

Capacidad técnica para el diagnóstico de BACTERIOSIS DE CÍTRICOS

La capacidad técnica para detectar de manera eficaz organismos fitopatógenos es esencial en los programas de gestión de las enfermedades de plantas. En este trabajo se describe un ensayo entre diversos laboratorios europeos y americanos, gracias a la colaboración internacional articulada en el marco de dos redes CYTED, para evaluar la capacidad de diagnóstico de las principales bacteriosis de cítricos.

INMACULADA NAVARRO-HERRERO, ESTER MARCO-NOALES

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia

La citricultura española goza de un excelente estado sanitario, gracias a la utilización exclusiva de plantas certificadas (libres de los principales virus y bacterias patógenos de los cítricos). No obstante, hay diversos factores que facilitan la introducción de enfermedades emergentes que amenazarían seriamente nuestra citricultura, como la llegada y el avance de insectos vectores transmisores, la entrada ilegal de material vegetal y la disminución de inspecciones fitosanitarias. Además, el cambio global contribuye a que las áreas cítricas españolas constituyan un ambiente propicio para que organismos exóticos puedan establecerse y llegar a expandirse.

El diagnóstico de las enfermedades y la detección e identificación de los organismos patógenos son pasos críticos para la aplicación de medidas fitosanitarias. El diagnóstico trata de la identificación de la naturaleza y la causa de la enfermedad, por lo que se refiere a las plantas que presentan síntomas. La detección se ocupa de determinar la presencia de un determinado organismo (organismo diana) dentro de una muestra, con especial énfasis en los individuos asintomáticos. Con el objetivo de obtener re-

sultados precisos y fiables, se intenta que las técnicas empleadas tengan una elevada especificidad, es decir, la capacidad de distinguir lo que es verdaderamente positivo (porque contiene el organismo diana) de lo que no lo es, y una gran sensibilidad, es decir, la capacidad de detectar el mínimo número posible del organismo que estamos buscando.

El diagnóstico de las enfermedades y la detección e identificación de los organismos patógenos son pasos críticos para la aplicación de medidas fitosanitarias

Las principales bacteriosis de cítricos son el HLB, la cancrrosis y la clorosis variegada

En los últimos 20 años, algunas enfermedades bacterianas han afectado enormemente a la producción de cítricos en determinados países, como Estados Unidos y Brasil, causando un impacto desastroso y, en algunos casos, probablemente irreversible en la industria cítrica de estas áreas.

Las tres principales enfermedades bacterianas de cítricos son: la cancrrosis o chancro bacteriano de los cítricos (CBC, *Citrus Bacterial Canker*), producida por *Xanthomonas citri*; la clorosis variegada, CVC (*Citrus Variegated Chlorosis*), causada por *Xylella fastidiosa*; y el Huanglongbing (HLB), asociado a especies de '*Candidatus Liberibacter*'. De estas tres enfermedades, actualmente la más importante es el HLB (**Figura 1**), seguida de la cancrrosis y, en último lugar, la CVC. Aunque CBC y CVC causaron muchas pérdidas en Florida y Brasil, respectivamente, las dos enfermedades han quedado muy relegadas en importancia al emerger en ambas zonas el HLB. De hecho, el HLB ha provocado en estas áreas, desde su aparición, la erradicación de millones de árboles, causando pérdi-

das de billones de dólares. Ninguna de estas tres enfermedades está presente en España y tampoco en Europa, por lo que preservar el estatus sanitario de nuestra citricultura es un objetivo primordial.

Aunque los agentes causales de estas enfermedades atacan a un hospedador común, el cítrico, cada uno de ellos adopta una estrategia de patogénesis y dispersión diferente, y produce distintos síntomas. *X. citri* invade el mesófilo de la hoja entrando por aberturas naturales, como los estomas, y a través de lesiones, y prolifera en los espacios intercelulares, aunque también puede sobrevivir y multiplicarse en la superficie del hospedador como epífita. *X. fastidiosa* y 'Ca. Liberibacter' son transmitidas por determinados insectos y proliferan en el sistema vascular del hospedador: en el xilema, en el primer caso, y en el floema, en el segundo. Los vectores de *X. fastidiosa* son insectos que se alimentan del xilema, hemípteros pertenecientes al suborden Cicadomorpha (en Europa especies de cercópidos y cícadas), mientras que los de 'Ca. Liberibacter' son los psílidos *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*, que se alimentan de floema.

