
METODO ANALITICO PARA DIAGNOSTICO FITOSANITARIO

Pear Decline

Contenido

[Nombres Comunes](#)

[Hospederos principales y secundarios](#)

[Introducción](#)

[Inspección directa](#)

[Técnicas Analíticas](#)

[Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico](#)

[Referencias](#)

[Anexos](#)

Nombres comunes (4, 6, 15, 18):

Decaimiento del peral

Pear decline

Pear leaf curl

Hospederos principales y secundarios (4, 6, 18):

Pyrus sp. Peral

Cydonia oblonga Membrillero

Pyrus ussuriensis

Introducción:

Pear Decline es una enfermedad cuarentenaria, considerada como A1 en los listados del COSAVE. Se encuentra distribuida en la Región Mediterránea Europea, Costa Pacífica de América del Norte y en huertos comerciales de California.(1, 4, 6, 15, 18).

Esta enfermedad produce en el peral un debilitamiento lento y progresivo ó un marchitamiento repentino y rápido, llegando finalmente en ambos casos a la muerte de los árboles. Afecta a todas las variedades de peral cuando son injertadas en ciertos patrones orientales, tales como *Pyrus pyrifolia* y *P. ussuriensis*. Se ha observado que también puede llegar a afectar variedades de peral injertadas en *P. communis*, *P. betulaefolia* y membrillero (1).

Puede transmitirse por injerto, aunque sólo una tercera parte de las yemas la transmiten. Además, es transmitida en forma natural por el psílido del peral, *Cacopsylla (Psylla) pyricola* Foster (presente en todos los países de la región a excepción de Chile (5)), el cual adquiere el Fitoplasma en pocas horas y persiste en el vector por más de tres semanas (1, 4).

Inspección directa:

El daño tiene lugar en toda la planta, sin embargo, en árboles sobre patrones sensibles, es particularmente evidente por debajo del injerto. En el punto de unión del injerto puede observarse una línea parda, síntoma poco frecuente sobre patrones de *P. communis* o membrillero. Cuando hay un bloqueo grave del transporte floemático las raíces se deterioran por falta de nutrientes y las primeras afectadas son las raíces absorbentes (15, 18).

A nivel de campo, los síntomas más evidentes son un decaimiento rápido, un decaimiento lento o un rizado de hojas. El decaimiento rápido se caracteriza por una marchitez súbita de los árboles, que mueren en unos pocos días o semanas. El decaimiento lento se caracteriza por un debilitamiento progresivo de los árboles cuya gravedad puede fluctuar, el crecimiento terminal es reducido o nulo, hay pocas hojas, éstas son pequeñas, coriáceas, verde pálido, y con márgenes que se enrollan ligeramente hacia el arriba, en el otoño las hojas se enrojecen y caen prematuramente, a menudo también se reduce el cuajado y el tamaño del fruto. Los síntomas de rizado de las hojas tienen varias características comunes con los del decaimiento lento, las diferencias principales son que se manifiestan sobre los patrones más tolerantes, el decaimiento es menos pronunciado y las hojas se curvan hacia el envés a lo largo del eje principal (15, 18).

Características taxonómicas:

El agente causal del Pear Decline es un Fitoplasma, no crece in vitro, su soma es de una partícula de forma predominantemente filamentosa, tiene una unidad de membrana trilaminar carente de una pared celular rígida. Se encuentra generalmente ligada formando cuerpos ramificados (11, 15).

Técnicas Analíticas:

1-. Indexación (3, 15, 16, 18):

Algunos cultivares de *Pyrus communis* y otros de *Pyrus silvestres* desarrollan síntomas característicos en las hojas. Entre tales cultivares de *P. communis*, el cv. *Precocius* es un indicador apropiado para realizar el test de transmisión. En primer lugar se produce un leve amarillamiento de la vena media de las hojas, la cual se ensancha, cubriendo posteriormente el resto de las venas. Finalmente se observa un tejido corchoso blanquecino que después se torna marrón. Simultáneamente al desarrollo de síntomas en las venas, las hojas se vuelven coriáceas y quebradizas.

Para el test de transmisión es necesario tener en cuenta que los árboles enfermos tienen fluctuaciones estacionales dado que los Fitoplasmas se eliminan en alto porcentaje de la parte aérea durante el invierno debido a la degeneración de los tubos cribosos. Posteriormente la parte aérea vuelve a colonizarse a partir de las raíces, donde el organismo permanece todo el año. Por lo tanto, se pueden utilizar como injerto, raíces o partes aéreas vegetativas, siendo más efectivo el injerto de raíces. Las plantas deben tener en invernadero una temperatura entre 25 y 30 C, manteniéndose estas condiciones hasta el fin de la estación de crecimiento del año posterior al injerto.

