FITOPATOLOGÍA

Publicación oficial de la Sociedad Española de Fitopatología

SEF SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA

Año 2018 Número 3

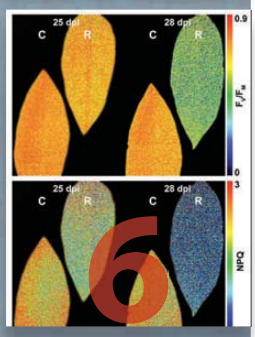
Nuevas tecnologías en Fitopatología

Historias de la inmunología/ serología en España

Entrevista al Dr. Miguel A. Cambra Álvarez

Diagnóstico de nueva generación con CRISPR

Contenido



PRESENTACIÓN ---- 4
(Por Vicente Pallás)

ARTÍCULOS DE REVISIÓN ---- 6

Detección y seguimiento de patógenos vegetales mediante técnicas de imagen ---- 6
(Por Mónica Pineda, María Luisa Pérez-Bueno, Antonio de Vicente, Cayo Ramos y Matilde Barón)

Herramientas ómicas como aliadas en el control de enfermedades del olivar ---- 14
(Por Carmen Gómez-Lama y Jesús Mercado-Blanco

El sistema CRISPR/Cas, un poderoso aliado en la lucha contra los organismos fitopatógenos ---- 26
(Por Diego López Márquez, Eduardo R. Bejarano y Ana P. Luna)

Técnicas de visión artificial y *deep learning* sobre dispositivos móviles... ---- 36
(Por Artzai Picón, Alexander Johannes, Aitor Álvarez-Gila, Maximiliam Seitz, Jone Echazarra, Sergio Rodríguez-Vaamonde, Ana Díez Navajas y Amaia Ortiz-Barredo)

HISTORIAS DE FITOPATOLOGÍA ---- 43

Historias de la inmunología/serología en España ---- 43
(Por Mariano Cambra Álvarez)

ENTREVISTA ---- 55

al Dr. Miguel Á. Cambra Álvarez ---- 55
(Por Nieves Capote)

COMENTARIOS DE ARTÍCULOS ---- 61

Un sistema de señalización bacteriana sensible a plantas detecta un derivado de la etanolamina ---- 61
(Por José Antonio Gutiérrez)

Selección de un consorcio bacteriano beneficioso para la planta mediante... ---- 62
(Por Carmen Vida)

Diagnóstico de nueva generación con CRISPR ---- 63
(Por Carmen Hernández)

Identificación de pequeños RNA artificiales altamente eficientes... ---- 64
(Por Frederic Aparicio)

NOTICIAS DE ACTUALIDAD ---- 65
(Por Vicente Pallás)

Un virus de 1 000 años recuperado de un antiguo asentamiento de nativos americanos ---- 65

Los científicos europeos se unen para salvaguardar la mejora de precisión para... ---- 65

TESIS DOCTORALES ---- 67

RESEÑAS SOBRE CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS ---- 68

XIX Congreso Nacional de Fitopatología ---- 68
(Por Carolina Escobar)

Reunión anual de los proyectos europeos POnTE y XF-ACTORS ---- 70
(Por Martina Cendoya y Elena Lázaro)

Congreso Internacional de Patología Vegetal, Boston 2018 ---- 71
(Por Antonio Vicent y Jaime Cubero)

International Epidemiology Workshop (IEW12) ---- 73
(Por Antonio Vicent y Elisa González-Domínguez)

NUEVOS PATÓGENOS EN ESPAÑA ---- 74
(Por Juan A. Navas-Cortés)

FITOPATOLOGÍA Y SOCIEDAD ---- 77

150 aniversario del origen del IVIA ---- 77
(Por Antonio Vicent y Ester Marco-Noales)

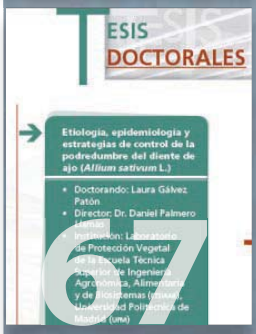
FITO-RELATOS ---- 79

La única superviviente ---- 79
(Por David Ruano)

Las últimas visiones ---- 81
(Por Francisco T. Arroyo)

PREMIO SEF DE FOTOGRAFÍA CIENTÍFICA EN FITOPATOLOGÍA "MIGUEL CAMBRA" ---- 84

CRÉDITOS ---- 85



Vicente Pallás

Presentación

Apreciados socios y amigos de la SEF,

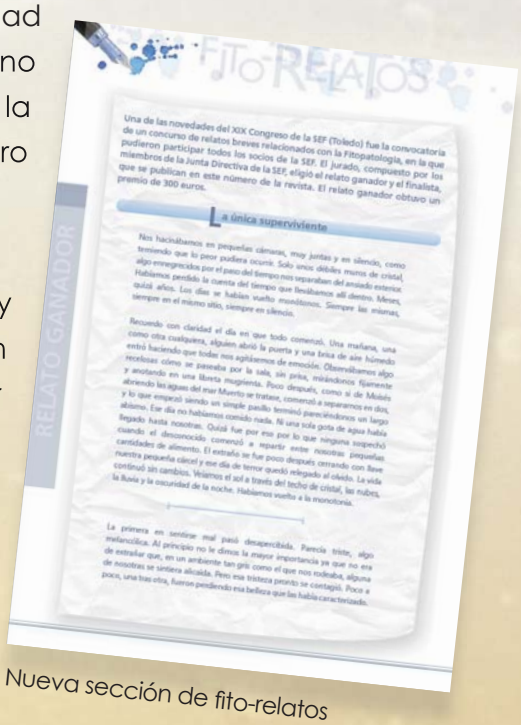
Lo más difícil de un nuevo proyecto no es empezarlo sino mantenerlo. En ello estamos poniendo todo nuestro empeño para que esta revista de nuestra Sociedad no se quede en una mera ilusión inicial, sino que tenga la continuidad y calidad que todos los socios se merecen. En este nuevo número de la revista, cuya temática central la hemos dedicado a las "NUEVAS TECNOLOGÍAS EN FITOPATOLOGÍA", encontraréis cuatro magníficas revisiones que versan sobre nuevas técnicas de imagen para la detección y seguimiento de patógenos, la utilización de herramientas ómicas en el control de las enfermedades del olivar, nuevas técnicas de visión artificial y *deep learning* sobre dispositivos móviles para la identificación de síntomas en campo y la última tecnología incorporada en nuestro campo y que, por supuesto, no podía faltar en este número: el sistema CRISPR/Cas en la lucha contra los organismos fitopatógenos. En la sección FITOPATOLOGÍA Y SOCIEDAD podréis encontrar un interesante artículo sobre el origen del IVIA con motivo de su 150 aniversario, y en el de HISTORIAS DE LA FITOPATOLOGÍA tendréis la oportunidad de disfrutar de un ameno y riguroso relato sobre la historia de la Serología en España escrito por nuestro socio y expresidente Mariano Cambra.

Artículo de revisión III

El sistema CRISPR/Cas, un poderoso aliado en la lucha contra los organismos fitopatógenos

Artículo del sistema CRISPR/Cas

Este año ha sido un año de congreso y quiero aprovechar esta presentación para felicitar al Comité Organizador del XIX Congreso de la SEF celebrado en Toledo el pasado octubre por su magnífica gestión y trato dispensado a todos los asistentes. En este congreso


FITO-RELATOS

RELATO GANADOR

La única superviviente

Nueva sección de fito-relatos

ENTREVISTA...

...al Dr. Miguel Á. Cambra Álvarez

El Dr. Miguel Ángel Cambra Alvarez fue jefe del Laboratorio de Diagnóstico fitopatológico del Gobierno de Aragón desde 1982 hasta su reciente jubilación en febrero de 2017. Fue socio de la SEF desde 1987, vocal de la Junta desde 1999 a 2003 y socio fundador del Grupo Especializado en Diagnóstico, Detección e Identificación GEDDI-SEF. En esta entrevista nos revelará su trayectoria profesional, los retos y logros obtenidos en su vasta carrera investigadora y sus experiencias en el mundo de la fitopatología.

... por Nieves Capote

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA Centro "Las Torres"). Alcalá del Río, Sevilla

¿Nos puedes hacer un breve resumen de su trayectoria profesional?

En 1981 conseguí un contrato como radarista en la lucha antigranizo

Entrevista al Dr. Miguel Cambra

hemos incorporado una nueva actividad encaminada a incentivar el acercamiento de la Fitopatología a la sociedad y hemos instaurado un concurso de relatos breves con este fin. Podéis leer los curiosos relatos tanto del primer premio como del finalista en una nueva sección de este número, que hemos denominado FITO-RELATOS.

Una de las secciones más populares de nuestra revista es sin duda la ENTREVISTA a un fitopatólogo de relevancia y socio de la SEF. En esta ocasión tenemos el placer de conocer mejor al Dr. Miguel Cambra que, como sabéis, se ha jubilado recientemente, y que su pasión por la fotografía científica ha hecho que la presente Junta decidiera que el concurso de Fotografía que la SEF organiza en todos sus congresos lleve su nombre. De la entrevista a este "fitofotopatólogo" –como así se define él mismo– destacaría un sabio consejo, cada vez más necesario, para los fitopatólogos jóvenes: "Que salgan al campo con sombrero y crema para no quemarse y escuchar lo que ***dicen*** las plantas".

FITOPATOLOGÍA y SOCIEDAD

150 ANIVERSARIO DEL ORIGEN DEL IVIA

ivia Institut Valencià d'Investigacions Agràries 150 aniversari

El origen del Institut Valencià d'Investigacions Agràries se remonta al Jardín Provincial de Aclimatación y Campo de Experiencias fundado en 1868 en los Jardines del Real de Valencia

Sección de Fitopatología y Sociedad

La revista la completan interesantes secciones como FITOPATOLOGIA Y SOCIEDAD, RESEÑAS DE CONGRESOS, TESIS DOCTORALES y COMENTARIOS DE ARTICULOS. Sin duda, un magnífico número, coordinado por Nieves Capote y Juan A. Navas, a quienes se lo agradecemos infinitamente, y que espero que disfrutéis.

Vicente Pallás
Presidente de la SEF

Detección y seguimiento de patógenos vegetales mediante técnicas de imagen

Mónica Pineda Dorado es doctora en Biología por la Universidad de Granada. Desde 2002 trabaja en el departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) en Granada, donde investiga las alteraciones fisiológicas de las plantas infectadas con virus, hongos o bacterias mediante proteómica y técnicas de imagen. Recientemente, ha incorporado el uso de algoritmos clasificatorios a sus investigaciones.

María Luisa Pérez-Bueno es doctora en Bioquímica por la Universidad de Granada. En los últimos años ha trabajado en el departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) en Granada y en el Grupo de Biotecnología y Biología Molecular

Esta publicación está dedicada a la memoria de Juan Antonio Torés (1952-2018)

Mónica Pineda[1], María Luisa Pérez-Bueno[1], Antonio de Vicente[2], Cayo Ramos[3] y Matilde Barón Ayala[1]

[1]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Granada.

[2]Departamento de Microbiología y [3]Área de Genética. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga (UMA). Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Málaga

Introducción

La agricultura del siglo XXI se enfrenta a serios retos como el aumento de la producción, la reducción del área cultivable, el daño ambiental de las prácticas agrícolas en general y el cambio climático con su impacto sobre el desarrollo de la propia planta y las plagas y enfermedades que le afectan. Un aspecto de gran interés son los avances en las técnicas relacionadas con la fitopatología, que puedan tener una repercusión en la manera de solucionar estos retos.

El desarrollo de técnicas no invasivas para el diagnóstico del estrés vegetal mediante la obtención de imágenes de fluorescencia roja, fluorescencia multicolor, reflectancia o de temperatura, ha incrementado enormemente nuestro conocimiento de la respuesta de plantas y cultivos a patógenos y plagas. Visualizar la gran diversidad de señales luminosas emitidas por las plantas es una ingeniosa forma de seguir la expansión de un patógeno en su hospedador y, a la vez, un valioso instrumento de detección presintomática de la enfermedad, que evalúa la magnitud y el momento de los cambios inducidos en la planta. Estas técnicas pueden ser usadas en el laboratorio o en el campo mediante teledetección.

En contraposición, los métodos más usados para detección y diagnóstico de patógenos (sintomatología, aislamiento en cultivo seguido de pruebas bioquímicas y moleculares, métodos serológicos y PCR), aunque efectivos, pueden resultar relativamente laboriosos y costosos, retrasándose el diagnóstico y ocasionando pérdidas de cultivos que podrían evitarse con tratamientos precoces.

La contribución de las técnicas de imagen a la agricultura de precisión ha ido paralela con el desarrollo de nuevos sensores ópticos de alta resolución y métodos de análisis matemático innovadores y muy sofisticados para el manejo de la enorme cantidad de datos generados por los mismos. Todo ello facilita el análisis de las complejas interacciones planta-patógeno, y permite visualizar la heterogeneidad espacial y temporal de

de Plantas en la Universidad de Castilla La Mancha. Su investigación se centra en el fenotipado de plantas sometidas a estrés biótico y abiótico.

Antonio de Vicente es doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga. Es Catedrático de Microbiología en la misma Universidad e Investigador adscrito al Departamento de Protección Vegetal del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea-UMA-CSIC "La Mayora". Ha trabajado en la biología y el control de diferentes modelos patógeno-planta bacterianos y fúngicos, entre los que cabe destacar: *Pseudomonas syringae*-mango, oídio de cucurbitáceas y *Rosellinia necatrix*-aguacate.

Cayo Ramos, doctor en Biología por la Universidad de Sevilla, es Catedrático de Genética en la Universidad de Málaga. Su línea de investigación se centra en la tuberculosis del olivo

los cambios fisiológicos de plantas y cultivos durante la patogénesis, ampliándose así las posibilidades de detección de enfermedades mediante la observación de síntomas visuales o por los métodos tradicionales anteriormente mencionados.

