



ARTÍCULO ORIGINAL

CUBA & CAÑA



URL: <http://www.cuba-cane.inica.azcuba.cu> E-mail: journal.cuba.cane@gmail.com

CU-ID: 2258/v24n2e01

DIAGNÓSTICO DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* (ASHBY) DOWSON MEDIANTE INMUNOIMPRESIÓN DE TEJIDOS DIAGNOSIS OF *XANTHOMONAS ALBILINEANS* (ASHBY) DOWSON BY TISSUE BLOT IMMUNOSORBENT ASSAY

JUANA PÉREZ-PÉREZ *, JAVIER DELGADO-PADRÓN, MARIO CASAS-GONZÁLEZ,
LISSET POZO, DIAGNE CASAÑA-CASTILLO, MARÍA LA O-HECHAVARRÍA

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

*Autor para correspondencia: Juana Pérez-Pérez, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Palabras clave:

escaldadura foliar
caña de azúcar
técnicas inmunoquímicas
rendimiento agrícola

RESUMEN

La escaldadura foliar de la caña de azúcar es una de las enfermedades más importantes del cultivo a nivel mundial, causante de grandes pérdidas tanto en los rendimientos agrícolas como industriales. El análisis visual es el mecanismo empleado durante muchos años para el diagnóstico de la enfermedad en las áreas cañeras. El objetivo del trabajo fue aplicar la técnica inmunológica de impresión de tejidos (TBIA) para el diagnóstico de *X. albilineans*. Como controles positivos se emplearon, hojas de los cultivares susceptibles Co3-551, C90-176 y PR980 y como negativo el cultivar C86-56, confirmados mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con cebadores específicos para *X. albilineans*. Para la TBIA las hojas se presionaron sobre las membranas de nitrocelulosa y dejaron secar a temperatura ambiente. Se probaron diferentes diluciones y combinaciones del juego de diagnosticadores de la firma "agdia", anticuerpo específico anti-*X. albilineans* (*Xalb*) y la anti-rata conjugado con fosfatasa alcalina. Se observó la aparición de puntos violetas sobre los haces vasculares impresos en las membranas de las variedades susceptibles, mientras que el control negativo permaneció incoloro. Los mejores resultados se obtuvieron con el anticuerpo específico anti *Xalb* (rata) diluido 1/1500 y el anti rata conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/3500.

Keywords:

Leaf Scald
Sugarcane Immunochemical Technics
Agricultural Yield

ABSTRACT

Leaf scald is one of the major diseases of sugarcane in the world. It causes severe losses in both agricultural and industrial yields. During years, visual analysis was the mechanisms for disease diagnostic. Achieve of this paper was to apply the tissue impression immunological technique (TBIA) for the diagnosis of *X. albilineans*. Leaves of susceptible cultivars Co3-551, C90-176 y PR980 were positive controls, while C86-56 was the negative, confirmed by PCR (polymerase chain reaction) using specifics primers for Xa. For TBIA the leaves were press over a nitrocellulose membrane and leaf dried at room temperature. Different dilutions and combination of the specifics antiserum anti-mouse-*Xanthomonas albilineans* (*Xalb*) and anti-mouse for *Xalb* conjugated with alkaline phosphatase from "agdia" were used. Dark blue stain color was showed over the nitrocellulose membranes where the vascular bundles were imprinted in susceptible cultivars, while no color was observed in negative control. Best results were observed with the specifics antiserum anti-*Xalb* diluted 1/1500 and the anti-mouse for *Xalb* conjugated with alkaline phosphatase diluted 1/3500.

Recibido: 05 de abril de 2021

Aceptado: 13 de noviembre de 2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License CCBY-NC (4.0) internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

INTRODUCCIÓN

Entre las principales enfermedades que afectan a la caña de azúcar está la escaldadura foliar, causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. La bacteria coloniza los haces fibrovasculares de hojas y tallos, se moviliza sistémicamente dentro de los tejidos de la planta (Ntambo *et al.*, 2019; Pieretti *et al.*, 2015) afecta la calidad del jugo y causa pérdidas económicas significativas en cultivos altamente susceptibles (López *et al.*, 2016).

