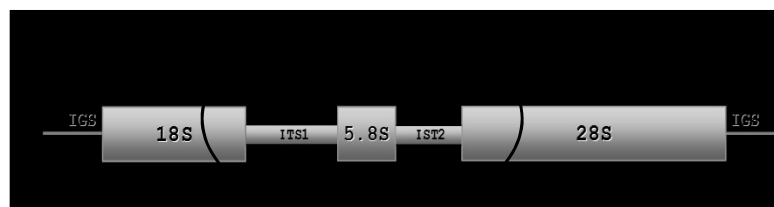
**Inmunolocalización de lacasas en árbol de *Betula* infectada con un basidiomiceto (*Rigidoporus lignosus*)**



## ENSAYOS QUE UTILIZAN ÁCIDOS NUCLEÍCOS



- Dependien de:
  - la extracción del ácido nucleico (i.e. DNA o RNA).
  - Reacción en cadena de la polimerasa o PCR
    - Utiliza iniciadores (primers) dependiendo de la región o gen a amplificar.
    - En la identificación de hongos la región genética más utilizada es ITS del rDNA (ej. ITS1 y ITS4).



## Diagnóstico de *Phytophthora* en raíces de frambuesas

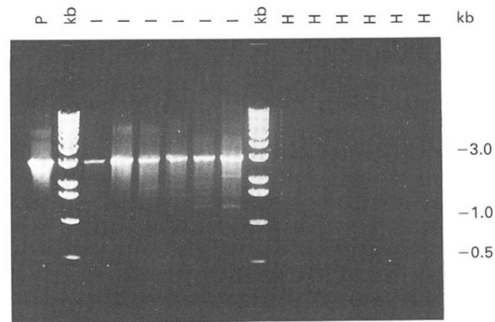
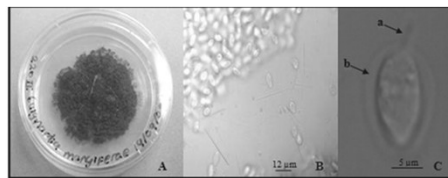


Fig 19.3. Agarose gel electrophoresis of PCR products from DNA from a *P. fragariae* var. *rubii* culture (P), healthy raspberry roots (H), and raspberry roots infected with *P. fragariae* var. *rubii* (I), kb = size marker (1 kb-ladder, Life Technologies).

Stammler y Seemüller, 1994. Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi. CAB International, UK

## *Guignardia mangiferae*: hongo endófito en tejidos de rambután



Serrato Díaz, 2010

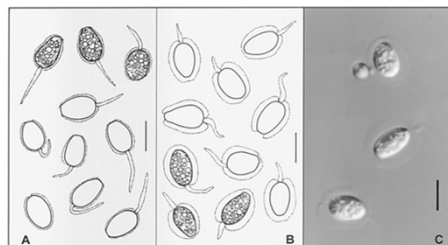


Fig. 6. Comparison of the mesial crossidial sheath of *Guignardia citricarpa* sensu lato group I (aG; *G. citricarpa* proper) and group II (aG; *G. mangiferae*). A, Camera lucida drawing of conidia of group I (isolates 70). B, Camera lucida drawing of conidia of group II (isolates 48). C, Photograph of conidia of group II (isolates 56). Scale bar = 10 µm.

Baayen et al., 2002. Phytopathology 92:464-477.

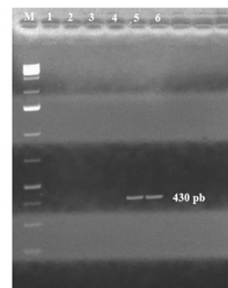

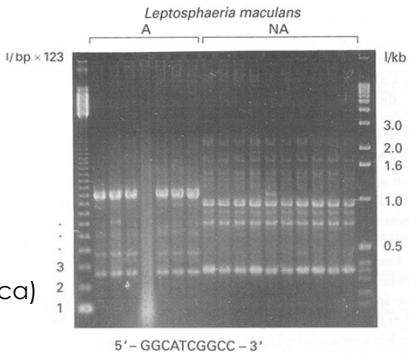


Figura 39. Gel de electroforesis del producto de PCR de los aislados 147.II y 220.II utilizando los primers CITRIC1/ITS4 y CAMEL2/ITS4. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; Segunda y tercera fosa, controles negativos con aislado 147.II de *G. gloeosporioides*; cuarta y quinta fosa, aislado 220.II *G. mangiferae* con los primers CITRIC1/ITS4 y quinta y sexta fosa, aislado 220.II con los primers CAMEL2/ITS4.