En esta revisión nos centramos en las contribuciones de sus autores al estudio de enfermedades de plantas causadas por virus, bacterias y hongos, mediante el uso de técnicas de imagen, como la detección de la fluorescencia roja emitida por la clorofila (Chl-FI; del inglés, *chlorophyll fluorescence imaging*), de la fluorescencia multicolor inducida por luz UV (MCFI; del inglés, *multicolour fluorescence imaging*) o la termografía. Las imágenes de distintos parámetros obtenidos durante la cinética de inducción de la Chl-F por luz visible proporcionan información sobre los procesos fotoquímicos de transporte electrónico y los de disipación de la energía no utilizada en fotosíntesis. Los cambios en MCFI, principalmente los de la fluorescencia azul (F440) o verde (F520) están relacionados con la presencia de compuestos fenólicos, como escopoletina, o los ácidos clorogénico, ferúlico o cafeico, implicados en la defensa de las plantas, y en la activación o represión del metabolismo secundario inducido por los patógenos. Por último, las imágenes termales muestran la transpiración vegetal durante la patogénesis y ponen de manifiesto el protagonismo de los estomas en la inmunidad innata de la planta. De este modo, la combinación de todas estas técnicas permite visualizar a tiempo real la orquestación de los cambios inducidos por los patógenos desde los primeros estadios del proceso de infección de plantas.

TRES TÉCNICAS DE CAPTURA DE IMÁGENES PARA LA DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE PATÓGENOS VEGETALES

Cinética de inducción de la fluorescencia roja emitida por la clorofila

La curva de inducción de la Chl-F con luz fotosintéticamente activa proporciona una valiosa información acerca de la eficiencia del fotosistema II (en inglés, PSII), e indirectamente de la asimilación de CO_2 [3]. De este modo, permite analizar el resultado de la competencia entre tres procesos determinantes del estado fisiológico de las plantas: la actividad fotoquímica del PSII, la disipación de la energía no utilizada en fotosíntesis como calor y la propia fluorescencia roja. El seguimiento de estos procesos se realiza mediante la obtención de imágenes correspondientes a los parámetros extraídos de esta cinética. Dichos parámetros están relacionados con los procesos fotoquímicos, como el rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) y su rendimiento cuántico máximo (F_V/F_M; en una planta sana suele alcanzar valores de 0,8); o con la energía disipada en forma de calor, como el *quenching* no fotoquímico (NPQ). Las plantas infectadas con virus, bacterias u hongos muestran cambios, en muchas ocasiones presintomáticos, en algunos de estos parámetros, que se asocian a perturbaciones fisiológicas ocasionadas por el agente fitopatógeno. Además, estos parámetros también pueden ser utilizados para distinguir alteraciones en el metabolismo de la planta causadas por interacciones compatibles, de las causadas por las incompatibles.

Se han obtenido imágenes de parámetros de Chl-F para diversas interacciones virus-planta, tanto en hojas inoculadas como en las infectadas sistémicamente. Dichas imágenes muestran alteraciones fisiológicas durante la patogénesis, ya sea en áreas sintomáticas como asintomáticas. La tasa de inhibición de la actividad fotosintética puede ir asociada a la gravedad de los síntomas o manifestarse antes de su desarrollo, facilitando el diagnóstico presintomático. En infecciones por el

y otras enfermedades causadas por bacterias en adelfa, fresno, retama y la planta ornamental *Mandevilla* spp., mediante estrategias que van desde la fitopatología convencional hasta aproximaciones moleculares y genómicas. Durante los últimos años ha actuado como colaborador del Área de Agricultura de la Agencia Estatal de Investigación.

Matilde Barón Ayala es doctora en Ciencias Biológicas con Premio Extraordinario por la Universidad de Granada. Desde 2014 es directora de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC, donde inició su carrera investigadora en 1981. Su línea de investigación se centra en el fenotipado vegetal y el estudio de factores de estrés biótico y abiótico mediante técnicas de captura de imagen. Es miembro de la Comisión de Ética del CSIC y ha sido vocal de la Comisión de Área de Ciencias Agrarias del CSIC y gestora asociada del programa EXPLORA del MICINN.

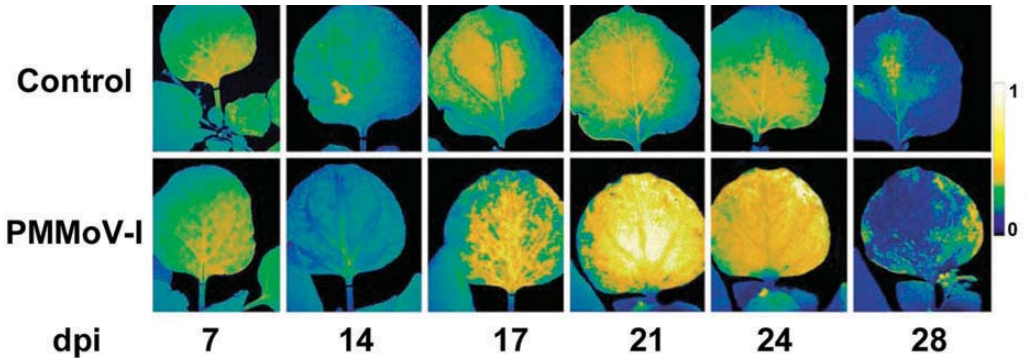


Figura 1. Imágenes del *quenching* no fotoquímico (NPQ) en el estado estacionario de hojas asintomáticas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con la cepa italiana del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-I), así como de sus respectivos controles (inoculados con tampón fosfato 20 mM pH 7), a diferentes días postinoculación (dpi). La escala de falsos colores indica la intensidad del NPQ [Modificado con permiso a partir de Pérez-Bueno *et al.* (2006)].

tobamovirus del moteado suave del pimiento (PMMoV, del inglés *Pepper mild mottle virus*) se encontró una correlación entre la distribución del virus en la hoja asintomática de *Nicotiana benthamiana* y el patrón foliar de NPQ [Figura 1]: las áreas invadidas por el virus muestran altos valores de NPQ que con el tiempo progresan a tejidos adyacentes, lo que permite hacer un seguimiento en tiempo real del movimiento del virus a través de la planta. La descarga del virus en la hoja produce una inhibición del transporte electrónico fotosintético que lleva asociada bajos valores de F_V/F_M y Φ_{PSII}. Así, el exceso de energía de excitación se disipa en forma de calor (medido como NPQ), para evitar la fotoinhibición[6]. Durante la infección asintomática por virus del enrollamiento 3 (GLRaV-3, del inglés *Grapevine leafroll-associated* virus 3) de la variedad de vid de uva blanca Malvasia de Banyalbufar, el descenso en parámetros como F_V/F_M y Φ_{PSII} muestra fotoinhibición en las plantas infectadas, con pérdida de funcionalidad cloroplastídica. El incremento de NPQ se correlaciona con el descenso en los niveles de intermediarios fotorrespiratorios[4]. La Chl-FI ha sido utilizada también con éxito para distinguir infecciones bacterianas compatibles de incompatibles. Rodríguez-Moreno *et al.*[10] encuentran un notable descenso en NPQ en el caso de hojas asintomáticas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Pph, infección sistémica) con respecto a los controles sanos o a las hojas inoculadas con *P. syringae* pv. tomato (Pto, reacción hipersensible o HR) [Figura 2].

A bajas dosis de inóculo, la bacteria *Dickeya dadantii* (causante de la podredumbre blanda en numerosas especies de interés agronómico) induce, en *N. benthamiana*, un descenso en Φ_{PSII} y un incremento en NPQ, indicativo de un aumento en la capacidad de disipación energética[5]. Esto constituye un mecanismo de defensa que parece asociado con la inhibición de la maceración de los tejidos infectados. La regulación a la baja de la fotosíntesis forma parte del sistema de defensa vegetal para limitar las fuentes de carbono al patógeno y redirigirlas al metabolismo secundario. Por otro lado, el mecanismo subyacente al NPQ afecta de forma positiva a los mecanismos de inmunidad inducida por PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos, de las siglas en inglés de *pathogen-associated molecular patterns*).

También se ha llevado a cabo el análisis mediante Chl-FI de la podredumbre blanca causada por el hongo radicular *Rosellinia necatrix* en aguacate (*Persea americana* Mill.),

La regulación a la baja de la fotosíntesis forma parte del sistema de defensa vegetal para limitar las fuentes de carbono al patógeno y redirigirlas al metabolismo secundario

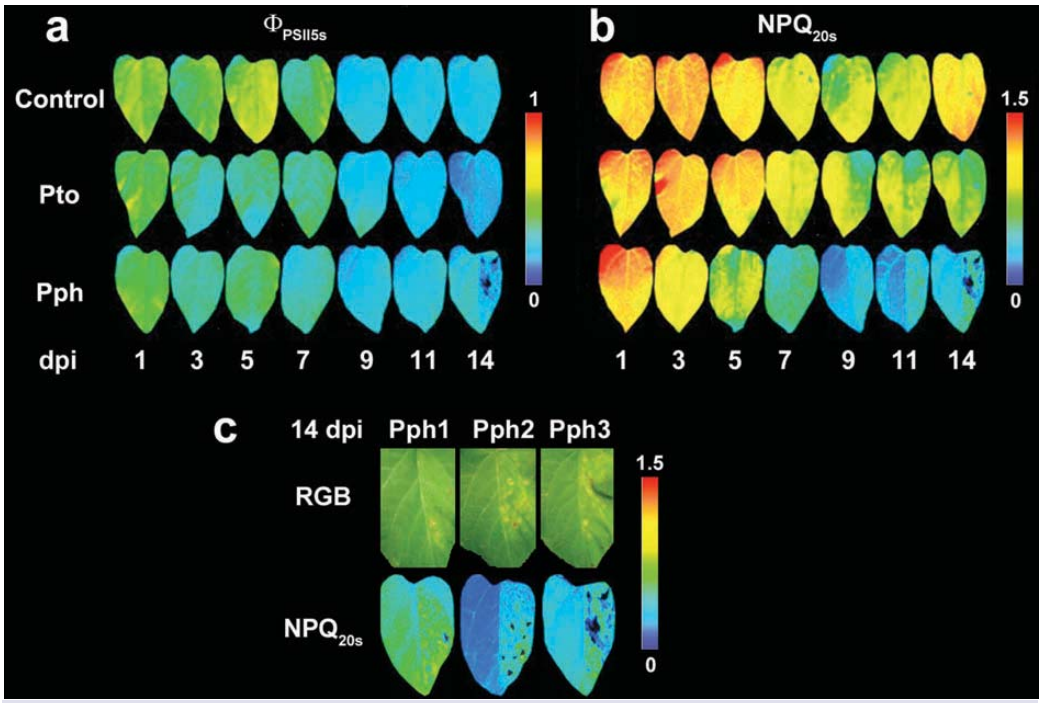


Figura 2. Imágenes a diferentes días postinoculación (dpi) de parámetros de fluorescencia roja emitida por la clorofila (Chl-FI), que diferencian la interacción compatible e incompatible establecida con judía (*Phaseolus vulgaris*) por las cepas *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Pph) 1448A y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto), respectivamente. Imágenes del **(a)** rendimiento cuántico efectivo del fotosistema obtenidas a 5s ($\Phi_{PSII}5s$) y del **(b)** *quenching* no fotoquímico a 20 s (NPQ_{20s}) durante la cinética de inducción de fluorescencia roja de la clorofila; **(c)** NPQ_{20s} de tres hojas de diferentes plantas de judía inoculadas con Pph a 14 dpi. La escala de falsos colores representa la intensidad de cada parámetro. Las imágenes se han obtenido a partir de hojas de judía control (infiltradas con una solución de $MgCl_2$ 10 mM) e inoculadas en la mitad derecha de la hoja con la bacteria [Modificado con permiso a partir de Rodríguez-Moreno *et al.* (2008)].

La biosíntesis de muchos compuestos fenólicos se activa durante el estrés vegetal. Parte de estos compuestos emiten principalmente fluorescencia verde y azul

cuyos síntomas en la parte aérea aparecen de forma tardía. Las imágenes de algunos parámetros de Chl-F revelan diferencias significativas entre plantas sanas e infectadas en fases presintomáticas tardías de la infección, sugiriendo que el cloroplasto ha sido afectado. En cambio, otros parámetros como F_V/F_M decrecen drásticamente con respecto al control sólo con la aparición de los primeros síntomas, indicando un daño fotooxidativo, probablemente asociado con el estrés hídrico inducido por el patógeno [Figura 3][2].

Fluorescencia multicolor inducida por luz UV

La excitación de una hoja con luz UV (320-400 nanómetros, nm) induce cuatro bandas de fluorescencia características con picos cercanos a 440 nm (azul; F440), 520 nm (verde; F520), 690 nm (rojo; F690) y 740 nm (rojo lejano; F740), cuyas correspondientes imágenes pueden ser captadas con el objetivo de analizar el estrés biótico asociado a la infección por patógenos. Por otro lado, la biosíntesis de muchos compuestos fenólicos, principalmente de la ruta de los fenil-propanoides, se activa durante el estrés vegetal, como parte de los mecanismos de defensa de las plantas. Sometidos a luz UV, parte de estos compuestos emiten principalmente fluorescencia verde y azul. Este es el caso de los ácidos hidroxicinámicos como ferúlico o clorogénico. Además, la clorofila a emite F690 y F740, aunque estos parámetros no están estrictamente relacionados con la actividad fotosintética, ya que la luz UV no es fotosintéticamente activa. Los cocientes entre estas emisiones de fluorescencia F440/F520, F440/F690, F440/F740 y F690/F740

Los cocientes F440/F520, F440/F690, F440/F740 y F690/F740 son de gran utilidad para el seguimiento de enfermedades y otras situaciones de estrés vegetal

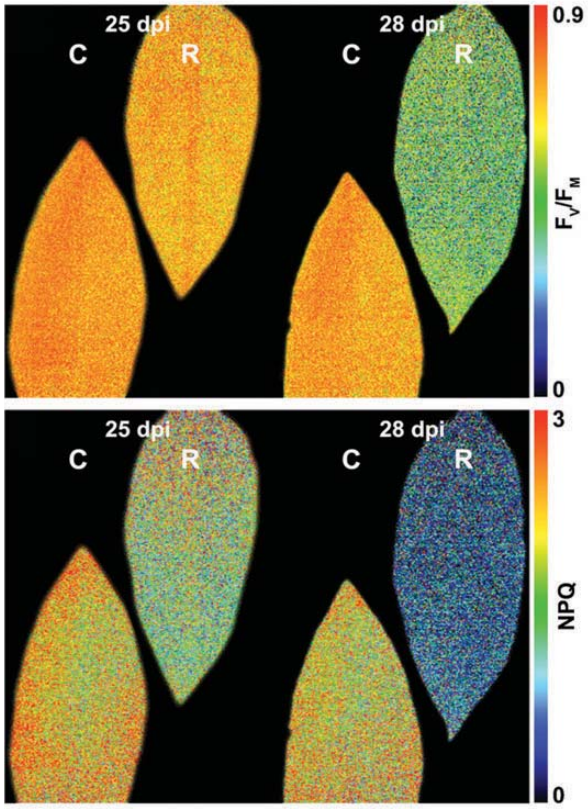


Figura 3. Imágenes del rendimiento cuántico del fotosistema II o F_V/F_M (panel superior) de hojas de árboles de aguacate control **(C)** e infectados con el hongo *Rosellinia necatrix* **(R)**, tras 25 y 28 días postinoculación (dpi). En el panel inferior, imágenes del *quenching* no fotoquímico en el estado estacionario (NPQ) de las mismas hojas en los mismos tiempos postinfección. La escala de falsos colores indica la intensidad de los parámetros medidos mediante Chl-FI [Modificado con permiso a partir de Granum *et al.* (2015)].