Protocolos estandarizados para un diagnóstico fiable

Una de las actividades de la *European Plant Protection Organization* (EPPO), organización intergubernamental que tiene como fin la cooperación en la protección vegetal en Europa y la región mediterránea, es la elaboración de protocolos de diagnóstico para los organismos fitopatógenos más relevantes. En estos protocolos se integran diversas técnicas, para hacer de la detección un proceso altamente fiable, aunque sin perder de vista dos cuestiones importantes: que las técnicas, con sus ventajas y desventajas, tienen limitaciones; y que, dentro de lo que se pueden considerar las fases de una enfermedad, la mayoría de las técnicas de detección se sitúan en etapas no muy tempranas, generalmente cuando el organismo patógeno ya está establecido en un hospedador.

El HLB es la enfermedad de cítricos más devastadora, provocando la erradicación de millones de árboles

En este contexto podemos situar los protocolos de la EPPO para el diagnóstico de las principales bacteriosis de cítricos, que se revisan de manera continua para introducir cambios que permitan optimizar el proceso. Los protocolos EPPO para *X. citri* (PM 7/44) y para 'Ca. Liberibacter'

asociados a HLB (PM 7/121) están en su segunda revisión, de 2023 y 2021, respectivamente, mientras que el de *X. fastidiosa* (7/24) está ya en su quinta revisión, de 2023.

Cooperación entre países iberoamericanos

El programa CYTED es el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, creado por los gobiernos de los países iberoamericanos para promover la cooperación en temas de ciencia, tecnología e innovación para el desarrollo armónico de Iberoamérica. CYTED logra sus objetivos a través de diferentes instrumentos de financiación que movilizan a empresarios, investigadores y expertos iberoamericanos, y les permiten capacitarse y generar proyectos conjuntos de investigación, desarrollo e innovación. Es una herramienta más para que los países que integran CYTED logren mantenerse actuali-



FIGURA 1
Síntomas de HLB en plantaciones de cítricos de Cuba (Foto: E. Marco-Noales, IVIA).

zados en los más recientes avances y desarrollos científico-tecnológicos. Uno de los instrumentos de CYTED son las Redes temáticas: asociaciones de grupos de investigación y desarrollo (I+D) de entidades públicas o privadas y empresas de los países miembros del programa CYTED. El objetivo principal de estas redes es el intercambio de conocimientos entre grupos de I+D y la potenciación de la cooperación como método de trabajo. Entre 2019 y 2023 se han desarrollado dos redes CYTED dentro del área de Agroalimentación: CITRIBAC (Red Iberoamericana para la prevención, diagnóstico y manejo de bacteriosis de cítricos), con 7 grupos de 7 países, coordinada por la Dra. Lochy Batista, del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (La Habana, Cuba); e IberXyfas (Red Iberoamericana para la vigilancia de *Xylella fastidiosa*), con 32 grupos (5 de ellos, empresas) de 10 países diferentes, coordinada por el Dr. Juli Peretó, del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (UV-CSIC) (Valencia, España). El objetivo de CITRIBAC era implementar una red multinacional e interdisciplinaria para promover el intercambio científico y la cooperación, que faciliten la homogeneización y la optimización del diagnóstico y manejo de bacteriosis de cítricos en los países iberoamericanos, mientras que el de IberXyfas era intercambiar

información y conocimientos entre los países afectados por enfermedades causadas por *X. fastidiosa*, y desarrollar un sistema de alerta y vigilancia tecnológica que permita adoptar las medidas necesarias para hacer un seguimiento, contener y erradicar en último término la enfermedad.

Organización de un ensayo internacional inter-laboratorios para la detección de las principales bacterias patógenas de cítricos

El equipo de Bacteriología del IVIA participó de forma activa tanto en CITRIBAC como en IberXyfas. Y, en este contexto, se decidió establecer una sinergia entre las dos redes con un objetivo común: armonizar las técnicas de detección molecular para un diagnóstico fiable de las principales bacteriosis de cítricos (HLB, CVC y CBC). Para llevar a cabo este objetivo, se planteó un ejercicio colaborativo que permitiese evaluar la capacidad técnica de diferentes laboratorios y, en función de los resultados, facilitar el entrenamiento y las herramientas de detección necesarios a aquellos grupos que desearan completar su capacitación para el análisis de las bacterias de cítricos.

El Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), una entidad americana que presta

cooperación técnica y financiera en recursos agropecuarios a los Ministerios y Secretarías de Agricultura y Ganadería de sus nueve Estados miembros, costeó la participación en el ensayo de los laboratorios competentes en Sanidad Vegetal de los países pertenecientes a OIRSA.

La preparación y ejecución del ensayo se hizo de manera secuencial, realizando primero un análisis de la situación de cada laboratorio interesado en participar, después evaluando esos resultados, seleccionando protocolos, diseñando y preparando el ejercicio, y, finalmente, mandando las muestras a cada laboratorio participante para su análisis. En una primera etapa, se envió una encuesta a cada laboratorio, potencialmente interesado, sobre los procedimientos de trabajo que sigue cada uno de forma habitual para la detección de las bacterias patógenas de cítricos. Se recabó información, tanto sobre el equipamiento disponible para cada una de las técnicas que se podrían utilizar como sobre las técnicas que emplean habitualmente para la detección de estas bacterias. Las respuestas revelaron cierta heterogeneidad en el equipamiento y en las técnicas entre los laboratorios. Y, por ello, se planteó un segundo objetivo, que fue seleccionar las técnicas más sensibles que fueran accesibles a todos.

Así, en la segunda encuesta se plantearon varias opciones de PCR en

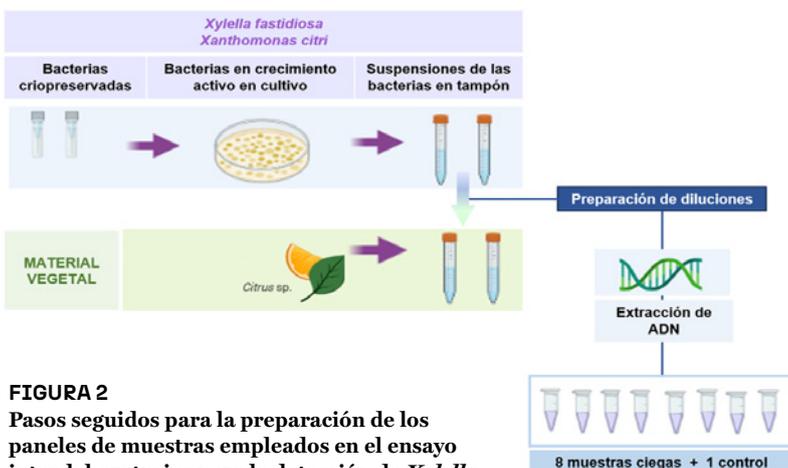
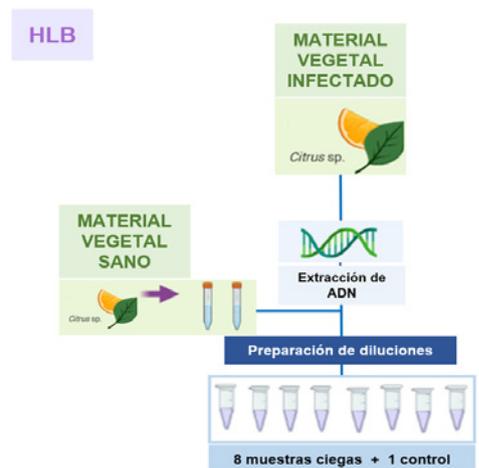


FIGURA 2
Pasos seguidos para la preparación de los paneles de muestras empleados en el ensayo inter-laboratorios para la detección de *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas citri* y especies de ‘*Candidatus Liberibacter*’ asociadas a HLB.



