

Evolución de la Investigación y de las nuevas tecnologías en Patología Vegetal

Vicente Pallás (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas. (CSIC-UPV), Universidad Politécnica de Valencia, CPI Ed 8E, Valencia. vpallas@ibmcp.upv.es)

La disciplina de la Fitopatología nació de la necesidad. De la necesidad de tratar de poner remedio a las plagas y pestes que durante el siglo XIX provocaron una considerable merma en la producción o en la calidad de los alimentos. La incursión de eminentes científicos como A. de Bary o M Beijerinck, junto con las decisivas contribuciones de Pasteur y Koch, permitió dilucidar la naturaleza microbiana de las enfermedades de las plantas eliminando de manera definitiva el maligno poso de la teoría de la generación espontánea que todavía estaba latente a mediados de dicha centuria. Esta primera fase de la Fitopatología descriptiva utiliza unas tecnologías muy rudimentarias pero consigue realizar un enorme trabajo taxonómico desde el punto de vista de los patógenos y más observacional desde el punto de vista de los hospedadores. En las décadas de los 40-50, la creencia generalizada sobre las grandes similitudes entre la naturaleza de los virus con la de los genes provocó un inusitado interés por parte de los físicos y los genéticos al estudio de estos patógenos con la consiguiente incorporación de las tecnologías propias de éstos al campo de la Fitopatología, como fueron la ultracentrifugación diferencial, el análisis por difracción por rayos X, la electroforesis etc.. Este nuevo escenario permitió la incorporación de la Fisiología y Bioquímica entre los patólogos de plantas y que los estudios sobre las interacciones planta patógeno cobraran un especial interés culminando con la emergencia del concepto de gen-a-gen en los fenómenos de susceptibilidad/resistencia en los diferentes patosistemas, sin duda una de las principales contribuciones de la Patología Vegetal al avance del conocimiento científico.

Con el advenimiento de la era de la Biología Molecular no solo han cambiado las herramientas fitopatológicas sino la manera en que abordamos la investigación en esta disciplina. Ya desde finales del siglo pasado podría argumentarse que es más fácil clonar molecularmente un nuevo virus que purificar un gramo de éste a partir de tejido infectado. Y muy probablemente en muy pocos años no sólo será más fácil sino incluso más barato determinar la secuencia completa de un patógeno que realizar un ensayo ELISA. La patología en general, y en algunos casos la Fitopatología en particular, han proporcionado los sistemas modelo idóneos para la determinación de las primeras secuencias completas de determinados organismos/patógenos. Así, el primer genoma de ADN secuenciado fue el de un virus (ØX174, 1975), el del primer genoma de ARN el de un viroide (PSTVd, 1978), el del primer organismo vivo el de una bacteria (*H. influenzae*, 1995), el primer genoma eucariota, un hongo (*S. cerevisiae*, 1996) y el del primer eucariota multicelular un nematodo (*C. elegans*, 1997).

Las tecnologías pues han condicionado y lo van a seguir haciendo más en el futuro la forma y manera en que nos planteamos resolver los problemas fitopatológicos. Durante estos últimos 30 años de existencia de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) que ahora celebramos han sido muchas las mejoras tecnológicas que la Fitopatología ha incorporado o ha ayudado a desarrollar y que en ambos casos han condicionado la manera de afrontar