En Cuba se informó la presencia de la enfermedad entre 1978-1982 resurgiendo a inicios de 1998 con afectaciones a varias provincias (Peralta *et al.*, 1997). El Servicio Fitosanitario, basado sólo en el diagnóstico visual, ha sido el mecanismo empleado desde 2003 para la vigilancia de la enfermedad en áreas de cultivo de caña de azúcar (Jorge *et al.*, 2011).

Aunque el patógeno fue inicialmente identificado por su sintomatología, ésta se puede enmascarar con otras afectaciones, por lo que el aislamiento de la bacteria en medios de cultivo, pruebas fisiológicas de su crecimiento, características microscópicas, técnica serológica de UMELISA (Sistema Ultra micro analítico) y PCR son los métodos más comúnmente empleados internacionalmente (Alvez *et al.*, 2016; García *et al.*, 2015). Debido a la alta dispersión por todo el país y las pérdidas potenciales debidas a la enfermedad, un método de diagnóstico preciso, sensible y económico es necesario para identificar la bacteria. Por lo que el objetivo del trabajo fue aplicar la técnica técnica inmunológica de impresión de tejidos (TBIA), para el diagnóstico de *X. albilineans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon hojas de las variedades susceptibles Co3-551, C90-176 y PR980 (controles positivos) y C86-56 (control negativo), procedentes de áreas experimentales de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Mayabeque-Artemisa. Se conservaron muestras de hojas a -20°C para ser utilizadas en la PCR, con el objetivo de verificar la calidad de las muestras utilizadas.

El ADN total se extrajo con el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Se amplificó un fragmento de ADN de 288 pares de bases (pb), específico de *X. albilineans* con los cebadores PGBL1/PGBL2 propuestos por Pan *et al.* (1999). La reacción se realizó en un termociclador (PTC100, MJ Research, USA), con el siguiente programa de reacción: desnaturalización un minuto a 94°C, 40 ciclos 30s a 94°C, 30s de alineamiento a 65°C, 1 minuto de extensión a 72°C y extensión final cinco minutos a 72°C. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción con agua destilada estéril y como positivo se utilizó ADN del patógeno. Los productos amplificados se visualizaron

mediante electroforesis en geles de agarosa 1% teñido con GelRedTM 0.001 % (Biotium, EE. UU.).

Para la realización de la TBIA, se separó el raquis de la lámina de la hoja. Con un bisturí estéril se realizó un corte transversal y se ejerció una presión uniforme durante 10 segundos en ángulo recto sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Protran BA85 Nitrocellulose 10401265 Whatman Schleider & Schuell), según metodología de (Funes *et al.*, 2009). Cada muestra se procesó por triplicado. Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y se conservaron en refrigeración (4 °C) hasta su posterior revelado.

Según la metodología de (Ponte *et al.*, 2010), las membranas se colocaron en una cajueta y se sumergieron en una solución tampón salina con tween 20 (TBS-T) y leche en polvo descremada al 5% y se incubaron durante 45 min, a 37 grados Celsius, para bloquear los sitios libres de las bacterias. Posteriormente se lavaron tres veces durante tres minutos con solución TBS-T. Estas manipulaciones se realizaron con la ayuda de una pinza plana.

Se utilizó el juego de diagnosticadores de la firma “ag-dia”, anticuerpo específico anti- *X. albilineans* (Xalb) y el anti-rata específico para Xalb conjugado con fosfatasa alcalina (BRA 71100/0500). Se probaron diferentes diluciones (1/1000, 1/1500 y 1/3000) del anticuerpo específico anti-Xalb diluido en TBS-T con leche en polvo descremada a 1%, las membranas se incubaron durante 12h a 4°C y posteriormente se lavaron siguiendo el procedimiento antes descrito.