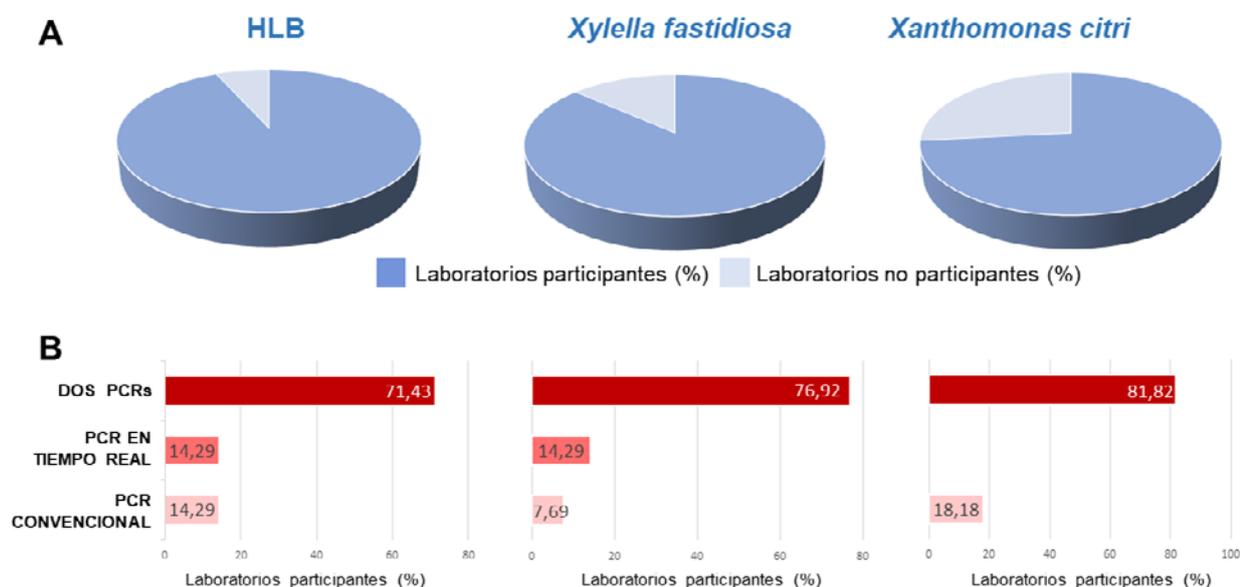


FIGURA 3 Participación en el ensayo inter-laboratorios. Elección de participación en cada uno de los patosistemas (A) y selección de las técnicas de detección a utilizar (B).

tiempo real y de PCR convencional, todas recogidas en los mencionados protocolos EPPO para cada uno de los patosistemas, a fin de comprobar si los diferentes laboratorios tenían la capacidad de utilizar protocolos que ya están estandarizados, de modo que mediante la realización de estas técnicas se pudiese evaluar el nivel de competencia de los participantes. Se preguntaba incluso por cualquier otra técnica que el laboratorio participante emplease de forma habitual. En el caso de *X. fastidiosa*, las respuestas indican que la PCR convencional mayoritariamente utilizada es la de Minsavage *et al.* (1994), mientras que la de tiempo real es la de Harper *et al.* (2010, erratum 2013). En el caso de *X. citri*, la detección se hace preferentemente por PCR en tiempo real, con dos protocolos: Mavrodieva *et al.* (2004) y Robène *et al.* (2020). Y en el caso de las especies de ‘*Ca. Liberibacter*’ asociadas al HLB, se emplea tanto el protocolo de PCR convencional de Jagoueix *et al.* (1996) como el de tiempo real de Li *et al.* (2006). En función de las respuestas se seleccionaron los protocolos más utilizados

o, si no había uno mayoritario, como en el caso de la PCR en tiempo real para *X. citri*, se seleccionó uno de ellos por otros criterios relacionados con la eficacia del protocolo.

A continuación, se preparó el ensayo (Figura 2). En el caso de las bacterias que se pueden cultivar en un medio de laboratorio, *X. fastidiosa* y *X. citri*, se prepararon suspensiones bacterianas a partir de cultivos, y con ellas se cebó material vegetal de cítrico sano en diferentes proporciones (para obtener concentraciones finales desde aproximadamente 10^7 hasta 10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro), y después se hizo extracción de ADN de los extractos cebados. En el caso de las bacterias no cultivables asociadas al HLB se utilizó, como material de partida, ADN extraído de material vegetal infectado, que se mezcló con material vegetal de cítrico sano a diferentes diluciones. Se diseñaron dos modelos de paneles distintos para cada patosistema, compuesto cada uno por 8 muestras y un control positivo de amplificación (PAC) para cada PCR a ensayar. A todos los participantes se les enviaron los iniciadores y las

sondas liofilizadas según las técnicas seleccionadas por cada laboratorio. Se envió también la Taq polimerasa para la PCR convencional, mientras que, para la PCR en tiempo real, cada laboratorio se comprometió a comprar el reactivo necesario (todos el mismo, para que este factor no fuera una variable). Cada participante recibió, asimismo, las instrucciones precisas para la correcta manipulación y procesamiento de las muestras.