Los estomas son una vía de entrada natural de muchos patógenos y se ha destacado su papel como parte de la respuesta defensiva de la planta

son de gran utilidad para el seguimiento de enfermedades y otras situaciones de estrés vegetal[1].

La eficiencia diagnóstica de la captura de imágenes aumenta cuando se combina, en el mismo sistema huésped-patógeno, con otras técnicas como la metabolómica, lo que permite conocer en mayor detalle el impacto del patógeno en el metabolismo primario o secundario de la planta. En el caso anteriormente citado de la infección por el GLRaV-3, los datos de metabolómica obtenidos en este sistema señalan que la concentración de flavonoles como miricetina, kaempferol y derivados de quercitina y ácidos hidroxicinámicos, como el cafeico, se incrementan durante la infección viral, lo que se refleja en un aumento de F440, F520 en las hojas, y cambios en F440/F680, F440/F740, F520/F680 y F520/F740[4]. Por otra parte, la infección viral sistémica de PMMoV en plantas de *N. benthamiana* produce alteraciones en la emisión de F440 y F520, ligadas a altos niveles de ácido clorogénico [Figura 4][9]. En cambio, en el caso de *N. benthamiana* infectada por *D. dadantii*, F520 es el parámetro más sensible para un diagnóstico temprano. Su emisión se localiza inicialmente en el apoplasto y posteriormente en las células del mesófilo. Los ensayos metabolómicos en este sistema señalan al ácido ferúlico y la escopoletina como los probables emisores de fluorescencia verde[5].

Termografía de imagen

Los estomas no sólo controlan el intercambio de gases en el proceso fotosintético, sino también el proceso de transpiración que refrigera a la planta y constituye una fuerza motriz para la captura de agua y nutrientes. Además, son una vía de entrada natural de muchos patógenos y, en los últimos años, se ha destacado su papel como parte de la respuesta defensiva de la planta. De hecho, se han descrito patógenos que son capaces de manipular las rutas de señalización implicadas en defensa promoviendo el cierre o apertura estomático en su beneficio[5].

Las cámaras termales captan la radiación del infrarrojo cercano emitida por plantas y cultivos y, por consiguiente, su temperatura, que se correlaciona de forma inversa con la transpiración y la conductancia estomática. Además, la aparición de cámaras con una resolución cada vez mayor ha hecho posible monitorizar de forma indirecta el comportamiento estomático de plantas y cultivos, con especial interés en evaluación de sequía. Sin embargo, en los

Los patógenos vegetales pueden dar lugar a cambios en la temperatura foliar que, en ocasiones, son presintomáticos

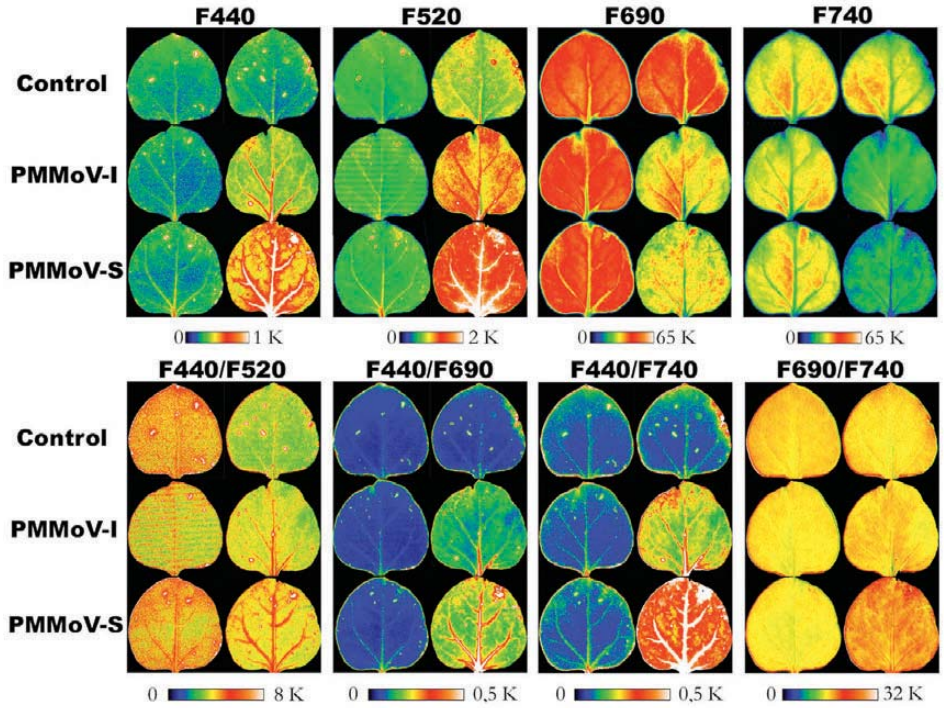


Figura 4. Imágenes de MCFI de la cara abaxial de hojas asintomáticas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con las cepas española (PMMoV-S) e italiana (PMMoV-I) del virus del moteado suave del pimiento, así como de sus respectivos controles inoculados con tampón fosfato 20 mM pH 7. **Panel superior:** Imágenes de la fluorescencia azul (F440), verde (F520), rojo (F690) y rojo-lejano (F740). **Panel inferior:** imágenes de los cocientes de fluorescencia F440/F520, F440/F690, F440/F740 y F690/F740 de las mismas hojas. Para cada tratamiento y parámetro mostrado, se ilustran las imágenes antes (5 días postinoculación) y después (17 días postinoculación) de que los principales cambios en la emisión de fluorescencia ocurran. La escala de falsos colores representa la intensidad del parámetro mostrado en cada panel [Modificado con permiso a partir de Pineda *et al.* (2008)].

últimos años también se han usado para conocer el impacto de infecciones virales, bacterianas y fúngicas. La combinación de estas técnicas con las anteriormente descritas (Chl-FI y MCFI) incrementa las posibilidades diagnósticas y pone de manifiesto la compleja heterogeneidad espacial y temporal de procesos esenciales para la planta, como la fotosíntesis, el metabolismo secundario y la transpiración. En muchas ocasiones puede combinarse el uso de cámaras termales con el de multiespectrales o hiperespectrales a la búsqueda de una "huella" espectral del patógeno.

Los patógenos vegetales, ya provoquen infección sistémica o induzcan una HR, pueden dar lugar a cambios en la temperatura foliar que, en ocasiones, son presintomáticos. Por ejemplo, las hojas asintomáticas de plantas *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV registran un incremento térmico antes de la descarga del virus desde el floema. Las imágenes termales también han resultado de utilidad para diferenciar relaciones planta-bacteria, como es el caso de las interacciones compatibles e incompatibles establecidas por los patovares de *P. syringae* Pph y Pto, respectivamente, en hojas de judía. En las primeras horas tras la inoculación, el incremento de temperatura detectado en las áreas inoculadas se adelanta en la infección con Pph, lo que puede ser atribuido a la ausencia en cepas pertenecientes a este patovar de una toxina capaz de producir la reapertura estomática, como es la coronatina, que sí secreta Pto. El efecto de la infección bacteriana en la regulación estomática también se analizó en *N. benthamiana* infectada con *D. dadantii* [Figura 5]. El incremento térmico

El desafío es doble: la obtención de los datos a partir de las imágenes y el análisis de los mismos. El avance de la informática y de herramientas matemáticas propias del *big data*, han ayudado a salvar estos dos obstáculos

en las zonas inoculadas es dependiente de la dosis del inóculo bacteriano, y el cierre estomático durante la infección podría ser desencadenado por la percepción de los PAMP y controlado por ácido salicílico y abscísico, que se ven incrementados durante la infección[5].

TRATAMIENTO DE LOS DATOS MEDIANTE ALGORITMOS CLASIFICATORIOS

Los sensores ópticos proporcionan un gran volumen de información que alcanza el orden de los terabytes. Toda esta compleja información recopilada a nivel espectral, espacial y temporal, requiere el uso de métodos de gran capacidad para su manejo, análisis e interpretación, de cara a conseguir en el menor tiempo posible la detección temprana del estrés biótico. El desafío es doble: la obtención de los datos a partir de las imágenes y el análisis de los mismos. En los últimos años, el avance de la informática y de las herramientas matemáticas propias del *big data* (herramientas de gestión de grandes volúmenes de información), han ayudado a salvar estos dos obstáculos. Por una parte, el desarrollo de *software* específico para el manejo de imágenes está permitiendo automatizar su almacenamiento y obtención de datos numéricos a partir de ellas. Por otro lado, las herramientas de *big data* han supuesto un gran avance en la agricultura de precisión y el fenotipado vegetal. Son un conjunto de algoritmos clasificadores (*machine learning* o aprendizaje automático) capaces de predecir a qué categoría pertenece una determinada muestra a partir de la información previamente almacenada y aprendida. Estos clasificadores ya se han aplicado con éxito en la detección temprana de enfermedades vegetales a partir de datos obtenidos mediante imágenes. En el caso de cucurbitáceas (calabacín y melón) infectadas con la bacteria necrotrofa *D. dadantii*, se utilizaron parámetros provenientes de termografía de imagen,

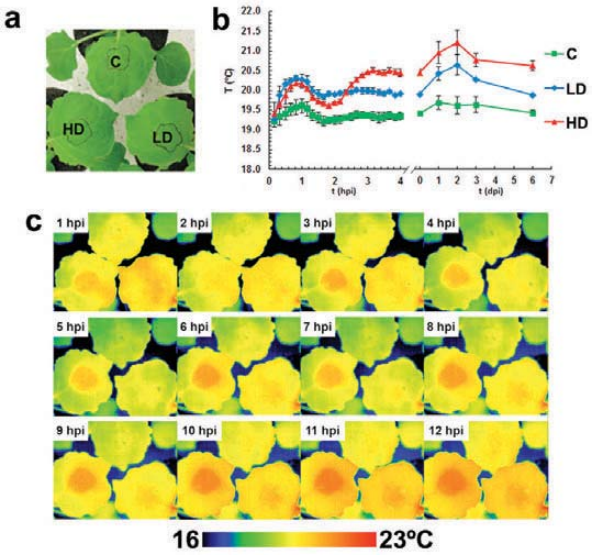


Figura 5. Imágenes de la evolución en el tiempo de la temperatura foliar de *Nicotiana benthamiana* infectada con diferentes concentraciones de la bacteria *Dickeya dadantii*: **LD** (baja dosis, equivalente a 10^4 ufc · mL^{-1}) y **HD** (alta dosis: 10^6 ufc · mL^{-1}); así como de sus respectivos controles **(C)** inoculados con $MgCl_2$ 10 mM. **(a)** Imágenes RGB de las tres hojas analizadas, mostrando el área inoculada. **(b)** Evolución de la temperatura de la zona infiltrada a diferentes horas y días postinoculación (hpi y dpi, respectivamente). **(c)** Imágenes de las mismas hojas mostradas en el panel (a) a diferentes hpi. La escala de falsos colores que acompaña a la imagen muestra la temperatura foliar en ºC [Modificada con permiso a partir de Pérez-Bueno *et al.* (2016)].

MCFI y Chl-FI para alimentar diversos algoritmos[7,8,9]. Estos modelos se entrenaron en diferentes áreas de la hoja inoculada o en hoja completa y se ensayó su capacidad de clasificar nuevas muestras como sanas o enfermas.

USO FUTURO DE SENSORES ÓPTICOS EN AGRICULTURA DE PRECISIÓN Y FENOTIPADO VEGETAL

Los sensores ópticos disponibles en la actualidad ofrecen múltiples aplicaciones en la agricultura de precisión y el fenotipado vegetal, para la detección automática y temprana de interacciones planta-patógeno[3]. El trabajo puede realizarse a distintas escalas: célula, hoja, planta, parcela experimental o ecosistema. Es posible obtener una gran diversidad de parámetros depen-

La combinación de sensores permite incrementar el número de procesos vegetales que pueden ser analizados simultáneamente

diendo del sensor usado y de la plataforma desde la que se trabaje (microscopio, pequeños robots que se desplazan en la zona a analizar, plataformas automatizadas de alto rendimiento, vehículos variados, drones, aviones y satélites). Entre los sensores de elección se encuentran las cámaras digitales para la obtención de imágenes RGB (sigla en inglés de "*red, green*, blue", en español "rojo, verde y azul"), los sensores 3D, cámaras multi e hiperespectrales, cámaras de infrarrojos y diversos sistemas para la obtención de imágenes de fluorescencia roja o verde-azul. La combinación de sensores permite incrementar el número de procesos vegetales que pueden ser analizados simultáneamente, lo que resulta un enfoque muy prometedor para identificar "marcas de identidad" para un patógeno concreto y su diagnóstico temprano.

Los sensores termales se están usando para detectar cambios tempranos en la temperatura de los cultivos por la presencia de patógenos foliares o radiculares. Las limitaciones de las mediciones de fotosíntesis en campo mediante Chl-FI están siendo resueltas mediante, entre otros métodos, el empleo de láseres como inductores de la emisión de fluorescencia. En cambio, y hasta la fecha, la MCFI es un reto tecnológico sin solventar debido al tipo de luz de excitación usada.