Serrato Díaz, 2010

## DIAGNÓSTICO DE AISLADOS VIRULENTOS (A) Y NO VIRULENTOS (NA) DEL HONGO, *LEPTOSPHAERIA MACULANS*, UTILIZANDO RAPD-PCR\*

Pata negra del col de bruselas (Brassica)

\* Los primers se escogen al azar

Fig 1.1. Differentiation between aggressive and non-aggressive strains of *L. maculans* using primer 17 (5'-GGCATCGGCC-3'). Left-hand markers: 123 bp-ladder; right-hand marker 1 kb-ladder; lanes 1-3 and 5-7: aggressive isolates; lanes 8-17: non-aggressive isolates.

Schäfer y Wöstemeyer, 1994. Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi. CAB International, UK

## RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

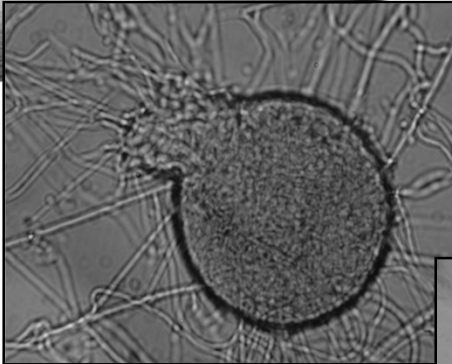
- Utiliza enzimas de restricción (RE)
- AluI y Hae III (4 cutter) producen terminales obtusos
- BamHI, HindIII y EcoRI (6 cutter) terminales pegajosos (desiguales)

AluI	$\begin{array}{c} 5' \dots A G C T \dots 3' \\ 3' \dots T C G A \dots 5' \end{array}$
HaeIII	$\begin{array}{c} 5' \dots G G C C \dots 3' \\ 3' \dots C C G G \dots 5' \end{array}$
BamHI	$\begin{array}{c} 5' \dots G G A T C C \dots 3' \\ 3' \dots C C T A G G \dots 5' \end{array}$
HindIII	$\begin{array}{c} 5' \dots A A G C T T \dots 3' \\ 3' \dots T T C G A A \dots 5' \end{array}$
EcoRI	$\begin{array}{c} 5' \dots G A A T T C \dots 3' \\ 3' \dots C T T A A G \dots 5' \end{array}$