El nivel de competencia de los laboratorios participantes en el ensayo, de más de 10 países, revela una muy buena capacidad de detección de CBC, CVC y HLB

En el ensayo participaron un total de 24 laboratorios: cuatro de Argentina, uno de Colombia, tres de Costa Rica, dos de Cuba, uno de El Salvador, seis de España, uno de Guatemala, uno de Honduras, uno de México, uno de Nicaragua, uno de Panamá, uno de Portugal y uno de República Dominicana. Casi todos los laboratorios (93,3%) participaron en la detección de las bacterias asociadas al HLB (Fi-

gura 3A), lo que da idea de la importancia de esta enfermedad. Una gran mayoría (86,6%) también participó en la detección de *X. fastidiosa* y un porcentaje algo menor (73,3%) se sumó a la de *X. citri* (Figura 3A). Casi todos los participantes (71,4-81,8%) emplearon los dos protocolos de PCR propuestos para cada patosistema, uno de PCR convencional y otro de PCR en tiempo real (Figura 3B). Algunos (14,29%) utilizaron solo la PCR en tiempo real (en el caso de *X. citri* ninguno) y algunos (7,69 - 18,18%) solo la PCR convencional.

Los resultados se analizaron siguiendo los criterios establecidos en el protocolo PM 7/122 (2) de la EPPO (*Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories*), contabilizando el número de verdaderos positivos y verdaderos negativos y el de falsos positivos y falsos negativos. Así se estableció, para cada laboratorio, la precisión (concordancia entre el resultado del laboratorio y el valor asignado), la sensibilidad

El ensayo de evaluación de la capacidad técnica contó con la participación de 24 laboratorios de 13 países

(concordancia entre el resultado del laboratorio y el valor asignado, para muestras con valor asignado positivo), la especificidad (concordancia entre el resultado del laboratorio y el valor asignado, para muestras con valor asignado negativo) y la repetibilidad (concordancia de resultados entre dos muestras idénticas analizadas en el mismo laboratorio). En función del

nivel de precisión se establecen tres categorías: muy competente (nivel del 100%), competente (90-99%) y no competente (menor del 90%).

Casi todos los laboratorios obtuvieron resultados del 100% en precisión, sensibilidad, especificidad y repetibilidad, por lo que pudieron ser clasificados como “muy competentes” en la detección de las bacterias de los tres patosistemas ensayados (Figura 4A). Solo dos laboratorios resultaron “no competentes” en la detección de *X. citri*, puesto que obtuvieron valores de precisión inferiores al 90% debido a problemas de especificidad y repetibilidad (Figura 4B). A todos los laboratorios, en general, y a esos dos laboratorios, en particular, se les dieron recomendaciones concretas para disminuir la probabilidad de contaminaciones que repercuten en la precisión de la detección, como: extremar las medidas en la manipulación de las muestras para evitar arrastre de material que pudiera producir resultados falsos positivos; preparar y dispensar el cóctel de PCR en una sala exclusiva para ello, que disponga de material solo de esa sala (pipetas, agua, envases de un solo uso, congeladores...); emplear reactivos alicuotados de uso personal; trabajar con protocolo y plantilla para reducir distracciones; extremar la limpieza de la zona de carga de muestras que, además, debe ser un lugar diferente al del cóctel y con pipetas exclusivas de esa zona; y separar también la sala post-PCR, en la que se debe hacer desinfección con lejía y ultravioleta de manera rutinaria.

Conclusiones

La elección de patosistemas por parte de los diferentes laboratorios refleja que hoy en día el HLB es la enfermedad más preocupante y amenazadora para los cítricos, ya que casi todos seleccionaron la participación en este patosistema, mientras que la participación en CVC y CBC fue algo menor. Es interesante destacar que, en general, el equipamiento de los laboratorios incluye tanto termocicladores de PCR convencional como termocicladores de PCR en tiempo real, ya que la gran