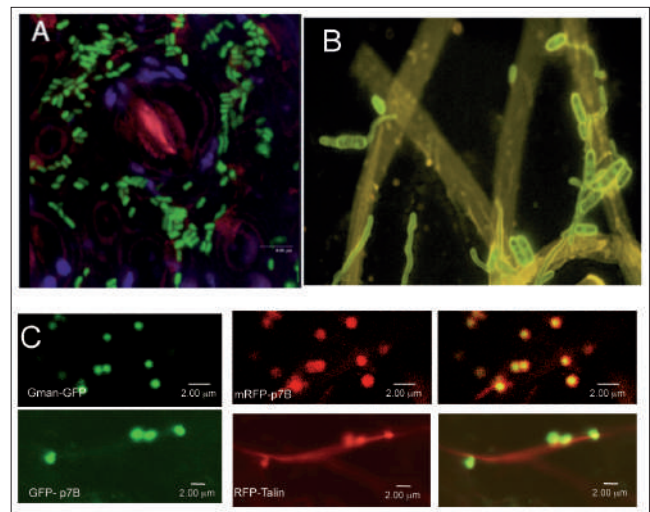


Figura 1. Ejemplos de aplicación de la proteína verde fluorescente a la Fitopatología. (A) *Xanthomonas axonopodis* sobre hojas de Swingle cítrunelo (reproducido de CUBERO, 2008, con permiso); (B) seguimiento del proceso de infección de *Fusarium oxysporum* f- sp. *Lycopersici* en plantas de tomate mediante expresión constitutiva de la GFP (reproducido de CALERO y col., 2008, con permiso); (C) colocalización de la proteína de movimiento 7B del virus del cribado del melón (MNSV) con el aparato de Golgi (3 imágenes superiores) y filamentos de actina (3 imágenes inferiores) (reproducido de GENOVES y col. 2010, con permiso). Las dos imágenes de la izquierda en (C) corresponden a la fusión de la 7B con la GFP y las dos centrales a marcadores de Golgi y actina, respectivamente, mientras las de la derecha constituyen las correspondientes superposiciones.

los problemas fitopatológicos. Entre ellas me gustaría destacar tres: i) el descubrimiento de la 'reacción en cadena de polimerasa' (PCR) y su influencia en el campo del fitodiagnóstico, ii) el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP) y su aplicación al estudio de la biología celular de la interacción planta-patógeno y iii) la incorporación de las tecnologías 'ómicas' en la Fitopatología en general.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La Fitopatología diagnóstica debe agradecer infinitamente el día en que Kary Mullis estacionó su coche en la milla 46,7 de la autovía 128 en su itinerario semanal desde Berkeley a Mendocino que, según él cuenta (MULLIS, 1993), fue el momento y lugar de inspiración que posibilitaron la invención de los fundamentos de la PCR. Esta metodología ha revolucionado el campo del Fitodiagnóstico y de la investigación en cualquier disciplina de la ciencia. Ha permitido

la incorporación de las aproximaciones moleculares al diagnóstico de patógenos como una alternativa rutinaria a los métodos serológicos prevalentes durante muchos años (LÓPEZ y col., 2003; MUMFORD y col., 2006). La sensibilidad en los métodos de diagnóstico ha dejado de ser un objetivo habitual y los retos en este campo de estudio se han desplazado a la consecución de formatos multidiana (PALLÁS y col., 2009). Un análisis superficial en el ISI Web of knowledge pone de manifiesto que en la última década se han publicado más de 20.000 artículos en el campo de la Fitopatología que hayan utilizado la PCR como método de estudio frente a los menos de 7.000 de la década anterior.

La GFP y la Fitopatología. Después de que, tras procesar cientos de miles de medusas en la bahía de Friday Harbor, Osamu Shimomura determinara la naturaleza proteica de la fluorescencia de la medusa *Aequorea aequorea* en 1961 tuvieron que pasar más de 30 años para que a este descubrimiento se le encontrara una utilidad conceptual. Afortunadamente, a diferencia de la mayor parte de los casos previamente estudiados, el cromóforo en este caso era la propia proteína y no se necesitaba la presencia de un cofactor para la emisión de la fluorescencia lo que permitió que su clonación (PRASHER y col., 1992) y su posterior expresión en organismos vivos (CHALFIE y col., 1994) emitiera la correspondiente fluorescencia. Esta observación ha permitido la detección de marcadores proteicos *in vivo* en un entorno celular natural y sin apenas manipulación del tejido lo que ha desplazado a los métodos enzimáticos habituales más destructivos. La incorporación de la GFP en la Fitopatología ha revolucionado sin duda los estudios de las interacciones planta-patógeno y ha contribuido de manera decisiva al progreso del conocimiento del proceso infectivo en bacterias (CALERO y col., 2008), hongos (CUBERO, 2008), virus (SÁNCHEZ-NAVARRO y PALLÁS, 2008) y nemátodos (BARCALA y col., 2008) (Figura 1).