AluI and HaeIII produce blunt ends

BamHI HindIII and EcoRI produce "sticky" ends




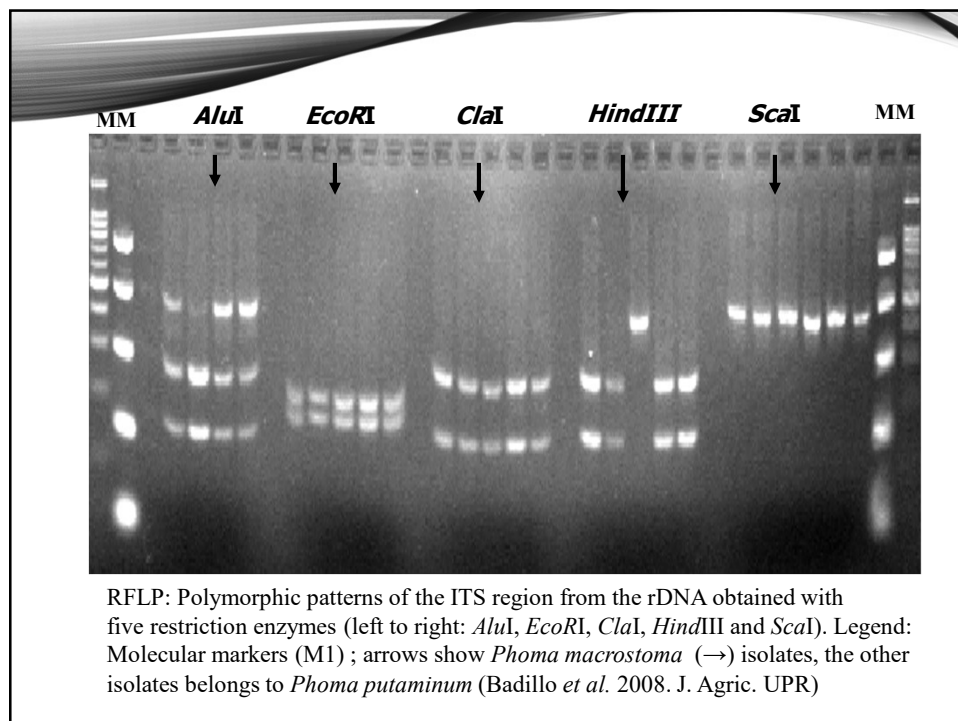


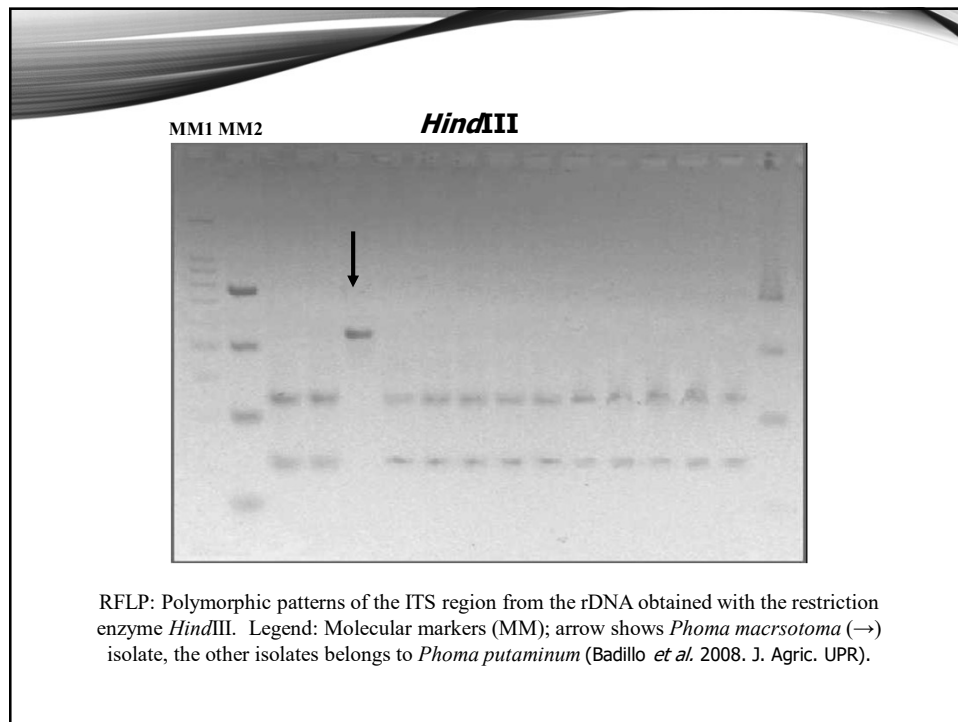
*Phoma putaminum* y  
*Phoma macrostoma*

Badillo *et al.* 2008. J. Agric. UPR

**RFLP para  
diferenciar especies  
de *Phoma* spp.  
aisladas del suelo**

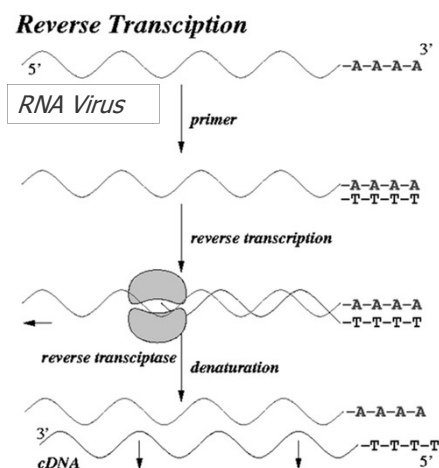




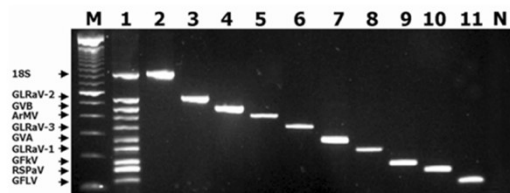


## REVERSE TRANSCRIPTION - PCR

- Para detección de virus a base de RNA.
- Extracción de RNA viral.
- El RNA se trata con DNAsas para eliminar toda posible contaminación con DNA.
- Se genera una copia DNA del RNA con la enzima transcriptasa en reverso.
- Se corre el PCR con primers específicos.