Para cada combinación del anticuerpo primario se utilizaron también diferentes diluciones en TBS-T (1/1000 y 1/3500) con leche descremada al 1% del anticuerpo específico anti-mouse conjugado con fosfatasa alcalina, las membranas se incubaron 2h a temperatura ambiente y después se lavaron en agitación tres veces por tres minutos con TBS-T.

El revelado de las membranas se realizó en agitación, añadiendo 10 mL de solución tampón buffer sustrato con 33 µL de BCIP (5-bromo-4 cloro 3-indol fosfato) y 66 µL de (azul de nitro-tetrazolio) NBT preparados al momento de utilizarse, hasta observar la aparición de coloración púrpura en los controles positivos. La reacción se detuvo añadiendo solución TBS-T, las membranas se lavaron dos veces en esta solución y se dejaron secar al aire. Los resultados se observaron en un Microscopio estereoscópico, empleando el ocular de 10 µm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron bandas de amplificación de ADN que se corresponden con las tallas esperadas para los controles positivos Co3-551 y C90-176 en tanto que fueron ausentes en los controles negativos C86-56 (Figura 1), lo cual demuestra la calidad de las muestras para el desarrollo de la técnica inmunológica.

La prueba TBIA se consideró válida, ya que se observó la aparición de puntos violetas sobre los haces vasculares impresos en las membranas de los cultivos susceptibles Co3-551, C90-176 y PR980, mientras que el control negativo cultivar C86-56 permaneció incoloro (Figura 2), lo que se corresponde con los resultados de la PCR. Las mejores condiciones para el desarrollo de la reacción positiva en las membranas de nitrocelulosa fueron con el anticuerpo específico anti *Xalb* (mouse) diluido 1/1500 y el anticuerpo específico IgG anti mouse conjugado con fosfatasa alcalina 1/3500.

García *et al.* (2015), con el empleo del anticuerpo antiXa LgG policlonal (Montpellier, Francia; CIRAD Bios/UMR Bgpi) para *X. albilineans*, a una concentración de 1:5000 y el anticuerpo anticabra IgG anticonejo (SIGMA-ALDRICH®, USA) conjugado con fosfatasa alcalina en concentración de 1:10000, aplicaron de forma satisfactoria la técnica serológica de inmunopresión de membranas para determinar la presencia de *X. albilineans* en los principales clones comerciales, y conocer la dispersión de la enfermedad en la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco, México, en la que no se tenían registros de afectaciones por la misma.

La comparación de las técnicas serológicas DAC-ELISA y TBIA, Zia *et al.* (2013) demostraron la utilidad de esta última en la detección de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, agente causal de la raya roja en caña de azúcar. Entre las diferentes pruebas inmunológicas disponibles en Pakistán, fue la más útil para la detección de infecciones latentes en las plantas y puede ser muy valiosa para los análisis a gran escala por su bajo costo, ahorro de tiempo, sensibilidad, especificidad y resultados confiables. Según los autores esta prueba puede ser utilizada en los países en vías de desarrollo, en los cuales no están disponibles laboratorios de alta tecnología para el diagnóstico de patógenos y los costos por muestra es un factor limitante para cualquier ensayo a ser adoptado para pruebas masivas.



Figura 1. Fragmentos amplificados por PCR específicos a *X. albilineans*. Líneas 1: Co3-551, 2: C90-176, 3-5: PR980, 6: C86-56 7: control negativo, mezcla de reacción sin ADN, 8: Control positivo de la reacción, ADN de la cepa Xa-74 de la colección de cultivos microbianos del INICA, 9: Patrón de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega).

La implementación del diagnóstico inmunoquímico TBIA como herramienta para el servicio fitosanitario puede ser de gran utilidad sobre todo en áreas de semilla, donde la ausencia de síntomas puede enmascarar la presencia de la bacteria *X. albilineans*.