Otros indicadores de transmisión por injerto pueden ser *Pyronia veitchii* o la variedad de peral Williams injertado sobre *Pyrus ussuriensis*.

2-. Observación microscópica (17):

- cortes de 1 mm de largo de secciones radiales de franjas de corteza a nivel de la unión del injerto de árboles enfermos son fijados en glutaraldehído al 3 %, preparado en buffer fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2.
- se lava tres veces consecutivas con el mismo buffer.
- fijar con tetróxido de osmio (OsO₄) al 1 % en el mismo buffer.
- deshidratar en serie en alcohol etílico y óxido de propileno.
- infiltrar y colocar en resina Epon (Lx-112).
- realizar cortes de 0,5 a 1,0 um con ultramicrotomo.
- transferir los cortes a gotas de agar agua 0,025 %, de manera que quede adherido al portaobjeto.
- secar y almacenar a 40 C.
- teñir con tionina y acridina orange.
- observar al microscopio bajo luz normal y contraste de fase un crecimiento excesivo del floema, asociado

con la formación de pequeños elementos de tubos cribosos angostos (que sustituyen al floema) en lugar de elementos cribosos normales, con una marcada necrosis de éstos (15, 18).

3-. Observación por microscopía de campo oscuro (11):

En primer lugar se multiplica el Fitoplasma en plantas de *Catharanthus (Vinca) roseus* L. inoculadas por injertación, e incubadas en una cámara de crecimiento a 27 C (noche) y 30 C (día) con fotoperíodos de luz de 14 hrs a 104 lux. Los tejidos son colectados desde ramas que muestren un prematuro síntoma de daño, aproximadamente a los 20 a 30 días. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- las hojas nuevas, plenamente expandidas, se cortan separando la vena principal y el pecíolo.
- esterilizar con hipoclorito de sodio 1 % por 5 min.
- lavar dos veces con agua destilada estéril.
- la vena media se corta en segmentos de 1 cm de largo.
- cada segmento se corta longitudinal en secciones delgadas, aprox. 100 µm grosor.
- las secciones se llevan inmediatamente a placas de Petri conteniendo enzimas maceradoras en solución. Esta solución consiste en 0,8 % celulasa (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Nishinomiya, Japón); 0,2 % macerozyme (Yakult Pharmaceutical Industry Co.); 1 mM CaCl₂ y manitol 0,6 M. Esta solución tiene que estar fresca, el pH debe ser 5,5 y se esteriliza por filtración (poros de 0,2 µm).
- incubar en la solución enzimática por 60 a 90 min a una temperatura de 22 a 25°C.
- separar los haces vasculares desde la masa del macerado parenquimatoso celular con pinzas finas y transferirlos a una nueva solución enzimática por 30 a 60 min.
- después de la digestión, el tejido floemático, consistente en capas de elementos cribosos, se remueve cuidadosamente desde el tejido xilemático con pinzas estériles de punta fina.
- transferir el tejido floemático a una solución tampón consistente en HEPES 0,05 M (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid), CaCl₂ 1,0 mM y manitol 0,5 M, pH 7,2.
- incubar por 60 min. y observar por microscopía de campo oscuro o almacenar a 4°C para examinar posteriormente.

4-. Microscopía electrónica:

La técnica utilizada por Haggis y Sinha (9) se describe a continuación :

- cortes de pecíolos y raíces de 3 a 5 mm de largo son fijados en glutaraldehído al 6 %, preparado en buffer fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 2 a 3 horas.
- lavar 3 veces en el mismo buffer.
- fijar en tetróxido de Osmio (OsO₄) al 2 % preparado en el mismo buffer.
- teñir con solución acuosa de acetato de uranilo al 2 % por 2 hrs a 37°C.
- deshidratar con etanol con diluciones sucesivas que van desde 10 % hasta llegar a alcohol absoluto.
- llevar las muestras a diluciones continuas de óxido de propileno resina de Spurr's.
- colocar en medio Spurr's.
- cortar secciones con ultramicrotomo.
- teñir 12 min con citrato de plomo y observar al microscopio electrónico.

5-. Microscopía de Fluorescencia:

Esta técnica utiliza compuestos fluorescentes denominados fluorocromos, marcadores enzimáticos, los cuales al ser sometidos a una fuente luminosa, absorben una longitud de onda mayor. A continuación se describe la técnica utilizada con el fluorocromo benzimidazol (Hoechst 33258) (17).