Para la agricultura de precisión del futuro será de gran utilidad el uso en campo e invernadero de estas herramientas de imagen, que evaluarán la gravedad, incidencia y progresión de las enfermedades vegetales y permitirán tomar medidas de protección en el momento adecuado. Los sensores ópticos pueden también ser implementados en programas de fenotipado vegetal para valorar los niveles de susceptibilidad o resistencia a patógenos de distintos genotipos vegetales y sus mecanismos de defensa frente a ellos.

Para la agricultura de precisión del futuro será de gran utilidad el uso en campo e invernadero de estas herramientas de imagen

Agradecimientos

Estos trabajos fueron posibles gracias a proyectos subvencionados por CICE-Junta de Andalucía (P10-AGR-5797 y P12-AGR-0370), AGL2017-82492-C2-1-R y AGL2017-83368-C2-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)-FEDER y RECUPERA 2020/20134R060 (MINECO-CSIC, FEDER), cofinanciados con Fondos FEDER.

REFERENCIAS

[1] Buschmann, C., y Lichtenthaler, H. K. (1998). "Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants". *Journal of Plant Physiology* **152**: 297-314.

[2] Granum, E. *et al.* (2015). "Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging". *European Journal of Plant Pathology* **142**: 625-632.

[3] Mahlein, A.-K. (2016). "Plant disease detection by imaging sensors – Parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping". *Plant Disease* **100**: 241-251.

[4] Montero, R. *et al.* (2016). "Alterations in primary and secondary metabolism in *Vitis vinifera* 'Malvasia de Banyalbufar' upon infection with Grapevine Leafroll associated Virus 3 (GLRaV-3)". *Physiologia Plantarum* **157**: 442-452.

[5] Pérez-Bueno, M. L. *et al.* (2016). "Temporal and spatial resolution of activated plant defense responses in leaves of *Nicotiana benthamiana* infected with *Dickeya dadantii*". *Frontiers in Plant Science* **6**: 1209.

[6] Pérez-Bueno, M. L. *et al.* (2006). "Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus". *Photosynthesis Research* **90**: 111-123.

[7] Pérez-Bueno, M. L. *et al.* (2016). "Multicolor fluorescence imaging as a candidate for disease detection in plant phenotyping". *Frontiers in Plant Science* **7**: 1790.

[8] Pineda, M., Pérez-Bueno, M. L., y Barón, M. (2018). "Detection of bacterial infection in melon plants by classification methods based on imaging data". *Frontiers in Plant Science* **9**: 164.

[9] Pineda, M., *et al.* (2008). "Multicolor fluorescence imaging of leaves –a useful tool for visualizing systemic viral infections in plants". *Photochemistry and Photobiology* **84**: 1048-1060.

[10] Rodríguez-Moreno, L. *et al.* (2008). "Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging". *Photosynthesis Research* **96**: 27-35.

Herramientas ómicas como aliadas en el control de enfermedades del olivar

Carmen Gómez-Lama Cabanás y Jesús Mercado-Blanco

[1]Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Córdoba

Carmen Gómez-Lama Cabanás es doctora en Biología por la Universidad de Córdoba. En la actualidad es investigadora posdoctoral en el departamento de protección de cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) del CSIC, en Córdoba. Ha trabajado durante varios años en el control biológico de la verticilosis del olivo y su actual línea de investigación es la identificación, caracterización y utilización de microorganismos endófitos de banano promotores del crecimiento vegetal y de agentes de control biológico frente a mal de Panamá del banano causado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*.

Jesús Mercado Blanco es doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada. Actualmente es investigador científico adscrito al Instituto de Agricultura

Introducción

Desde los primeros estadios del proceso de infección por parte de un fitopatógeno se ponen en marcha una serie de complejos mecanismos tanto en la planta como en el microorganismo invasor. El diálogo genético-molecular establecido entre ellos que, entre otras rutas, involucra a complicadas vías hormonales de señalización, puede dar lugar a profundas alteraciones a nivel celular e histológico en el huésped, no sólo a nivel local sino, en ocasiones, también de carácter sistémico, así como a modificar el comportamiento del agente patógeno durante su fase parasítica. Estos cambios, que incluyen variación en la expresión de genes y represión o activación de diversas rutas metabólicas, suponen, entre otras consecuencias, la acumulación de metabolitos con funciones variables no sólo en la planta huésped, sino también en el patógeno y en el conjunto de microrganismos que con ellos interaccionan. Ante la complejidad de estos procesos, y teniendo en cuenta la ingente cantidad de datos que se obtienen a través de las poderosas metodologías que hoy se aplican en su estudio, se hace imprescindible disponer de herramientas bioinformáticas avanzadas que permitan integrar y analizar toda esta información. Estas metodologías se engloban bajo la denominación de "ómicas", y están resultando de una enorme utilidad para una mejor compresión de los procesos biológicos desde una perspectiva global. El término "ómica" engloba a un conjunto de tecnologías empleadas para estudiar la función y las relaciones de varios tipos de (macro)moléculas de un organismo (ácidos nucleicos, proteínas o compuestos químicos de diversa naturaleza), así como de los cambios que, de forma global, tienen lugar al interaccionar con otros organismos o con el ambiente. Dependiendo del tipo de (macro)molécula que se analice y de la información biológica que queramos obtener, podemos distinguir a la genómica y metagenómica (ADN), transcriptómica y metatranscriptómica (ARN), proteómica (proteínas), metabolómica (metabolitos) y microbiómica (comunidades microbianas). Por lo tanto, las ómicas se ocupan de analizar genes, proteínas, compuestos químicos y microorganismos desde una perspectiva global, lo que supone un importante paso adelante en el estudio y comprensión de las interacciones planta-microorganismo utilizando un enfoque holístico. Así, por ejemplo, se han empleado las ómicas para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de respuesta de las plantas ante el ataque de virus, hongos o bacterias. En el área de estudio que nos ocupa, la genómica y la transcriptómica han evolucionado a mayor velocidad, ofreciendo una ingente cantidad de información en comparación con los estudios proteómicos y metabolómicos, hoy por hoy más escasos debido, en parte, a una mayor dificultad en su ejecución. A pesar de sus limitaciones estas tecnologías permiten, por ejemplo, la identificación a una escala sin precedentes de genes, proteínas o rutas metabólicas involucradas en la resistencia a enfermedades, patogenicidad, biocon-

Sostenible (IAS) del CSIC, en Córdoba. Sus líneas de investigación se centran en el estudio de las bases moleculares de interacciones tripartitas planta/agente de control biológico/agente fitopatógeno mediante aproximaciones moleculares y ómicas, la caracterización de bacterias endófitas beneficiosas y los mecanismos implicados en la resistencia/tolerancia natural al patógeno y de resistencia inducida por microorganismos.

trol, etc., y se postulan como herramientas útiles para el futuro desarrollo de nuevas variedades más resistentes a enfermedades, la promoción del crecimiento vegetal, el control más eficiente de patógenos, o la reducción en el uso de fertilizantes y plaguicidas químicos.

Este artículo repasa de forma breve algunas de las enfermedades más relevantes que afectan al olivar y cómo la utilización de aproximaciones metodológicas de base ómica nos están ayudando a comprender, de una forma más profunda y global (holística), los mecanismos genético-moleculares íntimos que gobiernan estas interacciones patogénicas. El conocimiento a nivel básico de los procesos implicados servirá, sin lugar a dudas, para desarrollar nuevas, potentes y más eficaces herramientas de control.

ENFERMEDADES RELEVANTES EN EL CULTIVO DEL OLIVO

El olivo (*Olea europea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) es uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo, particularmente de la cuenca mediterránea donde constituye una parte esencial de su economía, historia y cultura, conformando a lo largo de los siglos uno de los agroecosistemas más notables y estables que puedan encontrarse sobre la superficie del planeta. El olivo, como cualquier especie cultivada, es susceptible al ataque de numerosos patógenos cuya incidencia y relevancia dependen de una variedad de factores asociados a situaciones climáticas, ambientales, pedológicas, etc. presentes en una determinada área geográfica, provocando pérdidas considerables, incluso la muerte del árbol, y comprometiendo gravemente la viabilidad de las plantaciones en algunos casos. Condiciones climáticas cambiantes y especialmente favorables para el desarrollo de algunas enfermedades, manejos inadecuados del cultivo, pérdida de diversidad, o cambios introducidos en la moderna olivicultura son, entre otros, algunos de los factores que eventualmente pueden agravar los problemas fitopatológicos tradicionales del olivar, o facilitar la emergencia de nuevas enfermedades, poniendo en riesgo el equilibrio alcanzado secularmente en este agroecosistema. La nueva olivicultura intensiva trae consigo una mayor uniformidad varietal y un sistema más forzado de cultivo (riego, fertilizantes, densidades mayores, tratamientos, etc.), lo que conlleva una mayor dificultad para el control de plagas y enfermedades. Entre las enfermedades más relevantes o amenazadoras del olivar destacan determinadas micosis que afectan a partes aéreas del árbol (repilos y antracnosis), micosis vasculares (verticilosis) y radicales (podredumbre de raíces por *Phytophthora* spp.), y bacteriosis como la tuberculosis y, de alarmante y reciente aparición, el síndrome del decaimiento rápido del olivo. Ofrecemos a continuación un breve sumario de algunas de estas patologías, en concreto aquellas en las que ya se han utilizado abordajes ómicos. Sobre estas enfermedades, así como de otras que afectan al olivar con incidencia e importancia variable, el lector interesado encontrará excelentes monografías y trabajos de investigación en los habituales repositorios científicos.

Entre las enfermedades más relevantes o amenazadoras del olivar destacan determinadas micosis y bacteriosis

Verticilosis

La verticilosis del olivo (VO) es una enfermedad causada por el hongo hemibiotrofo de suelo, *Verticillium dahliae* Kleb., ampliamente distribuido por la cuenca mediterránea y que afecta a un gran número de especies leñosas y herbáceas. Generalmente, esta enfermedad se manifiesta por dos síndromes denominados apoplejía (clorosis y pérdida de rigidez en las hojas) y decaimiento lento (necrosis de inflorescencias, momificación de los frutos, defoliación de hojas verdes, que pueden darse conjuntamente) [Figura 1]. Es una de las enfermedades más devastadoras en España, especialmente en Andalucía, donde los aislados más virulentos del patógeno

La verticilosis del olivo es una de las enfermedades más devastadoras en España, especialmente en Andalucía

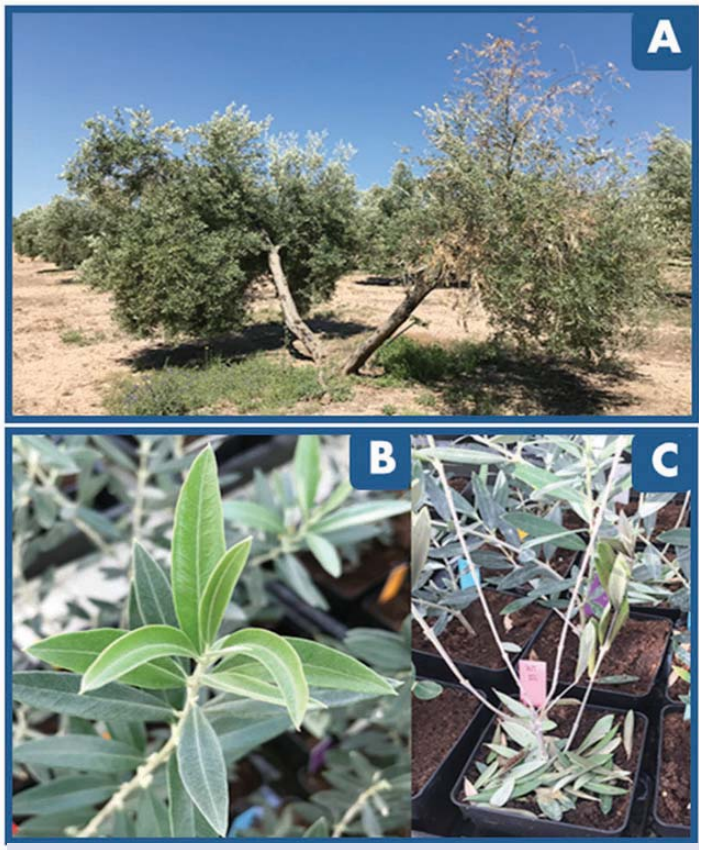


Figura 1. Síntomas causados en olivo por ataques de *Verticillium dahliae*. **(A)** Característica afectación sectorial en un olivo Picual en condiciones de campo; Deformación y clorosis en hojas apicales **(B)** y defoliación masiva de hojas verdes **(C)** observadas en plantones de la variedad Picual tras inoculación artificial con un aislado del patotipo defoliante de *V. dahliae* en condiciones controladas de invernadero (*Fotografía* tomada por Jesús Mercado-Blanco).

(patotipo defoliante, D) pueden causar elevada mortalidad en plantaciones comerciales, situación que en algunas zonas llega a ser alarmante. Ante la imposibilidad de un tratamiento efectivo contra la VO se recomienda un manejo integrado de la enfermedad basado fundamentalmente en la aplicación de medidas de control preventivas. Para una revisión de la enfermedad y su control consultar, por ejemplo, López-Escudero y Mercado-Blanco (2011)[20].

La antracnosis del olivo, conocida comúnmente como "aceituna jabonosa", es causada por diversas especies de hongos del género *Colletotrichum*

Antracnosis

La antracnosis del olivo, conocida comúnmente como "aceituna jabonosa", es causada por diversas especies de hongos del género *Colletotrichum* pertenecientes a los complejos *Colletotrichum acutatum sensu lato (s.l.)* Guerber & Correl, y *Colletotrichum gloeosporioides s.l.* (Ston.) Spauld & Schrenk. Situaciones de humedad alta favorecen los ataques del patógeno, afectando en las primeras fases sólo a los frutos, los cuales muestran características manchas redondas necróticas de color marrón. En estadios posteriores, la enfermedad evoluciona provocando marchitez y secado de hojas y ramas. Cuando la humedad es elevada se forma sobre las lesiones necróticas una sustancia gelatinosa y anaranjada que alberga gran cantidad de esporas, síntoma por el que recibe el nombre vulgar antes mencionado. Existen pocas medidas de control efectivas frente a la enfermedad, por lo que la integración de diferentes acciones de control, incluyendo métodos culturales, utilización de variedades resistentes y control químico es lo más recomendado. Sobre esta enfermedad sugerimos consultar, entre otros trabajos, a Moral *et al.* (2017)[25].