Las 'ómicas' y la Fitopatología. La identificación y caracterización de los factores genéticos implicados en las interacciones moleculares entre las plantas y sus patógenos ha experimentado una enorme revolución conceptual desde la reciente incorporación de las tecnologías ómicas en Fitopatología. El análisis masivo de la expresión diferencial de los genes (Genómica) (Figura 2), de las proteínas (Proteómica) y más recientemente de los metabolitos (Metabolómica) ha permitido abordar desde una nueva perspectiva la Fitopatología (ver revisiones de GONZÁLEZ-CANDELAS y col., 2008; ESCOBAR y FENOLL, 2008; RODRÍGUEZ-PALENZUELA y LÓPEZ-SOLANILLA, 2008; MALDONADO y col., 2008). La incorporación de estas técnicas no sólo constituye un salto cuantitativo en el estudio de las respuestas de las plantas frente a los patógenos sino que nos permitirá un análisis comparativo de los elementos comunes de respuesta de diferentes patosistemas para elaborar estrategias generalistas inespecíficas para el control de las enfermedades.

Perspectivas Futuras

La Ciencia y la Tecnología sin duda se retroalimentan. La incorporación de nuevas tecnologías, como el reciente refinamiento de la secuenciación masiva (STUDHOLME y col., 2011), facilita en gran medida el progreso del conocimiento en la Fitopatología pero también la generación de las nuevas ideas y del conocimiento repercuten enormemente en el progreso de las tecnologías. En una de las últimas entrevistas que concedió el premio Nobel de Fisiología y Medicina A. Kornberg definía a los científicos de los primeros veinte años del siglo XX como cazadores

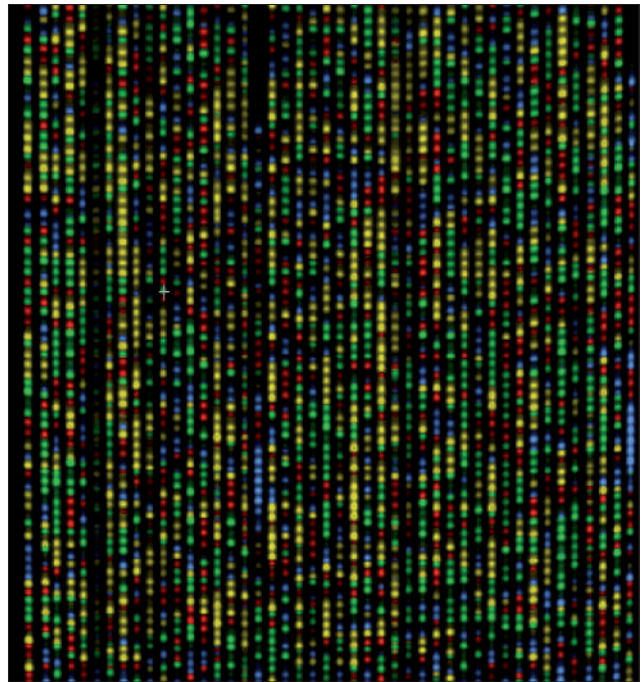


Figura 2. Imagen obtenida de una hibridación de micromatriz. Los puntos rojos implican generalmente una sobreexpresión del gen correspondiente, los verdes una represión y los amarillos ausencia de diferencia significativa en los niveles de expresión.

de microbios, a los del periodo entre 1920-1940, como cazadores de vitaminas, a los de 1940-1970, cazadores de enzimas y a los del periodo 1970-2000 como cazadores de genes. Es muy probable que si todavía viviera definiría a los de la primera década del siglo XXI como cazadores de genomas (más de 430 genomas completamente secuenciados en la actualidad) o más recientemente de metagenomas. La Metagenómica ha sido la última incorporación tecnológica de relevancia que ha entrado de lleno en la Fitopatología. La identificación de fitopatógenos no cultivables ha sido una de las principales contribuciones de esta metodología a la Fitopatología dado que estos patógenos han sido por razones obvias los más recalcitrantes a su caracterización. Un ejemplo reciente de especial relevancia ha sido la identificación del agente causal de la devastadora enfermedad Huanglongbing (HLB, de las palabras 'huáng lóng bing, literalmente la enfermedad del dragón amarillo, en chino) de los cítricos. Esta enfermedad está causada por 3 especies no cultivables del género '*Candidatus Liberibacter*' y transmitida por insectos vectores que se alimentan del floema como *Diaphorina citri*. Dos grupos independientes han secuenciado el metagenoma del floema y del insecto y han podido completar la secuencia completa del patógeno 'Ca. L. asiaticus' el cual está filogenéticamente relacionado a *Agrobacterium* y a la alfa-proteobacteria *Rhizobium* (DUAN y col., 2009; TYLER y col., 2009). Aproximaciones similares ya han permitido no sólo conocer el viroma de un determinado cultivo sino la identificaron de nuevos virus (STUDHOLME y col., 2011) y sin duda será una herramienta imprescindible en el microbioma no sólo Fitopatológico sino el Ecológico, una nueva disciplina en la que deben entrar de lleno los nuevos Fitopatólogos.