- se cortan trozos de la nervadura central de la hoja o raíz de 5 mm de largo.
- fijar en glutaraldehído al 3 %, preparado en buffer fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 2 a 3 hrs.
- lavar tres veces en el mismo buffer.

- parte del material cortarlo por microtomía al punto de congelación en secciones de 40 μ m de espesor, y el resto procesarlo por deshidratación, colocar en parafina y cortar en secciones de 8 μ m de grosor con un micrótopo rotatorio.
- preparar una solución madre de fluorocromo benzimidazol derivativo (Hoechst 33258) 50 mg/l agua destilada.
- al momento de utilizar la solución diluirla en buffer fosfato de cacodilato hasta obtener una concentración final del reactivo de 1,0 mg/l.
- teñir los cortes por 15 a 20 min a temperatura ambiente.
- lavar 2 veces, por 2 a 3 min, con buffer 0,1 M y montar en glicerina diluida en una cantidad igual de buffer.
- las preparaciones son hechas semi-permanentes por aplicación de esmalte incoloro en los márgenes del cubreobjeto.
- para estudios comparativos, es necesario preparar secciones de cortes no teñidos.
- observar con luz U.V. y azul, por luz de transmisión y epifluorescente.
- los Fitoplasmas aparecen al microscopio como pequeñas partículas fluorescentes en los tubos cribosos, ya sea en forma aislada o en racimos.
- de acuerdo a Davies, Adams, Glenister (7) y Seemüller (15) esta técnica también puede ser empleada utilizando como marcador enzimático el fluorocromo 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

6-. Detección utilizando PCR (2, 8, 10, 12, 13, 14):

La aplicación de PCR al estudio de Fitoplasmas ha permitido su detección y diferenciación en diversos sistemas vegetales. Se han obtenido gran cantidad de iniciadores para PCR en el análisis de este tipo de microorganismos. El par de oligonucleótidos más utilizado se obtuvo desde la región del gen 16 Sr RNA y sus secuencias son 5'-ACGAAAGCGTGG GGAGCAAA-3' y 5'-GAAGTCGAGTTGCAGA CTTC-3', las cuales han sido testadas con DNA obtenido a partir de tejidos infectados.

Procedimiento:

- tomar 2 gr de tejido de hoja fresca, congelada en nitrógeno líquido y pulverizada a -80°C para su posterior uso.
- mezclar el tejido con 7 ml tampón de suspensión (anexo 1.1) esterilizado y filtrado.
- la mezcla tejido-tampón es filtrada y centrifugada a 20.000 g por 20 min.
- el pellet resultante es resuspendido con el tampón de extracción y se separan los ácidos nucleicos.
- la mezcla para la amplificación contiene 50 ng del DNA de los tejidos, 0,4 μ M del par de iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 0,001% de gelatina, 200 μ M de cada nucleótido dATP, dCTP, dTTP y dGTP, todo en un volumen igual a 50 μ l.
- el control negativo consiste en una mezcla conteniendo agua estéril desionizada en lugar del molde de DNA.
- la mezcla de reacción se sobrecarga con 25 μ l de aceite mineral y se lleva a cabo la reacción en un termociclador.
- ciclos de amplificación: 2 minutos a 94°C; 35 ciclos (1 min a 94°C, 2 min a 50°C, 3 min a 72°C), 7 min a 72°C.
- en el primer ciclo de amplificación agregar 1,25 μ l de Taq polimerasa.
- colorear las muestras con colorante DIE en una relación 1:5 para una corrida en gel de agarosa al 1 %.
- se prepara el gel sobre vidrio horizontal, se coloca en cuba con tampón TAE (anexo 1.2) y se conecta a una fuente de poder a 120 mAps. por una hora aprox.
- se revela el gel con bromuro de etidio por 10 min en agitación y oscuridad.
- cambiar a agua destilada y observar en transiluminador con UV, para sacar foto.

Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico:

Los Fitoplasmas son organismos asociados a varias enfermedades de diferentes especies. Sus bajas concentraciones y su irregular distribución en las plantas hospedadoras han sido siempre un obstáculo para un diagnóstico preciso de las

enfermedades asociadas a estos patógenos, sobre todo en las plantas leñosas. No ha sido posible aislar este patógeno en cultivos puros, por lo que su detección se realiza principalmente con métodos instrumentales (microscopía electrónica y fluorescencia (DAPI)). La microscopía electrónica tiene la desventaja que puede ser usada cuando la concentración de Fitoplasmas es alta. La técnica DAPI es más sensible, pero limitada cuando la concentración es baja.