Repilo

El repilo es la enfermedad más importante que afecta a órganos aéreos en el olivar. El agente causal de esta enfermedad es el hongo hifomiceto *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes (=*Fusicladium oleaginum*=*Cycloconium oleaginum*). Los síntomas más característicos son la aparición de unas manchas circulares o anulares que se observan principalmente en el haz foliar, de tamaño variable y color oscuro debido al desarrollo de las esporas [Figura 2]. En infecciones muy avanzadas y severas

Los tumores son un reservorio de bacterias que pueden dar lugar a infecciones secundarias a través de exudados

Figura 2. Síntoma foliar característico de olivo afectado por *Spilocaea oleagina* (*Fotografía* tomada por Jesús Mercado-Blanco).

se observa gran defoliación. Como en los casos anteriores, no existe una medida de control individual efectiva y, por lo tanto, se recomienda una estrategia de manejo integrado de la enfermedad. El uso de variedades resistentes y fungicidas y protectores orgánicos es de gran ayuda y, ya que la presencia de agua libre sobre las hojas constituye un factor determinante para que se produzca la infección, se recomiendan también aquellas medidas culturales que favorezcan la ventilación de los árboles, como pueden ser las podas selectivas o los marcos de plantación que eviten copas densas o muy juntas. Para un lectura más detallada sobre esta enfermedad (y de los repilos en general) y su control, consultar Trapero y Roca (2004)[35].

Tuberculosis

La tuberculosis del olivo (TO) está causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Smith. (Psv), que tiene como huésped principal al olivo, aunque puede también afectar a otras leñosas. La infección del patógeno se produce a través de heridas en la planta, causando eventualmente la formación de verrugas o tumores en ramas, tallos, brotes y, de forma menos frecuente, en hojas y frutos [Figura 3]. Estos tumores debilitan al árbol, provocando pérdida de productividad y disminución en la calidad del aceite. Los tumores son un reservorio de bacterias que pueden dar lugar a infecciones secundarias a través de exudados o incluso por movimiento de aquellas a través de los haces vasculares. Las infecciones TO son muy difíciles de combatir y, al igual que en las patologías ya referidas, el control efectivo de la enfermedad requiere de una estrategia de manejo integrado de la misma. Una revisión exhaustiva sobre la enfermedad y su control puede encontrarse en Ramos *et al*. (2012)[29].

Decaimiento rápido del olivo

El síndrome del decaimiento rápido del olivo (OQDS, del inglés *Olive Quick Decline Sindrome*) es una enfermedad causada por la bacteria *Xylella fastidiosa* Wells., endémica del continente americano, y catalogada como organismo de cuarentena en la UE. En 2013 se detectó por primera vez afectando al olivo en Europa, en la región italiana de Apulia, situación que ha generado gran alarma. Esta bacteria se propaga utilizando como vectores insectos cicadélidos y cercópidos. *Philaenus spumarius* L., muy frecuente, polífago y abundante en el olivar, es responsable de la transmisión de la bacteria en Apulia. Este patógeno tiene un espectro de huéspedes muy amplio

Xylella fastidiosa se propaga utilizando como vectores insectos cicadélidos y cercópidos y tiene un espectro de huéspedes muy amplio

Figura 3. Tumores causados por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en olivo (*Fotografía* tomada por Jesús Mercado-Blanco).

Actualmente no hay ningún tratamiento efectivo contra *X. fastidiosa* por lo que el agricultor se debe enfrentar a eliminar todos los olivos en un radio de 100 metros desde el foco detectado

y los síntomas de la enfermedad varían de unos a otros. En olivos infectados aparece marchitez y secado de hojas, síntomas que pueden afectar a ramas completas e incluso a árboles enteros. El oscurecimiento de los vasos del xilema es otro síntoma característico. Actualmente no hay ningún tratamiento efectivo contra *X. fastidiosa*, por lo que el agricultor se debe enfrentar a la drástica solución de eliminar todos los olivos en un radio de 100 metros desde el foco detectado. Para una mayor información acerca de la situación actual de la enfermedad, sugerimos la lectura de Landa *et al*. (2017)[18].

ÓMICAS APLICADAS AL CONTROL DE ENFERMEDADES DEL OLIVO

Ofrecemos a continuación un breve repaso a trabajos dirigidos a profundizar en el conocimiento y control de las enfermedades citadas en el apartado anterior mediante el empleo de diferentes aproximaciones ómicas. Esta exposición no aborda los fundamentos sobre las metodologías utilizadas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica o microbiómica), sino ejemplos ilustrativos aplicados específicamente al estudio de determinadas patologías que afectan al olivar. Se remite a los lectores interesados en profundizar sobre los fundamentos mecanísticos de las diferentes metodologías ómicas a la abundante literatura recopilada en los repositorios científicos habituales. En la Figura 4 se muestra un esquema-resumen de los estudios ómicos más notables llevados a cabo hasta la fecha para cinco de las enfermedades más relevantes que afectan al olivar.

Genómica

La genómica comprende el estudio de los genomas, sus funciones y las interacciones entre ellos o con factores ambientales. El genoma es el conjunto de todo el ADN

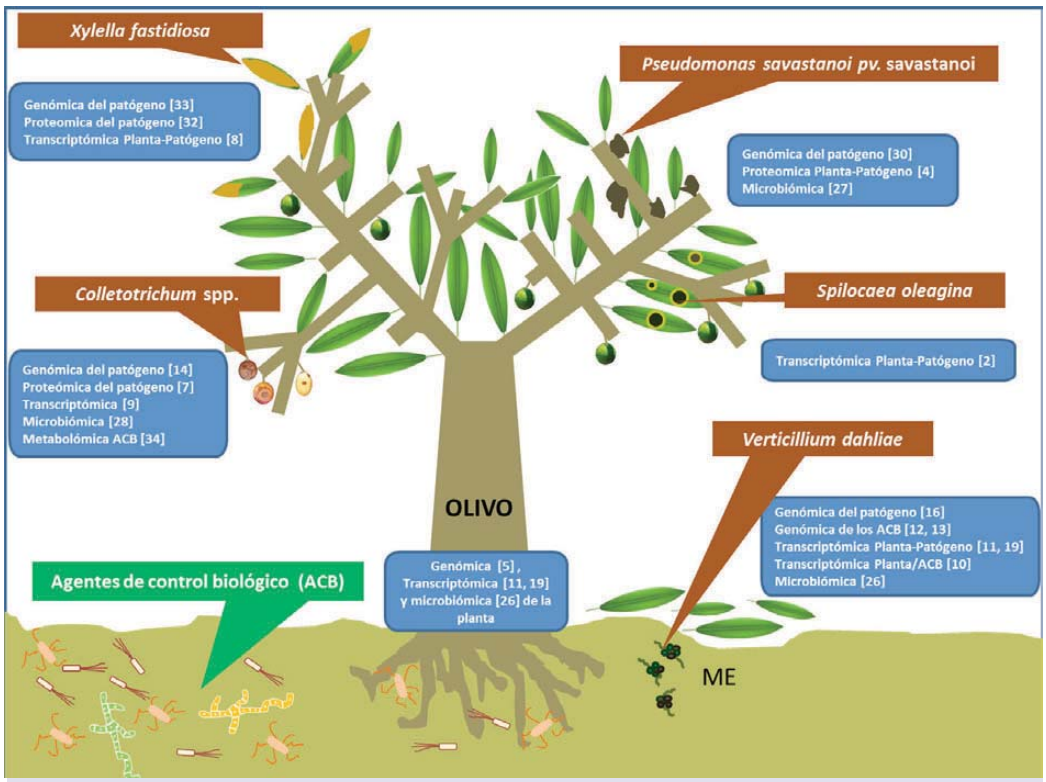


Figura 4. Esquema en el que se compendian los estudios más relevantes sobre el control de algunas enfermedades del olivar mediante el empleo de aproximaciones ómicas. Los números entre corchetes corresponden a estudios representativos realizados para las cinco enfermedades citadas y que aparecen en el listado de referencias. ME: microesclerocios (*Figura* elaborada por Carmen Gómez-Lama).

Gracias a las tecnologías NGS el genoma del olivo ya está disponible en las bases de datos

Disponemos de una amplia colección de genomas de microorganismos beneficiosos constatados como ACB de enfermedades del olivo

La transcriptómica se centra en el estudio de la expresión de los genes, a nivel del ARN, ofreciendo una visión global del genoma

presente en un organismo, donde reside la información necesaria para construirlo y mantenerlo a lo largo de su ciclo vital. Por tanto, la genómica aborda el análisis global de todas las secuencias de los genes de un ser vivo, así como de su función potencial. Gracias a las tecnologías de secuenciación masiva de última generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*), el genoma del olivo, como el de otras muchas especies, ya está disponible en las bases de datos. Hasta la fecha han sido secuenciados los genomas de *O. europaea* var. *sylvestris*[37] y *O. europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea* (cv. Farga)[5]. Así mismo, los genomas cloroplastídicos de siete linajes pertenecientes a tres subespecies de olivo (*europaea, marocanna* y *cuspidata*) han sido secuenciados[3]. Esto ha permitido un gran avance en el conocimiento sobre la evolución de las distintas especies de olivo. Además, disponer de estos genomas supone contar con una poderosa herramienta para la identificación de genes asociados con importantes caracteres para la mejora del cultivo, incluyendo aquellos relacionados con la resistencia a enfermedades. Por otra parte, también se dispone de los genomas de algunos de los patógenos de olivo que hemos mencionado en los apartados anteriores: los aislados JR2[6] y VdLs[16] de *V. dahliae*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (cepa NCPPB 3335)[30], y 16 cepas diferentes de la bacteria causante del OQDS, *X. fastidiosa*. No obstante, obtener un genoma completo (cerrado) todavía constituye un difícil reto, aunque se dispone de una gran cantidad de "borradores" de genomas que también resultan de indudable utilidad para dar una visión global de los mismos, así como de la presencia o ausencia de determinadas rutas metabólicas de interés desde el punto de vista fitopatológico de los microorganismos secuenciados. Por ejemplo, están disponibles las secuencias parciales de los genomas de otros patógenos de olivo como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* (agentes causales de la antracnosis) o *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora palmivora* (implicados en podredumbre radical). Los estudios de genómica estructural no se limitan al huésped y a los agentes causantes de enfermedad. Efectivamente, hoy disponemos de una amplia colección de genomas de microorganismos beneficiosos que han sido constatados como agentes de control biológico (ACB) de enfermedades del olivo. Por ejemplo, nuestro grupo ha secuenciado los genomas de diversos ACB efectivos contra la verticilosis pertenecientes a los géneros *Pseudomonas, Bacillus* y *Paenibacillus*[12,13,22], lo que ha permitido obtener información de interés sobre características beneficiosas de estos microorganismos relacionadas con procesos de colonización de la planta, promoción del crecimiento vegetal y biocontrol.

Transcriptómica

La presencia de un gen en un genoma no necesariamente implica que dicho gen se esté expresando y, por tanto, cumpliendo su función. La transcriptómica (o genómica funcional) surge así para complementar la información obtenida a partir de la genómica estructural. La transcriptómica se centra en el estudio de la expresión de los genes, esto es, a nivel del ARN, ofreciendo una visión global del genoma que se expresa y permitiendo elucidar los mecanismos moleculares implicados en un proceso biológico concreto en un momento dado. Así pues, el transcriptoma es el conjunto de todos los genes expresados (o transcritos) de una célula, tejido u órgano en una etapa específica de su desarrollo o bajo una determinada condición.

Una de las metodologías transcriptómicas más potentes es la secuenciación de alto rendimiento del ARN mensajero (RNA-seq) que, en el caso de la interacción olivo-*V. dahliae*, ha sido empleada para estudiar de forma comparativa los transcriptomas de las raíces de los cultivares Picual (susceptible a VO) y Frantoio (tolerante a VO) durante los momentos iniciales de la interacción con el patotipo D de *V. dahliae*[15,19]. También ha servido para ana-

Entre los genes expresados diferencialmente en los transcriptomas de los cultivares investigados se encontraron genes relacionados con patogénesis

Los estudios proteómicos pueden estar dirigidos a obtener el proteoma completo del microorganismo, de la planta o de la interacción de ambos en diversas circunstancias

lizar simultáneamente el transcriptoma del patógeno en su interacción con la variedad susceptible[15]. Entre los genes expresados diferencialmente en los transcriptomas de los cultivares investigados se encontraron genes relacionados con patogénesis, como algunos pertenecientes a la familia Bet vI, otro que codifica una proteína *dirigent-like* involucrada en lignificación, y varios relacionados con respuestas a estrés (*BAK1*, *NHL1*, *ROS*, *BAM*)[19]. Un objetivo de estos estudios es comprender la base genética de la tolerancia/susceptibilidad a la VO, conocimiento que puede resultar de interés en programas de mejora destinados a obtener genotipos tolerantes a la enfermedad, para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico del patógeno y para el diseño de nuevas estrategias de manejo integrado de la enfermedad. Con anterioridad a estos trabajos basados en aproximaciones NGS se empleó la técnica denominada *suppression subtractive hybridization* (SSH) para estudiar respuestas transcriptómicas globales (locales y sistémicas) de tejidos de olivo, no sólo en la interacción con *V. dahliae* sino también cuando las raíces son colonizadas por el ACB de la VO *Pseudomonas fluorescens* PICF7. Estos estudios posibilitaron la identificación de más de 300 genes de olivo diferencialmente expresados, en cada una de las interacciones examinadas, entre plantas inoculadas con *V. dahliae* (patotipo D) o la cepa PICF7 y aquellas que no lo habían sido[10,11,31]. En cuanto a otros patosistemas, cabe citar el estudio transcriptómico (RNAseq) comparativo de dos cultivares de olivo con distinta susceptibilidad a *X. fastidiosa*, en el que se identificaron algunos transcritos que podrían ser los responsables de la menor susceptibilidad del cultivar Leccino al OQDS[8]. Hace más de una década se efectuaron estudios transcriptómicos (no basados en técnicas NGS) para estudiar la base molecular de la interacción compatible entre olivo y *S. oleagina*, en este caso empleando la metodología *differential display*[2]. Por último, se efectuó un abordaje de genómica funcional para estudiar la expresión diferencial en dos cultivares de olivo con distinta susceptibilidad a la antracnosis (*C. acutatum*), observándose una mayor expresión de ciertas quinasas potencialmente relacionadas con resistencia a la enfermedad[9]. Estos trabajos, sin embargo, no parecen haber tenido continuidad hasta la fecha.