## MULTIPLEX RT-PCR



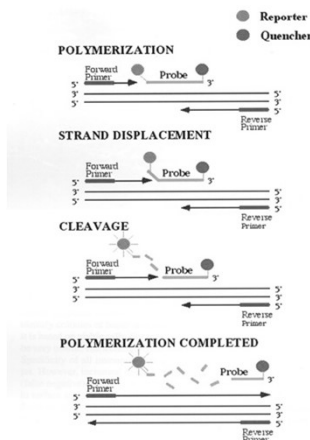
**Fig. 2.** Agarose gel electrophoretic analysis of DNA fragments amplified from infected and healthy grapevines by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (mRT-PCR) and single RT-PCR (sRT-PCR). Details on primers are provided in Table 1. Lane 1: positive control, all primers; lane 2: healthy control, primers for 18S rRNA (844 bp); lane 3: Vermentino, primers for *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2; 543 bp); lane 4: Albarossa, primers for *Grapevine virus B* (GVB; 460 bp); lane 5: Pinot Noir, primers for *Arabid mosaic virus* (ArMV; 402 bp); lane 6: Bruciapagliaio, primers for GLRaV-3 (336 bp); lane 7: Bruciapagliaio, primers for *Grapevine virus A* (GVA; 272 bp); lane 8: Bruciapagliaio, primers for GLRaV-1 (232 bp); lane 9: Moscato, primers for *Grapevine fleck virus* (GFkV; 179 bp); lane 10: Moscato, primers for *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV; 155 bp); lane 11: Kober 5BB, primers for *Grapevine fanleaf virus* (GFLV; 118 bp); lane N: water with all the primers; and lane M: 100-bp DNA ladder.

\* Se detectaron 9 virus diferentes que ocurren en la uva.

Gambino, G., and Gribaudo, I. 2006. *Phytopathology* 96:1223-1229.

## REAL TIME - PCR

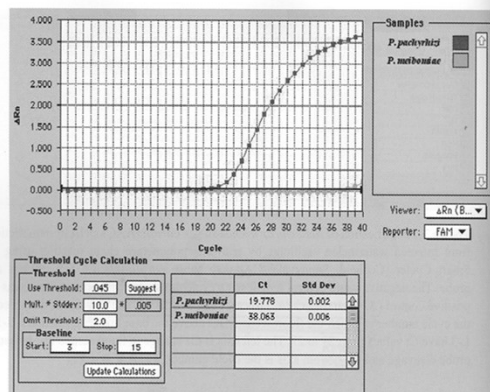
- Específica, sensitiva y reproducible.
- Monitorea la fluorescencia emitida durante la reacción, es un indicador de la producción del fragmento de DNA de interés durante cada ciclo de PCR.
- Detecta y cuantifica una molécula reportera fluorescente (Taqman®).
- La señal aumenta en proporción directa a la cantidad del producto de PCR en la reacción.



**Figure 2** The principles of real-time polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan chemistry. The probe sequence consists of 25 to 30 nucleotides and is labeled at the 5' end with a fluorescent reporter dye such as 6-carboxy-fluorescein (FAM) and at the 3' end with a quencher dye like 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) (Applied Biosystems). During the strand displacement step, the 5' - 3' exonuclease activity of the Taq polymerase (AmpliTag Gold, Applied Biosystems) releases the fluorescent reporter from the probe sequence which is measured by a CCD camera at each cycle of amplification.

## REAL TIME - PCR

- No requiere correr una electroforesis para detectar el producto de PCR.



Schaad et al., 2003. Annu. Rev. Phytopathol. 41:305–24.

Figure 4 Real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA from the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* by TaqMan PCR using an ABI Prism 7700 Sequence Detection System. *P. pachyrhizi* specific primers Ppm1 and Ppa2 were used with a 5'-FAM-labeled internal probe (Frederick et al. 2002). The left axis ( $\Delta Rn$ ) is the change in fluorescence that is a measure of probe cleavage efficiency, and the bottom axis is the PCR cycling stage.

## DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN CULTIVOS DE PR UTILIZANDO REAL TIME-PCR

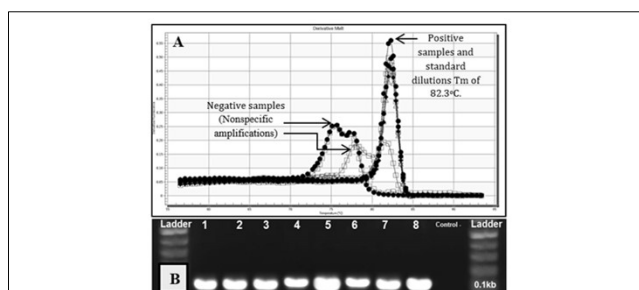


Fig. 2. qPCR amplification of phytoplasma DNA using SYBR® green assay and universal primers for phytoplasma detection designed in this study. A. Component Melt (Melting Temperature 82.3°C) from positive sample PP (JD) 33 and the DNA standard dilutions. B. Electrophoresis on 1% agarose gel of qPCR products. Lanes 1. pigeon pea (JD) 33; 2. pigeon pea (Is) 43; 3. pigeon pea (Is) 44; 4. pigeon pea (Is) 45; 5. periwinkle (Ma) 5; 6. periwinkle (Ma) 6; 7. periwinkle (Ma) 7; 8. orange (JD) 32. Negative control (molecular water). First and last lane: 100bp DNA ladder. Locations: Ad = Adjuntas; JD = Juana Diaz; Is = Isabela and Ma = Mayagüez. Similarly, melting and component curves differed in fluorescence levels compared to those obtained with positive

Caicedo, 2015.

## MICROARREGLOS (MICROARRAY ASSAYS)

- Se puede estudiar la expresión de muchos genes a la vez.
- Se utiliza robótica para colocar el DNA en las laminillas modificadas.
- Las sonda utilizadas son fluorescentes y el cambio en color indica el nivel de expresión del gen.
- Es una técnica muy costosa, es utilizada en medicina.

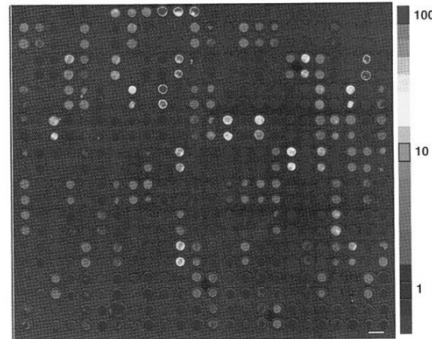
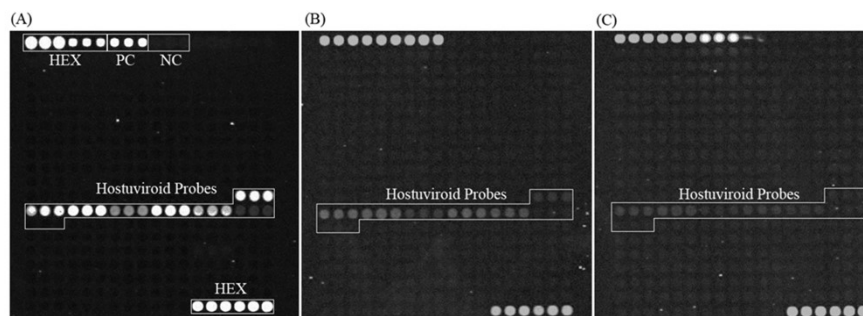


Fig. 3. Detection technology. Human cDNAs were amplified by PCR, purified with an ArrayIt kit (TeleChem), and spotted in duplicate on modified glass microscope slides (CEL Associates) with a robotic spotting device. The cDNAs were attached covalently, denatured, and hybridized to a fluorescent probe prepared by reverse transcription of total human mRNA. The detection device from Norgen Systems ([rick@isl.stanford.edu](mailto:rick@isl.stanford.edu)) included a xenon light source and a charge-coupled device camera. The color bar (right), which indicates gene expression levels (mRNAs per 100,000), was calibrated using control features spotted in triplicate (top line). Scale bar = 200µm.

## MICROARREGLOS PARA DETECCIÓN DE VIROIDES



Zhang et al., 2013. PLOS