



Técnicas de Diagnóstico de Virus Fitopatógenos



Los virus fitopatógenos son agentes infecciosos demasiado pequeños, sin embargo, a pesar de su tamaño son capaces de causar un caos en los cultivos. Están compuestos por una pequeña porción de ácido nucleico rodeado de una cubierta proteica y son causantes de diversas e importantes enfermedades vegetales que afectan el rendimiento y la calidad de los cultivos en todas partes del mundo (**Gergerich, 2006**).



Figura: Síntomas de virus en hojas de chile
Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, **FERTILAB**.

Identificar al o los virus que pueden ser la causa de la enfermedad en nuestros cultivos, no es tarea fácil. Los síntomas que producen son muy variados, van desde mosaicos, moteados, variegación (rayas), clorosis, necrosis, manchas anulares, enanismo, enrollamientos foliares, amarillamientos, aborto floral, tumores, deformaciones de hoja, tallo y fruto, entre otros (Agrios, 2005). Por lo tanto, para identificar correctamente el virus y/o los virus que está(n) presente(s) en el cultivo, se recomienda tomar muestras representativas de los síntomas (iniciales y avanzados) observados en el cultivo y enviarlas al laboratorio para tener un Diagnóstico Fitosanitario cierto, con el cual nos permita tomar decisiones y emplear un manejo adecuado.

La pregunta que como agricultores siempre nos hacemos es:

¿Qué laboratorio me ofrece un diagnóstico fitosanitario que cumpla con estándares de calidad y con técnicas analíticas que permitan conocer con precisión el o los virus que están afectando mi cultivo?

La detección de estos agentes es compleja debido a que son parásitos obligados que dependen de la maquinaria celular de sus hospedantes para replicarse, es por ello que se necesitan de técnicas especializadas tales como: el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o **ELISA** (***Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay***, por sus siglas en inglés), distintas variantes de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**, ***Polymerase Chain Reaction***, por sus siglas en inglés) y recientemente secuenciación de segunda generación (**NGS**, ***Next Generation Sequencing***, por sus siglas en inglés) entre otros métodos (***González-Garza, 2017***).



Figura:
Síntomas de virus en plantas de chile.
Laboratorio de Virología,
CIIDIR-IPN Sinaloa.

El ensayo de **ELISA** es una técnica serológica que es usada para detectar y cuantificar diversas sustancias y patógenos, entre ellos los virus (antígenos). La detección sucede por la interacción de un anticuerpo (proteína), el antígeno (virus) y una enzima que reconoce la interacción de ambos. La técnica consiste en disponer el anticuerpo en una base sólida, posteriormente el antígeno, enzima y reactivos que ayudan a que suceda la interacción. El método es relativamente accesible y puede ser aplicado a varios tipos de morfología de virus, preparaciones purificadas o de extractos crudos (**González-Garza, 2017**).

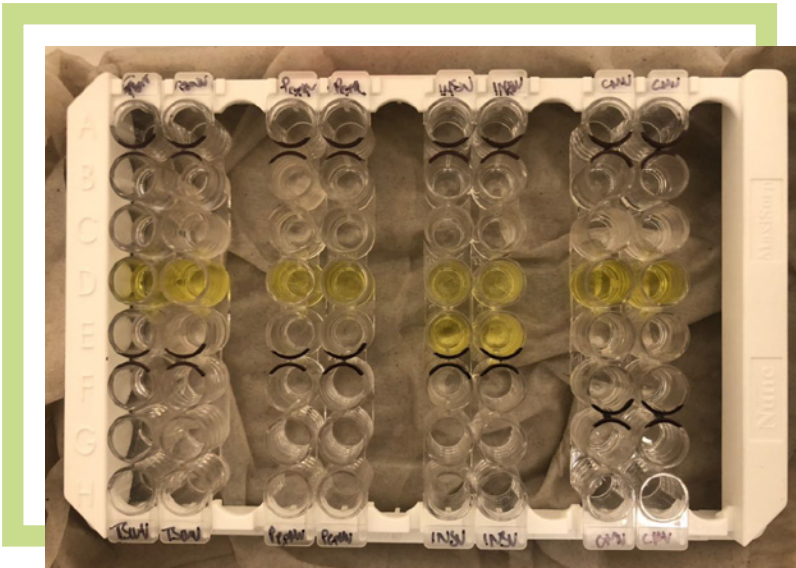


Figura: Prueba Elisa en laboratorio **Fertilab**.