Considerando que en las inspecciones rutinarias de muestras de plantas sin síntomas se requieren métodos de elevada sensibilidad, la técnica de amplificación de los ácidos nucleicos (PCR) está alcanzando un papel importante en el diagnóstico de estos microorganismos, su utilización ha hecho posible la detección e identificación de Fitoplasmas en cultivos en los que la concentración era muy baja y no podía ser detectada por serología o hibridación. Sin embargo, por la propia naturaleza del proceso de amplificación, el PCR puede dar lugar a errores, por lo tanto, para dar una mayor seguridad y sacar el máximo partido de la información proporcionada por esta técnica, los productos obtenidos tras la amplificación pueden secuenciarse, siendo un método ideal para el diagnóstico, análisis de mutaciones, genotipos y estudios taxonómicos.

Referencias:

1. AGRIOS, G. 1991. Enfermedades de las plantas ocasionadas por organismos semejantes a micoplasma. In: Fitopatología. Mexico, Limusa. 756 p.
2. AHRENS, U. ; SEEMÜLLER, E. 1992 Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rDNA gene. *Phytopathology* 82(8): 828-832.
3. BRUNNER, K.; SEEMÜLLER, E. 1987. Overwintering of the apple proliferation and pear decline causing MLOs at the graft union. Inst. Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim, German Federal Republic. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 94(5): 457-461.
4. CABI/EPPO 1992 Pear decline MLO. EPPO Quarantine Pest for Europe. Cambridge, UK, CAB International in association with the EPPO. p.756-759.
5. CHILE. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 1993. Listas A1 y A2 de plagas y enfermedades cuarentenarias para Chile. 8p.
6. COSAVE 1991. Pear Decline MLO. Ficha cuarentenaria N°14. In: Plagas cuarentenarias.
7. DAVIES, D. ; ADAMS, A. ; GLENISTER, M. 1984. Mycoplasma-like organisms (MLOs) in pears and apples. Report East Malling Research Station for 1984. Maidstone, Kent, UK. 151 p.
8. FIRRAO, G. ; GOBBI, E. ; LOCCI, R. 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83(6): 602-607.
9. HAGGIS, G. ; SINHA, R. 1978. Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology* 68(4): 677-680.
10. KOLLAR, A.; SEEMÜLLER, E.; BONNET, F. ; SAILLARD, C. ; BOVE, J. 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80(3): 233-237.
11. LEE, M.; DAVIS, R. 1983. Phloem-limited prokaryotes in sieve elements isolated by enzyme treatment of diseased plant tissues. *Phytopathology* 73(11): 1540-1543.
12. _____ ; HAMMOND, R. ; DAVIS, R. ; GUNDERSEN, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83(8): 834-841.
13. NAMBA, S. ; ET AL 1993. Detection and differentiation of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* . 83(7): 786-791.

14. PRINCE, J.; DAVIS, R.; WOLF, T.; LEE, M.; MOGEN, B.; DALLY, E.; BERTACCINI, A.; CREDI, R.; BARBA, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with Aster Yellows, X-Disease, and Elm Yellows MLOs. *Phytopathology* 83(10): 1130-1137.

15. SEEMÜLLER, E. 1989. Pear Decline. In: *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. s.l., Fridlund. p.188-198.

16. _____; SCHAPER, U.; ZIMBELMANN, F. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Inst. Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim, German Federal Republic. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91(4): 371-382.

17. SHARMA, A.; SAVOURE, A.; ROUSSEAU, J.; COUSIN, M. 1986. *Hydrangea virescence* II. -Diagnosis by fluorescence microscopy and detection of infection in resin-embedded samples with bright field and phase contrast microscopy. *Agronomie* 6(3): 255-263.

18. SMITH, I.M. 1988. MLO del decaimiento del peral. In: *Manual de enfermedades de las plantas*. Madrid, España, Mundi-Prensa. 671 p.

ANEXOS

Anexo 1

1-. Tampones:

Tampón de suspensión

K ₂ HPO ₄ * H ₂ O	100 mM
KH ₂ PO ₄	30 mM
Sacarosa	a1 10 %
Albúmina de suero bovino	a1 0,15 %
PVP	a1 2%.
Acido L-ascórbico	25 mM. (este último debe añadirse justo antes de usar)

Finalmente el pH de la solución es ajustado a 7,5 con NaOH.

Tampón TAE 10X

Tris (400 mM)	48,44 g.
Acetato de sodio (200 mM)	27,22 g.
EDTA-sódico (10mM)	3,72 g.

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar a pH 7,2 con ácido acético glaciar puro y llevar a 1000 ml. Para tanque de electroforesis de agarosa llevarlo a 1X.