Proteómica

El estudio de los sistemas vivos a nivel del conjunto global de sus proteínas (proteoma) proporciona una información crucial desde el punto de vista mecanístico ya que, en definitiva, las proteínas son las ejecutoras finales de la mayoría de los procesos biológicos. La proteómica tiene como objetivo estudiar el conjunto de proteínas codificadas por el genoma de un organismo, tejido o célula en unas condiciones ambientales y experimentales concretas. Si bien es de aplicación a todos los sistemas biológicos, en el contexto particular de las interacciones planta-microorganismo los estudios proteómicos pueden estar dirigidos a obtener el proteoma completo del microorganismo, de la planta o de la interacción de ambos en diversas circunstancias (perspectiva holística), un objetivo ambicioso y de alta dificultad. También pueden perseguir obtener información mucho más restringida, como determinar el proteoma de un determinado orgánulo previamente purificado, efectuar proteómica diferencial con el fin de identificar las proteínas que se están específicamente expresando o que lo estén haciendo en una cantidad muy diferente o en un estado u otro de la célula. La proteómica diferencial en nuestra área de estudio también se ha aplicado en la búsqueda de factores de virulencia, comparando el proteoma del organismo patógeno con el de un mutante avirulento del mismo. Los estudios proteómicos pueden basarse en gel (electroforesis bidimensional, aislamiento de la mancha proteica e identificación de la proteína

La proteómica diferencial también se ha aplicado en la búsqueda de factores de virulencia, comparando el proteoma del organismo patógeno con el de un mutante avirulento del mismo

por espectrofotometría de masas [MS]), o prescindir del mismo (digestión enzimática de la mezcla de proteínas, cromatografía líquida [LC] e identificación de secuencias peptídicas por MS). En el caso del olivar y de los patógenos que lo afectan, los estudios de base proteómica son muy escasos. No obstante podemos citar los trabajos dirigidos a: (i) estudiar los cambios ocurridos en tejidos de olivo como consecuencia de la infección por *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, principalmente para conocer los factores implicados en la patogénesis bacteriana y en la respuesta de la planta a la infección[4]; (ii) identificar proteínas relacionadas con la estructura de la biopelícula generada por X. *fastidiosa*, considerado como su principal mecanismo de patogénesis[32]; o (iii) analizar el proteoma de las conidias de C. *acutatum* para elucidar los mecanismos moleculares del proceso de germinación de este patógeno[7].

Metabolómica

La metabolómica consiste en el estudio del conjunto dinámico de moléculas y elementos químicos de una muestra biológica (metaboloma), ya sean sintetizados *de novo* por el propio (micro)organismo (o por alguno de sus tejidos, órganos, etc.) o incorporados desde el exterior bajo unas condiciones ambientales concretas. Esta ómica analiza de una forma global la composición cualitativa y cuantitativa de un metaboloma dado, así como los factores que lo afectan. Por otra parte, ofrece una visión más realista de la función de los genes ya que el metaboloma es el producto final de la expresión génica, lo que le confiere una ventaja añadida respecto a otras ómicas. La coevolución entre plantas y microorganismos (beneficiosos, neutrales o patógenos) ha dado lugar a una compleja red de interacciones tróficas que determinan la composición y dinámica de los metabolomas del huésped y de sus comunidades microbianas. Por una parte, la planta constituye una fuente de nutrientes para los microorganismos con ella asociados. Por otra, estas interacciones dan lugar a diferentes reacciones en el huésped, como, por ejemplo, respuestas de defensa frente al ataque de patógenos o la capacidad de obtener metabolitos que aquél no es capaz de producir y que le aportan beneficios de diversa índole.

La determinación de los perfiles metabólicos incluye la detección, cuantificación y, cuando es posible, la identificación de metabolitos

La metabolómica puede abordar dos aspectos diferentes: la "huella digital" (*fingerprinting*) y los perfiles metabolómicos. Obtener la "huella digital" significa detectar todos los metabolitos de una muestra sin identificarlos, empleando técnicas como la resonancia magnética nuclear (NMR), la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT)-IR, la espectrometría de Raman o la ionización por *electrospray* (ESI-MS). La determinación de los perfiles metabólicos, en cambio, incluye la detección, cuantificación y, cuando es posible, la identificación de metabolitos mediante cromatografía de gases (GC) o LC junto con MS. La metabolómica aplicada al estudio de las interacciones planta-patógeno-organismo beneficioso puede ayudar en la identificación de metabolitos con efectos positivos para el huésped (p. ej., moléculas activadoras de su sistema defensivo o promotoras de su crecimiento), lo que podría traducirse en el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas dirigidas a incrementar el rendimiento de los cultivos. Los metabolomas (y el de las plantas no es una excepción) contienen una enorme diversidad de moléculas biológicas, muchas de ellas con estructuras muy complejas. Esto quizás explique por qué esta metodología no se emplee con la frecuencia que se hace con otras ómicas. A pesar de la complejidad del metaboloma de las plantas (aproximadamente 200 000 metabolitos) y de la escasez de bases de datos públicas, se dispone de algunos estudios metabolómicos de especies vegetales. Sin embargo, en el caso particular de estudios metabolómicos sobre interacciones planta-microorganismo, los trabajos disponibles hasta la fecha

En el caso del olivo, los únicos estudios metabolómicos realizados por el momento se han dirigido a conocer las diferencias metabólicas entre distintos tejidos y su posible valor nutricional

son muy escasos. En el caso del olivo, los únicos estudios metabolómicos realizados por el momento se han dirigido a conocer las diferencias metabólicas entre distintos tejidos y su posible valor nutricional. También se dispone de algún estudio sobre ACB, que si bien no se han llevado a cabo en el contexto del control biológico de enfermedades de olivar, sí conciernen a ACB que han demostrado eficacia frente a determinados patógenos que lo afectan, lo que estimula futuras investigaciones en este sentido destinadas a identificar modos de acción y moléculas implicadas en la actividad de biocontrol. A modo de ejemplo cabe citar uno de los ACB más estudiados desde una perspectiva metabolómica: *Trichoderma spp*. Es sabido que algunas de sus especies producen metabolitos bioactivos que ya son comercializados como bioplaguicidas y biofertilizantes[21,34]. Además, algunos de los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. activan respuestas de resistencia sistémica en la planta causando cambios relevantes en su metabolismo[38]. Por lo que respecta al objeto de este artículo mencionar que algunas de sus cepas son efectivas frente a la VO y antracnosis, por lo que abordar estudios centradas en las mismas sería de indudable interés.

Microbiómica

Los componentes beneficiosos del fitomicrobioma contribuyen a proteger a la planta de estreses a/bióticos así como a mejorar su crecimiento y desarrollo

Las plantas viven en íntima asociación con una compleja diversidad de comunidades microbianas (fitomicrobioma) con las que interactúan continuamente. El conocimiento de la estructura, actividad y funcionamiento de dichas comunidades puede suponer, además de un enorme desafío en el campo de la interacción planta-microorganismo, una de las más importantes fuentes de innovación y mejora en la agricultura de las próximas décadas[24]. Este microbioma se compone de bacterias, hongos y virus neutrales, beneficiosos y patógenos, que pueden localizarse en el interior de los tejidos (endófitos), las superficies externas (epífitos), o en la rizosfera[36]. Tal es la relevancia de este microbioma que llega a hablarse del metagenoma de la planta, que incluye tanto el genoma vegetal como el de su microbioma asociado, y que algunos autores han denominado como el segundo genoma de la planta. Los componentes beneficiosos del fitomicrobioma, interactuando con la planta a lo largo de toda su vida, contribuyen a protegerla de estreses a/bióticos así como a mejorar su crecimiento y desarrollo[17]. Además, los microbiomas asociados a plantas son reservorios de nuevos ACB que pueden ser usados tanto de forma individual como en consorcios y, en el caso de colonizar de forma endófita, tienen la ventaja de estar adaptados al nicho ecológico en el que van a ser usados[23]. Por lo tanto, los factores (ambientales, genéticos, agronómicos, etc.) que afecten a la estructura y composición del microbioma vegetal pueden influir decisivamente en la eficacia de los métodos de control de enfermedades de las plantas, ya que las alteraciones introducidas por dichos factores pueden provocar desequilibrios (disbiosis) que favorezcan el ataque de nuevos patógenos (o variantes virulentas de patógenos tradicionales), o el desplazamiento de microorganismos beneficiosos presentes en los fitomicrobiomas naturales.

Las aproximaciones basadas en NGS son muy útiles para estudiar la estructura, composición y diversidad de los microbiomas asociados a plantas, ofreciendo grandes ventajas frente a los métodos tradicionales dependientes de cultivo[24]. La metodología más usada es el *amplicon sequencing* (la secuención de librerías de amplicones de ADN o de ARN), seguida de lejos de la metagenómica y la metatranscriptómica. La metagenómica se ocupa de la secuenciación del ADN total extraído de todas las formas de vida, cultivables o no, presentes en un hábitat concreto. Por último, la metatranscriptómica permite identificar y caracterizar rutas metabólicas activas de los microorganismos presentes en dicho

La endosfera y rizosfera de olivos silvestres del sur de España albergan un importante reservorio de antagonistas de *V. dahliae*

hábitat, mejorando así la comprensión de la función y del papel que tienen cuando interaccionan, en el caso que nos ocupa, con la planta. En la actualidad, sin embargo, son aún escasos los estudios basados en *amplicon sequencing* para conocer la influencia que un determinado fitopatógeno o ACB tiene sobre el microbioma de la planta. En el caso del olivar, y previo a la implementación de aproximaciones NGS, Aranda *et al*. (2011)[1] analizaron las comunidades bacterianas cultivables presentes en la endosfera y rizosfera de olivos silvestres del sur de España, concluyendo que ambos nichos albergan un importante reservorio de antagonistas de *V. dahliae*, muchos de los cuales pertenecían al género *Bacillus*. Posteriormente, y ya utilizando la estrategia del *amplicon sequencing* (16S del rRNA), se comparó el bacterioma endófito presente en hojas de olivo de diez cultivares de olivo originarios de la cuenca mediterránea pero cultivados en un mismo suelo en España, y de nueve genotipos de olivo silvestre crecidos en su hábitat natural (Grecia, Madeira o Chipre)[26]. El estudio reveló que los patrones de distribución bacteriana eran congruentes con la procedencia (oriental u occidental) de los genotipos de olivo dentro de la cuenca del Mediterráneo, existiendo una fuerte correlación entre genotipo y comunidades bacterianas endófitas. También se encontró que en los tejidos analizados predominaban representantes de Archaea. Por otra parte, entre las bacterias presentes destacó como potencial ACB de la VO *Bacillus amyloliquefaciens*. Análisis similares han servido para estudiar la diversidad fúngica en los cultivares Madural (susceptible a la antracnosis) y Verdeal Transmontana (moderadamente tolerante a dicha enfermedad), observándose igualmente diferencias en la composición de las comunidades fúngicas presentes en ambas variedades[28]. Este trabajo ha aportado información relevante sobre colonizadores naturales de olivo con potencial antagonista frente a la antracnosis. Por último, mediante la amplificación y secuenciación del ARNr 16S se han estudiado las comunidades bacterianas presentes en los tumores causados por *P. savastanoi*[27]. Este trabajo reveló que el 90 % de las bacterias encontradas en los tumores eran gammaproteobacterias, en su mayoría pertenecientes a los órdenes *Pseudomonadales* (representando Psv el 50 % de la carga bacteriana del tumor) y *Enterobacteriales*. A pesar del potencial de la metagenómica y metatranscriptómica, su aplicación en el campo del control de enfermedades es aún muy incipiente y, en el caso del olivar, no nos consta hayan sido utilizadas aún.

Los estudios efectuados hasta la fecha están aportando una ingente cantidad de datos sobre la biología del olivo y la de algunos de sus patógenos

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las estrategias ómicas basadas en tecnologías NGS no han sido utilizadas aún con todo el potencial que ofrecen para profundizar en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de las enfermedades que afectan al olivar y, eventualmente, para ofrecer nuevas herramientas para su control efectivo. No obstante, los estudios efectuados hasta la fecha están aportando una ingente cantidad de datos sobre la biología del olivo y la de algunos de sus patógenos, sobre sus interacciones y, en menor medida, sobre la microbiota asociada a este emblemático árbol. Quizás la propia complejidad (anatomía, tamaño, longevidad, etc.) de esta especie, al igual que sucede con otras leñosas, ha retrasado la implementación de estas poderosas metodologías comparado con el uso que de ellas se ha hecho en cultivos herbáceas o en especies utilizadas como modelo. Pero hoy disponemos del genoma del olivo y de algunos de sus más amenazadores patógenos. También de diversos transcriptomas en respuesta a una variedad de situaciones e interacciones, así como de algunos proteomas y microbiomas de diferentes tejidos de olivo. Muchas más de estas herramientas estarán disponibles en los próximos años (actualmente están en desarrollo varios proyectos de secuenciación de nuevas

Muchas más de estas herramientas estarán disponibles en los próximos años complementando a los conocimientos adquiridos

variedades de olivo, de diversos patógenos, de agentes de biocontrol y de microbiomas asociados a este cultivo emblemático) y, sin lugar a dudas, complementando a los conocimientos adquiridos a través de aproximaciones metodológicas tradicionales, permitirán el desarrollo de nuevas y más eficaces medidas de control de las patologías aquí citadas, y de otras que aún esperan a ser estudiadas mediante estos enfoques holísticos. Sin embargo, debido al vertiginoso avance que las tecnologías NGS están experimentando, será requisito imprescindible el desarrollo de nuevas y más potentes herramientas bioinformáticas que permitan reducir los tiempos de análisis y facilitar el procesamiento de la gran cantidad de datos generados. No olvidemos que la información obtenida no debe ser el objetivo final, sino la mejora y protección de este cultivo gracias al conocimiento generado con este tipo de aproximaciones.