CONCLUSIONES

Se comprobó la posibilidad de utilización en Cuba de la técnica serológica inmuno impresión directa de tejidos para el diagnóstico de la bacteria *X. albilineans* en caña de azúcar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvez, B., Alonso, G., & Oropeza, M. (2016). Genotipificación y perfil bioquímico de aislados de xanthomonas albilineans en Venezuela. *Interciencia*, 41(11), 732-739, ISSN: 0378-1844.
- Funes, C., Acosta, E., & Ramallo, C. (2009). *Principales enfermedades en caña de azúcar* [Manual del Cañero, Las Talitas, Tucumán, Argentina, pp. 125-127].
- García, J. H. S., Ortiz, G. C. F., Salgado, G. S., Valdez, B. A., Silva, R. H. V., & Ovalle, S. W. R. (2015). Presencia de Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson en caña de azúcar en La Chontalpa, Tabasco, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 38(4), 397-404. DOI: <https://dx.doi.org/10.35196/rfm.2015.4.397>, ISSN: 0187-7380.
- Jorge, H., Jorge, I. M., Mesa, J., & Bernal, N. (2011). *Normas y Procedimientos del Programa de Fitomejoramiento de la Caña de Azúcar en Cuba* [Ediciones PUBLINICA, La Habana, Cuba, pp. 308-346].
- López, V. J. J., Valdez, B. A., Silva, R. H. V., Flores, R. C., & Rangel, O. C. A. (2016). Evaluación a la escaldadura (Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson) de la hoja de variedades de caña de azúcar (Saccharum spp.). *Agroproductividad*, 9(3), 48-54.



Figura 2. Visualización de los resultados de la inmuno impresión directa de tejidos (TBIA) en las membranas de nitrocelulosa. De izquierda a derecha: C86-56 (control negativo, ausencia de puntos violetas sobre los haces vasculares), Co3-551, C90-176 y PR980 (controles positivos) presencia de puntos violetas.

- Ntambo, M. S., Meng, J. Y., Rott, P. C., Royer, M., Lin, L. H., Zhang, H. L., & Gao, S. J. (2019). Identification and characterization of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in China using multilocus sequence analysis. *Plant Pathology*, 68(2), 269-277, ISSN: 0032-0862.
- Pan, Y. B., Grisham, M. P., Burner, D. M., Legendre, B. L., & Wei, Q. (1999). Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant disease*, 83(3), 218-222, ISSN: 0191-2917.
- Peralta, E., Martínez, B., Martín, D., & Jones, P. (1997). *Quality control for the production of pathogen-free plantlets in Cuban sugarcane biofactories*. ISSCT Pathology and Molecular Biology Workshop, South Africa.
- Pieretti, I., Pesic, A., Petras, D., Royer, M., Süßmuth, R. D., & Cociancich, S. (2015). What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads? *Frontiers in plant science*, 6, 289. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00289>, ISSN: 1664-462X.
- Ponte, E., Silveira, S., Barros, J., & Moreira, R. (2010). Incidencia de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* en áreas de producción de caña de azúcar en Espírito Santo, sur de Bahia y oeste de Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, 36(4), 313-321.
- Zia, U. H. S., Rauf, C. A., Haque, M. I., Afghan, S., Fauconnier, T., Andrade, F. H., Shah, M. K. N., & Shahazad, A. (2013). Comparison of DAC-ELISA and Tissue Blot Immunoassay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*, causal agent of red stripe of sugarcane. *J. Plant Pathol. Microb*, 4, 172-175, DOI: <https://dx.doi.org/10.4172/21577471.1000172>.

Juana Pérez-Pérez, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Javier Delgado-Padrón, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Mario Casas-González, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Lisset Pozo, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Diagne Casaña-Castillo, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

María La O-Hechavarría, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.