En contraste con la técnica de **ELISA**, las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o **PCR**, son mucho más sensibles y específicas. El fundamento de la **PCR** es sintetizar muchas veces un fragmento de ADN utilizando la enzima polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas. Cuando se realiza una reacción de **PCR** se simula lo que sucede en una célula cuando se replica el ADN, en esta se mezcla todos los ingredientes necesarios para la síntesis: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar, donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, "oligos", etc.) necesarios para que se inicie la replicación, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de cloruro de magnesio (MgCl₂), cloruro de potasio (KCl), y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (**Espinosa, 2007**).

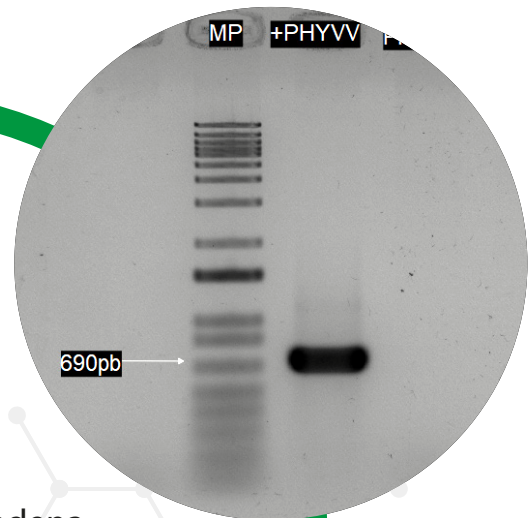
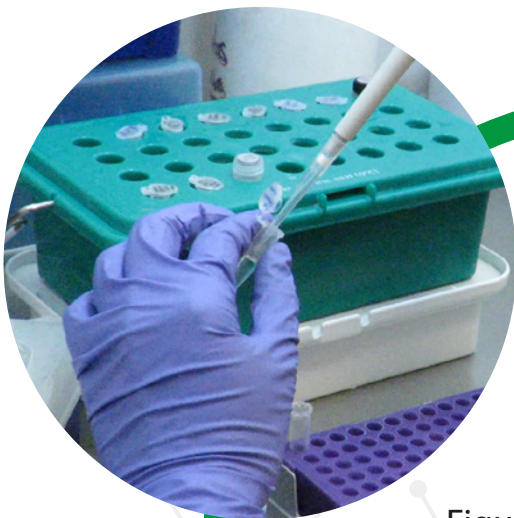


Figura: Reacción en cadena de la polimerasa **PCR**. Laboratorio **Fertilab**.



Así mismo, la técnica de PCR tiene distintas variantes tales como la RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa) que se utiliza para la detección y amplificación de virus de ARN a diferencia de la PCR convencional que solo detecta virus de ADN. El primer paso es extraer el ARN total de las células en estudio (células vegetales) y se transcribe a ADN complementario (cADN) mediante la enzima transcriptasa inversa. Esta enzima existe en la naturaleza como parte del mecanismo de replicación en virus. Por último, el cADN se usa para realizar la PCR como anteriormente se explicó.



Figura: Técnica **RT-PCR**.
Laboratorio **Fertilab**.

La secuenciación de segunda generación (NGS), es una técnica muy robusta que consiste en conocer el viroma (todos los virus que puedan estar en una sola planta o vector) mediante secuenciación, sin embargo, es costosa y no viable para diagnóstico por lo que generalmente se utiliza en investigación.

Los métodos de detección deben ser lo más convenientes, efectivos, específicos y rápidos, debido a que la exactitud de los resultados depende directamente de la sensibilidad de las técnicas utilizadas. En este sentido, el **Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario** de **FERTILAB** cuenta con personal altamente calificado en las técnicas de detección de virus fitopatógenos ofreciendo tiempos de entrega de resultados de 7 días hábiles en muestras de planta y 10 días hábiles en muestras de semillas (a partir de la germinación).

Referencias

- Agrios, G. N., 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press.
- Espinosa, A. L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte, L. E. V. Souza y X. Aguirre. Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.
- Gergerich, R. C.; Dolja, V. V. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0122-01.
- González-Garza, 2017. Evolution of diagnostic technics for plant viruses. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 591-610. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-1.
- López-Luque C.A. 2019. "Análisis de los elementos genéticos del Virus Huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV) asociados a su patogenicidad en tomate". Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral y Regional Unidad Sinaloa.