Agradecimientos: El trabajo en el laboratorio de V.P. ha sido financiado por el proyecto BIO08-0538 del MICINN y por el proyecto del programa Prometeo 2011/003 de la Generalitat Valenciana.

BIBLIOGRAFÍA

- BARCALA, M., GARCÍA, A., FENOLL, C. y ESCOBAR, C.** (2008). *Interacciones planta-nemátodo. Análisis de promotores mediante el uso de genes delatores*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 293-316. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- CALERO, F.J., CÓRDOBA, D., RONCERO, M.G., HERA, C. y DI PRIETO, A.** (2008). *Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) para el estudio de los hongos fitopatógenos*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 285-292. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- CUBERO, J.** (2008). *Utilización de la proteína verde fluorescente (GFP) para estudios de supervivencia y expresión génica en bacterias de plantas*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 269-284. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W. y PRASHER, D.C.** (1994). *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263, 802-805.
- DUAN, Y., ZHOU, L., HALL, D.G., LI, W., y col.** (2009). *Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics*. Mol. Plant Microb. Interact. 22, 1011-1020.
- ESCOBAR, C. y FENOLL, C.** (2008). *Cambios en la expresión génica como resultado de la interacción planta-nemátodo: métodos de estudio*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 41-58. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- GENOVÉS, A., NAVARRO, J.A. y PALLÁS, V.** (2010). *The Intra- and Intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway* Mol. Plant Microb. Interact. 23, 263-272.
- GONZÁLEZ-CANDELAS, L., SÁNCHEZ-TORRES, P. y MARCOS, J.F.** (2008). *Aislamiento e identificación de genes de fitopatógenos que se expresan diferencialmente durante la interacción con la planta*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 21-40. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- LÓPEZ, M.M., BERTOLINI, E., OLMOS, A., CARUSO, P., GORRIS, M.T., LLOP, P., PENYALVER, R. y CAMBRA, M.** (2003). *Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria*. Int. Microbiol. 6: 233-243.
- MALDONADO, A.M., y JORRÍN, J.V.** (2008). *Proteómica Vegetal: aplicación al estudio de la interacción planta-patógeno y planta-parásita*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 93-108. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- MULLIS, K.B.** (1993). *The polymerase chain reaction*. The Nobel Lecture. Nobelprized.org.
- MUMFORD, R., BOONHAM, N., TOMLINSON, J. y BARKER, I.** (2006). *Advances in molecular phytopathology - new solutions for old problems*. Eur. J. Plant Pathol. 116, 1-19.
- PALLAS, V., J. SÁNCHEZ-NAVARRO, A. VARGA, F. APARICIO y D. JAMES** (2009). *Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Plant Viruses*. Methods in Molecular Biology, 1, Volume 508, Plant Pathology, Pages 1-16. DOI: 10.1007/978-1-59745-062-1_16.
- PRASHER, D.C., ECKENRODE, V.K., WARD, W.W., PRENDERGAST, F.G. y CORMIER, M.J.** (1992). *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene 11, 229-233.
- RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. y LÓPEZ-SOLANILLA, E.** (2008). *Transcriptómica*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 59-74. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- SÁNCHEZ-NAVARRO y PALLAS, V.** (2008). *Utilización de la proteína de fluorescencia verde (GFP) en la Virología de plantas*. En: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología (Pallas, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. y Marcos, JF, Eds). Ed. Mundi-Prensa-SEF. Madrid, Barcelona, Mexico. pp 255-268. ISBN: 978-84.8476-319-2.
- STUDHOLEM, D.J., GLOVER, R.H. y BOONHAM, N.** (2011). *Application of High-throughput DNA sequencing in Phytopathology*. Annu. Rev. Phytopathol. 49, 87-105.
- TYLER, H.L., ROESCH, L.F., GOWDA, S., DAWSON, W.O. y TRIPLETT, E.W.** (2009). *Confirmation of the sequence of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and assessment of microbial diversity in Huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomics approach*. Mol. Plant Microb. Interact. 22, 1624-1634.