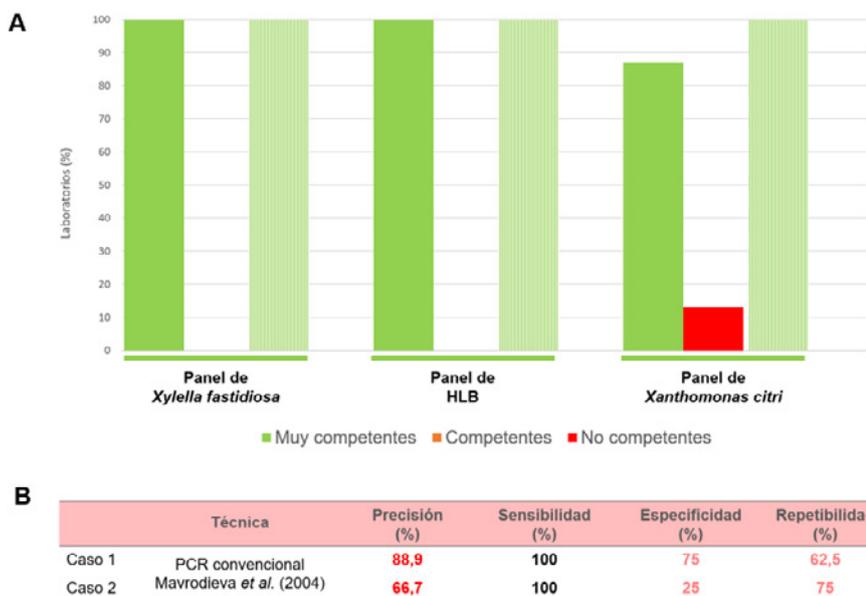


FIGURA 4

Competencia de los laboratorios participantes en el ejercicio colaborativo. Nivel alcanzado en PCR convencional (verde intenso) y PCR en tiempo real (verde claro), para cada patosistema (A). Valores obtenidos por los laboratorios no competentes en la PCR convencional de *Xanthomonas citri* (B).

mayoría de laboratorios participantes seleccionaron los dos protocolos de PCR propuestos (convencional y tiempo real) para el análisis de las muestras. No obstante, algunos laboratorios disponían de equipamiento que no estaba siendo utilizado por desconocimiento de su funcionamiento. A este respecto, nuestro grupo se ofreció para proporcionar capacitación técnica a dichos laboratorios y recibimos en nuestras instalaciones a personal de los mismos durante estancias cortas.

Entre las técnicas empleadas, hubo una preferencia por la PCR en tiempo real frente a la PCR convencional, lo cual es muy alentador, ya que la primera es más sensible que la segunda y eso aumenta la probabilidad de detección. La conclusión más destacada es que todos los laboratorios participantes mostraron un nivel de competencia máximo en el análisis de muestras de cítricos infectadas por especies de 'Ca.

Liberibacter' asociadas a HLB y en las infectadas por *X. fastidiosa*. Solo dos resultaron no competentes en la detección de *X. citri* mediante PCR convencional por problemas de especificidad. Esto pone de manifiesto que es fundamental tener "buenas prácticas" de trabajo para evitar contaminaciones (falsos positivos).

Este ensayo internacional inter-laboratorios, además de demostrar la competencia de los diferentes laboratorios en las técnicas seleccionadas, ha permitido estrechar lazos de colaboración, con intercambio de conocimientos, materiales y procedimientos, y, sobre todo, con estancias de aprendizaje de técnicos y estudiantes.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CYTED y OIRSA (financiadores parciales del trabajo), al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de

España (MAPA), y a la Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana su apoyo para la consecución de los objetivos de este ensayo. Agradecen la colaboración de los demás miembros del Grupo de Diagnóstico de CITRIBAC, en particular de Alberto Martín Gochez, del INTA-Bella Vista (Argentina), y de Laura Garita Salazar, de la Universidad de Costa Rica; y también la ayuda de todo el personal del equipo de Bacteriología del IVIA dirigido por la Dra. EMN. Y agradecen a la Dra. Lochy Batista Le Riverend, del IIFT, y al Dr. Juli Peretó Magraner, del I2SysBio, su disponibilidad y su buen hacer en la coordinación de este ejercicio colaborativo.

Bibliografía

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: redaccion@editorialagricola.com

SERIE RIEGOS Y AGUAS

DISEÑO AGRONÓMICO E HIDRÁULICO DE RIEGOS AGRÍCOLAS A PRESIÓN

Miguel Ángel Monge Redondo

2ª edición

45€