REFERENCIAS

[1]Aranda, S. *et al.* (2011). "Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp *europaea* var. sylvestris) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*". *Plant Soil* **343**: 329-345.

[2]Benítez, Y. *et al.* (2005). "Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*". *Mol. Plant Pathol.* **6**: 425-438.

[3]Besnard, G. *et al.* (2011). "Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree". *BMC Plant Biology* **11**: 80.

[4]Campos, A. *et al.* (2009). "Identification of bacterial protein markers and enolase as a plant response protein in the infection of *Olea europaea* subsp. *europaea* by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*". *Eur. J. Plant Pathol.* **125**: 603-616.

[5]Cruz, F. *et al.* (2016). "Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*". *Gigascience* **5**: 29.

[6]de Jonge, R. *et al.* (2013). "Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen". *Genome Res.* **23**: 1271-1282.

[7]El-Akhal, M. R. *et al.* (2013). "Proteomic analysis of conidia germination in *Colletotrichum acutatum*". *Arch. Microbiol.* **195**: 227-246.

[8]Giampetruzzi, A. *et al.* (2016). "Transcriptome profiling of two olive cultivars in response to infection by the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*". *BMC Genomics* **17**: 475.

[9]Gomes, S. *et al.* (2010). "An integrated functional genomic approach in the *Olea europaea L.-Collletotrichum acutatum pathosystem*". *J. Biotechnol.* **150**: 503.

[10]Gómez-Lama Cabanás, C. *et al.* (2014). "The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots". *Front. Microbiol.* **5**: 427.

[11]Gómez-Lama Cabanás, C. *et al.* (2015). "Systemic responses in a tolerant olive (*Olea europaea* L.) cultivar upon root colonization by the vascular pathogen *Verticillium dahliae*". *Front. Microbiol.* **6**: 928.

[12]Gómez-Lama Cabanás, C. *et al.* (2018a). "Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the olive (*Olea europea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: From the host roots to the bacterial genomes". *Front. Microbiol.* **9**: 277.

[13]Gómez-Lama Cabanás, C. *et al.* (2018b). "*Bacillales* members from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*". *Agriculture* 8: 90.

[14]Han J. H. *et al.* (2016). "Whole genome sequence and genome annotation of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose in pepper plants in South Korea". *Genom. Data* **8**: 45-46.

[15]Jiménez-Ruiz, J. *et al.* (2017). "Transcriptomic analysis of the *Olea europaea* L. roots during the *Verticillium dahliae* early infection process". *Plant Genome* **10**: 1-15.

[16]Klosterman, S. J. *et al.* (2011) "Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens". *PLoS Pathog.* **7**: e1002137.

[17]Kowalski, K. *et al.* (2015). "Advancing the science of microbial symbiosis to support invasive species management: a case study on Phragmites in the Great Lakes". *Front. Microbiol.* **6**: 95.

[18]Landa, B. B. *et al.* (2017). "*Xyllela fastidiosa*, una amenaza fitosanitaria potencial para la sostenibilidad de la olivicultura española". *Vida Rural*, **430**: 1-24.

[19]Leyva-Pérez, M. D. L. O. *et al.* (2018). "Tolerance of olive (*Olea europaea*) cv Frantoio to *Verticillium dahliae* relies on both basal and pathogen-induced differential transcriptomic responses". *New Phytol.* **217**: 671-686.

[20]López-Escudero, F. J. y Mercado-Blanco, J. (2011). "Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen". *Plant Soil* **344**: 1-50.

[21]Lorito, M. *et al.* (2010). "Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field". *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 395-417.

[22]Martínez-García, P. M. *et al.* (2015). "Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*". *Stand. Genom.* Sci. **10**: 10.

[23]Mercado-Blanco, J. y Lugtenberg. B. J. J. (2014). "Biotechnological applications of bacterial endophytes". *Curr. Biotechnol.* **3**: 60-75.

[24]Mercado-Blanco J. *et al.* (2018). "Belowground Microbiota and the Health of Tree Crops". *Front. Microbiol.* **9**: 1006.

[25]Moral, J. *et al.* (2017). "Variability in Susceptibility to Anthracnose in the World Collection of Olive Cultivars of Cordoba (Spain)". *Front. Plant Sci.* **8**: 1892.

[26]Müller, H. *et al.* (2015). "Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar Bacillus antagonists colonize Mediterranean olive trees". *Front. Microbiol.* **6**: 138.

[27]Passos da Silva, D. *et al.* (2014). "Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease". *Microbiology* **160**: 556-566.

[28]Preto, G. C. R. (2016). "Microbial community of olives and its potential for biological control of olive anthracnose". Thesis Instituto Politécnico de Bragança. Bragança. Portugal.

[29]Ramos, C. *et al.* (2012). "*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot". *Mol. Plant Pathol.* **13**: 998-1009.

[30]Rodríguez-Palenzuela, P. *et al.* (2010). "Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts". *Environ. Microbiol.* **12**: 1604-1620.

[31]Schilirò, E. *et al.* (2012). "Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7". *PLoS ONE* **7**: e48646.

[32]Silva, M. S. *et al.* (2011). "Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*". *Proteome Science* **9**: 58-68.

[33]Simpson, A. J. G. *et al.* (2000). "The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*". *Nature* **406**: 151-157.

[34]Stoppacher, N. *et al.* (2010). "Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS". *J Microbiol Methods.* **81**: 187-193.

[35]Trapero, A y Roca L. F. (2004). "Bases epidemiológicas para el control integrado de los 'Repilos' del olivo". *Phytoma España* **164**: 130-137.

[36]Turner T. R., James E. K., y Poole, P. S. (2013). "The plant microbiome". *Genome Biol.* **14**: 209.

[37]Unver. T. *et al.* (2017). "Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**: E9413–E9422.

[38]Vinale, F. *et al.* (2014). "*Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens". *Open Mycol. J.* **8**: 127-139.

El sistema CRISPR/Cas, un poderoso aliado en la lucha contra los organismos fitopatógenos

Diego López Márquez, Eduardo R. Bejarano y Ana P. Luna

Área de Genética
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga (UMA)
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea
"La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Málaga

Diego López Márquez es licenciado en Biología por la Universidad de Málaga. En la actualidad, se encuentra disfrutando de una beca FPU para la realización de la tesis doctoral, en el IHSM-UMA-CSIC, dentro de la línea de investigación "Interacción planta-patogeno". Su trabajo, esta codirigido por el Dr. Eduardo R. Bejarano y la Dra. Carmen R. Beuzón López, y se centra en comprender el papel que juegan algunos pequeños RNA de plantas (miRNA y phasiRNA) en la respuesta de defensa frente a patógenos, empleando para ello el patosistema compuesto por *A. thaliana-P. syringae*.

Eduardo R. Bejarano es catedrático del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología en la Universidad de Málaga y dirige la línea de investigación "Interacción planta-virus-vector" en

Introducción

En la última década se han desarrollado varios sistemas para la edición génica, todos ellos basados en el uso de proteínas de unión a secuencias específicas de DNA, denominadas nucleasas específicas de secuencia (SSN): (i) las meganucleasas, (ii) las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs, *Zinc-finger nucleases*), (iii) las nucleasas sintéticas (TALENs, *Transcription-activator-like effector nucleases*) y (iv) las proteínas tipo Cas y sus derivados[1].

Los tres primeros grupos se basan en el diseño de proteínas para reconocer diferentes secuencias de DNA mediante la modificación "a la carta" de la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas. Por otro lado, los sistemas CRISPR/Cas están basados en una endonucleasa "programable" guiada por RNA, donde la especificidad del sistema viene dada por la complementariedad de secuencia entre la molécula de RNA y el DNA diana. La facilidad para diseñar la secuencia del RNA guía es la principal ventaja de este sistema.

DESCUBRIMIENTO CRISPR/Cas COMO SISTEMA INMUNE

Los microorganismos están expuestos a elementos genéticos invasivos, como fagos o plásmidos. Para defenderse, los microorganismos han desarrollado mecanismos que restringen la entrada o destruyen estos elementos. La eliminación de estos elementos genéticos se puede llevar a cabo mediante sistemas de modificación-restricción o a través del mecanismo de CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; en español: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas). Los sistemas CRISPR/Cas funcionan como un sistema inmune adaptativo (memoria inmunológica), estando presente en el 45 % de las especies de bacterias y en el 84 % de las de arqueas. Su funcionamiento está basado en la presencia en estos organismos de familias de secuencias de DNA que contienen fragmentos de genomas virales. Estos fragmentos son utilizados por la bacteria/arquea para detectar y destruir el DNA del virus y así poder defenderse eficazmente de ellos. El sistema CRISPR/Cas está constituido por un *locus* que contiene repeticiones de DNA parcialmente palindrómicas (23-47 pares de bases, pb) separadas por secuencias espaciadoras (21-72 pb) y por los genes CAS (*CRISPR associated genes*), localizados normalmente en regiones cercanas, que codifican proteínas esenciales para el funcionamiento de esta respuesta inmune.

Aunque el término CRISPR se acuñó en el año 2002, los primeros hallazgos relacionados con los sistemas CRISPR se remontan a 1987, cuando se detectaron las

el IHSM-UMA-CSIC, utilizando como modelo virus de DNA (geminivirus) transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Las principales líneas en las que trabaja son: el papel de las modificaciones postraduccionales en la infección por virus; los mecanismos de supresión de la respuesta a jasmonatos en la transmisión de los geminivirus y los mecanismos de supresión de silenciamiento génico mediado por patógenos.

Ana P. Luna es doctora en Biología por la Universidad de Málaga. En la actualidad es investigadora en el IHSM-UMA-CSIC, en la línea de investigación dirigida por el Dr. Eduardo R. Bejarano "Interacción planta-virus-vector", donde se usan como modelo los virus de DNA (geminivirus) transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Sus investigaciones se dedican principalmente al estudio de los mecanismos de supresión de silenciamiento génico mediado por virus.

repeticiones en el genoma de bacterias Gram negativas. Entre 2005 y 2007 se relacionó a estas secuencias espaciadoras con secuencias presentes en bacteriófagos y plásmidos y se demostró su funcionalidad como sistema de inmunidad adquirida. En 2013 se publicaron los primeros trabajos demostrando la funcionalidad de los sistemas CRISPR/Cas9 como herramientas biotecnológicas para modificar el genoma de células eucarióticas[2].

MODO DE ACCIÓN DEL SISTEMA INMUNE

El funcionamiento de los sistemas CRISPR/Cas se basa en el reconocimiento de los ácidos nucleicos exógenos mediante fragmentos de RNA de secuencia complementaria (crRNA o CRISPR-RNA), lo que permite su degradación mediante la acción de una nucleasa (Cas). El modo de acción de un sistema CRISPR/Cas puede dividirse en tres etapas: adaptación, expresión e interferencia [Figura 1].

Durante la fase de **adaptación**, la bacteria o arquea integra fragmentos pequeños de DNA viral o plasmídico entre las repeticiones presentes en los *loci* CRISPR, dando lugar a los espaciadores [Figura 1A]. Posteriormente, en la fase de **expresión** ocurre la transcripción y el procesamiento del pre-crRNA, una secuencia de RNA que contiene los espaciadores y parte de las repeticiones [Figura 1B]. Como resultado se forma el crRNA maduro que, mediante su unión a las proteínas Cas, confiere especificidad al sistema para reconocer y eliminar elementos genéticos invasivos en un mecanismo dependiente de secuencia durante la tercera fase, o fase de **interferencia** [Figura 1C] [1]. En algunos de los sistemas, como los CRISPR/Cas tipo II (Cas9), es necesaria además la presencia de otro RNA no codificante conocido como tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA) que hibrida con las repeticiones del crRNA, siendo dicha hibridación imprescindible para el procesamiento del crRNA, su reconocimiento por Cas y la rotura del DNA diana [Figura 1]. Para que la secuencia complementaria al crRNA en el fragmento diana sea reconocida por el sistema CRISPR, es necesaria la presencia de una secuencia conocida como PAM (*protospacer adjacent motif*) o PFS (*protospacer-flanking sequence*) al lado de la secuencia diana del ácido nucleico invasivo. La ausencia del PAM en secuen-

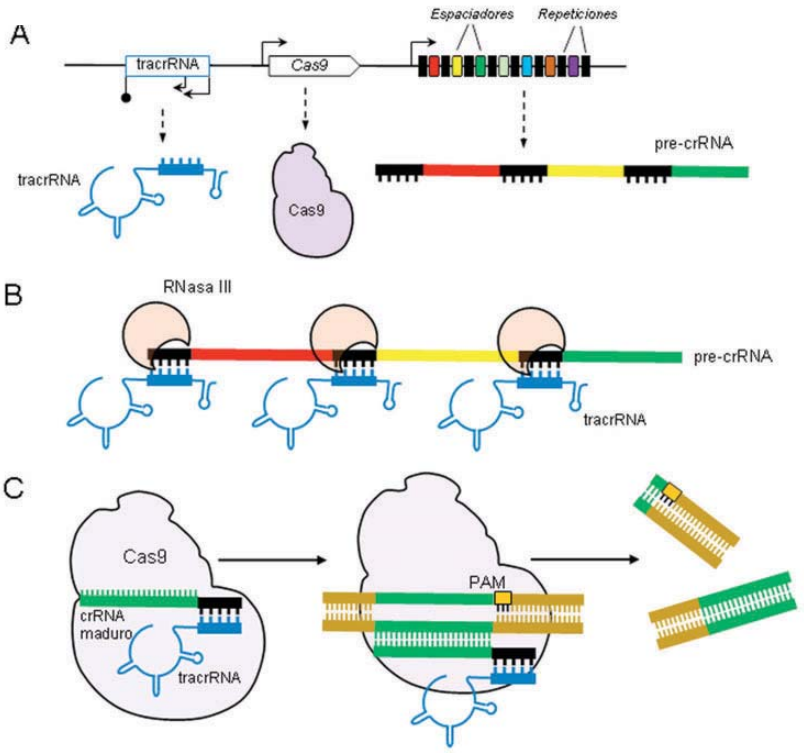


Figura 1. Estructura y modo de acción del sistema CRISPR/Cas9. **(A)** Expresión de los elementos: la proteína Cas9, el pre-crRNA que contiene fragmentos pequeños de DNA exógeno entre las repeticiones y el tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA). **(B)** Formación del crRNA (CRISPR RNA) maduro mediante la acción de la RNasa III y su unión al tracrRNA. **(C)** Reconocimiento de las secuencias complementarias del crRNA que debe estar flanqueada por una secuencia conocida como PAM (*protospacer adjacent motif*). (*Figura* elaborada por Eduardo R. Bejarano).

cias de la bacteria evita el procesamiento de su DNA, sirviendo como sistema de reconocimiento de lo "propio".

CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS CRISPR/Cas

La secuenciación masiva de genomas ha permitido identificar la existencia de diferentes clases de sistemas CRISPR/Cas. Estos sistemas se clasifican en dos clases dependiendo de la composición del complejo efector que reconoce y corta la secuencia diana: (i) la **clase I**, que incluye los tipos I, III y IV, caracterizados por presentar efectores con subunidades proteicas; y (ii) la **clase II**, donde se encuadran los de tipo II (Cas9), V (Cas12) y VI (Cas13), que constan de un complejo efector formado por una sola proteína con dominios múltiples[3]. Estos últimos son los sistemas más utilizados para la "edición de genes" (*gene editing*), siendo el sistema basado en Cas9 el más conocido y extendido. En la Figura 2 se muestran las características de los sistemas de clase II utilizados hasta la fecha, indicando la naturaleza de la diana, el tipo de corte que generan y las características de los PAM/PFS que debe contener la secuencia diana.

La secuenciación masiva de genomas ha permitido identificar la existencia de diferentes clases de sistemas CRISPR/Cas

EL SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA BASADO EN CRISPR/Cas

La técnica de edición de genes mediante los sistemas CRISPR/Cas se basa en la generación de un crRNA de secuencia complementaria a la secuencia diana, que guía a la nucleasa Cas para que produzca una rotura de doble hebra (*Double-stranded break or DSB*). Para simplificar la técnica, el tracrRNA y el crRNA se pueden fusionar en un RNA quimérico conocido como sgRNA (*single-guided RNA*) [Figura 3A].

Cas9 es la endonucleasa más empleada, aunque en los últimos años se han desarrollado sistemas basados en otras nucleasas de características similares como Cas12a (CpfI) y Cas13a. La Cas9 más usada es una endonucleasa de DNA guiada por RNA aislada de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). La endonucleasa tiene una estructura bilobulada, compuesta por un lóbulo con actividad nucleasa (NUC) y otro lóbulo de reconocimiento con estructura de α-helice (REC)[1]. El lóbulo NUC contiene dos dominios de nucleasa (HNH y RuvC-*like*) y un dominio de interacción con PAM (PI). El dominio HNH lleva a cabo el procesamiento o corte de la cadena de DNA diana (complementaria al sgRNA), mientras que el dominio RuvC-*like* corta la cadena complementaria del DNA. Ambos cortes se producen dentro de la región complementaria DNA-RNA y a tres nucleótidos de la secuencia PAM.

A partir de la versión silvestre de la proteína Cas9 se han generado versiones mutantes con características de gran utilidad. Así, la mutación de uno de los dominios de nucleasa genera una proteína Cas9 (nCas9) que sólo es capaz de producir

Cas9 es la endonucleasa más empleada, aunque en los últimos años se han desarrollado sistemas basados en otras nucleasas de características similares como Cas12a (CpfI) y Cas13a

Tipo-Subtipo/efector	Tipo de diana	Estructura del corte	PAM/PFS
II/Cas9	dsDNA	Romo	*"3´GC-rich PAM"*
V-A/Cas12a(Cpf1)	dsDNA	Cohesivo	*"5´AT-rich PAM"*
V-B/Cas12b(C2c1)	dsDNA	(5´ saliente)	*"5´AT-rich PAM"*
VI-A/Cas13a(C2c2)	ssRNA	Cohesivo	*"3´PFS: non-G"*
VI-B/Cas13b	ssRNA	(5´ saliente)	*"5´PFS: nonC"*; *"3´PFS:NAN/NNA"*

Figura 2. Características de los sistemas CRISPR/Cas de la clase II caracterizados. PAM, *protospacer adjacent motif;* PFS, *protospacer-flanking sequence*. Entre paréntesis se indican nombres alternativos por los que se conoce a los efectores (*Figura* elaborada por Diego López Márquez).

El sistema CRISPR/Cas esta siendo utilizado para generar mutaciones dirigidas en los genomas de numerosas especies

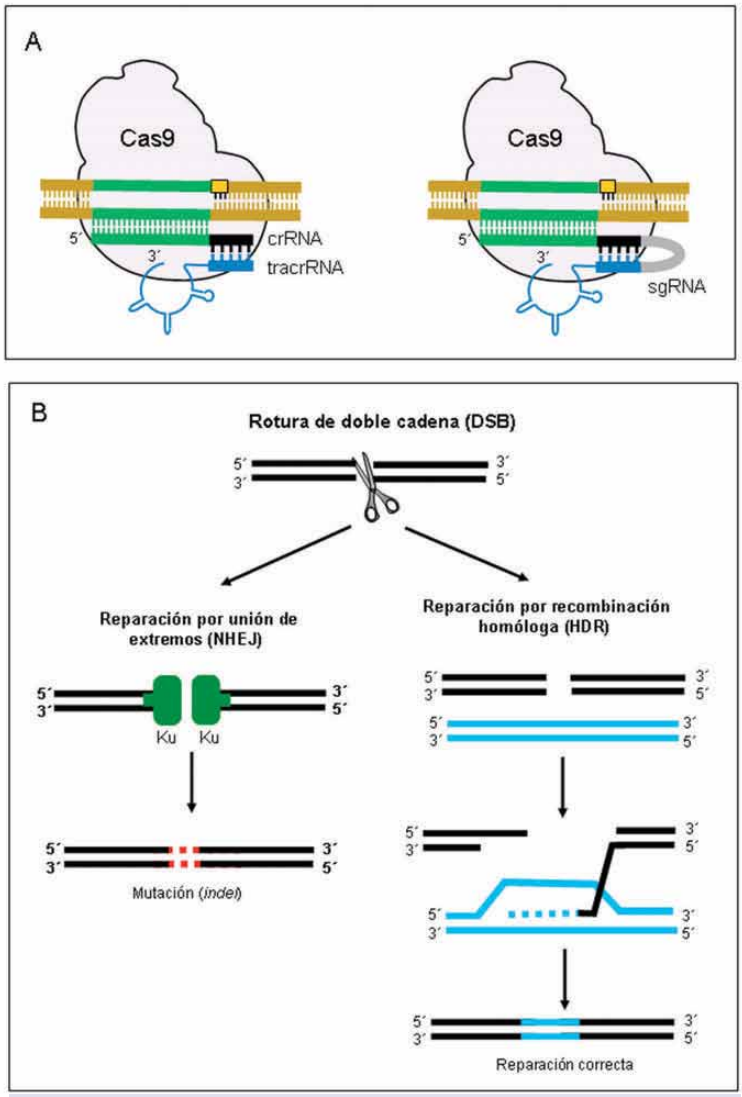


Figura 3. **(A)** La técnica de edición de genes mediante los sistemas CRISPR/Cas se puede simplificar fusionando el tracrRNA y el crRNA en un RNA quimérico conocido como sgRNA (*single-guided* RNA). **(B)** Cas9 produce roturas de doble cadena (DSB) que se reparan mediante "Reparación por recombinación no homóloga o unión de extremos" (NHEJ) o por "Reparación por recombinación homóloga" (*Homology-directed repair*, HDR). La reparación mediante NEHJ une los extremos del DNA rotos generando mutaciones por inserción o deleción (*indels*). La reparación por HDR requiere la presencia de una molécula de DNA con homología (*Figura* elaborada por Eduardo R. Bejarano).

el corte en una de las cadenas de DNA, mientras que la mutación en ambos dominios de actividad nucleasa produce una proteína Cas9 incapaz de introducir cortes en el DNA (dCAS9), pero que mantiene su capacidad de unión a DNA mediada por RNA.

Las DSB en células eucariotas se reparan generalmente mediante dos sistemas: (i) Reparación por recombinación no homóloga o unión de extremos (*Non homologous end joining repair*, NHEJ); o (ii) Reparación por recombinación homóloga (*Homology-directed repair*, HDR)[1]. Las DSB producidas por la acción de Cas9 atraen a la maquinaria de ambos sistemas de reparación. Una reparación mediante el sistema NHEJ puede llevarse a cabo por dos mecanismos diferentes: (i) la ruta de reparación NHEJ canónica (C-NHEJ), en la que la maquinaria celular vuelve a "pegar" los extremos del DNA roto; o (ii) mediante un mecanismo de NHEJ alternativo (alt-NHEJ) por el cual una cadena de DNA de cada extremo del corte es "recortada" para reparar la lesión. Ambos tipos de reparación NHEJ son propensos a generar mutaciones por inserción o deleción (*indels*). La reparación mediada por HDR requiere la presencia de una molécula de DNA con homología que se emplea como molde para llevar a cabo dicha reparación [Figura 3B].

El sistema CRISPR/Cas está siendo utilizado para generar mutaciones dirigidas en los genomas de numerosas especies. Además de las mutaciones *indel* que produce la endonucleasa, se han desarrollado proto-

Otra alternativa para generar otros tipos de mutaciones o modificaciones, es la utilización de varios sgRNA para introducir mutaciones en varios genes a la vez

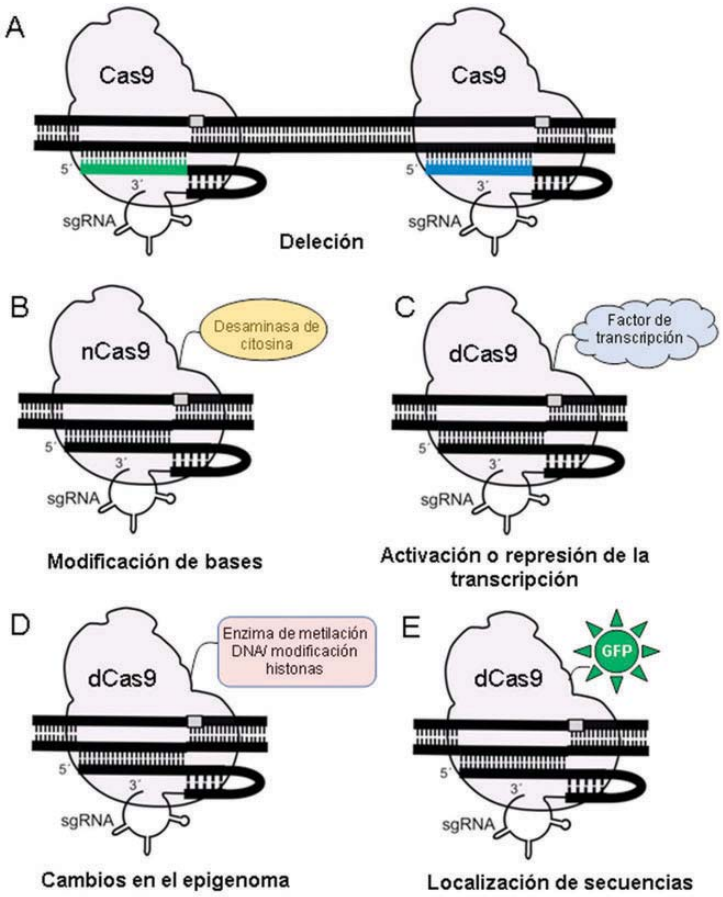


Figura 4. Desarrollo del sistema CRISPR/Cas para generar otros tipos de mutaciones o modificaciones: **(A)** deleciones extensas expresando dos sgRNA complementarios; **(B)** mutaciones puntuales fusionando la nCas9 a enzimas modificadoras como la desaminasa de citosina; **(C)** cambios en la regulación de la transcripción fusionando dCas9 a factores de transcripción; **(D)** modificaciones en el epigenoma fusionando dCas9 a proteínas involucradas en la metilación del DNA o modificaciones postranscripcionales de las histonas; o **(E)** estudios de movimiento de cromosomas *in vivo* fusionando dCas9 a proteínas fluorescentes (*Figura* elaborada por Eduardo R. Bejarano).

La expresión de nCas9 fusionada a la desaminasa de citosina permite inducir mutaciones dirigidas de cambio de base

colos para generar otros tipos de mutaciones o modificaciones. Así se han logrado producir deleciones de mayor tamaño expresando dos sgRNA complementarios de las secuencias que flanquean el fragmento a delecionar (*dual targeting*). Otra alternativa es la utilización de varios sgRNA para introducir mutaciones en varios genes a la vez. Recientemente se ha conseguido mutar hasta seis receptores de la hormona ABA (familia PYLs) empleando para ello diferentes sgRNA. Además, puesto que la reparación de la rotura puede ocurrir mediante HDR, se pueden llevar a cabo reemplazamientos de fragmentos genómicos mediante la adición al sistema de un DNA donador de interés, que servirá como molde en la reparación HDR. Por ejemplo, se ha realizado la introducción de genes chivatos.

Aparte de estas modificaciones "clásicas", que requieren la actividad nucleasa de Cas9, recientemente se han desarrollado otras técnicas basadas en las versiones nCas9 y dCas9 para generar mutaciones puntuales en el DNA que no requieren la formación de DSB. Un ejemplo de esta estrategia es la expresión de nCas9 fusionada a la desaminasa de citosina, una enzima que transforma la citosina en uracilo (conversión de C a T). El uso de esta proteína de fusión permite inducir mutaciones dirigidas de cambio de base. Esta estrategia se ha utilizado para la modificación del genoma de plantas (*Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*), pero en este caso el sistema nCas9 está fusionado a una desaminasa de adenosina de *Escherichia coli*, que induce conversiones de A a G. También se han empleado versiones dCas9 fusionadas a activadores y represores transcripcionales para modular la expresión de genes. Incluso se han desarrollado fusiones de dCas9 a proteínas involucradas en procesos epigenéticos, como acetiltransferasas de histonas o trimetilasas de histonas, que producen cambios en la compactación de la cromatina con la consecuente represión o activación de la expresión del gen de in-

terés. Otro ejemplo de la versatilidad del sistema es el empleo de la versión dCas9 fusionada a proteínas fluorescentes para llevar a cabo estudios de movimiento de cromosomas *in vivo*. Por último, el empleo de proteínas Cas capaces de usar como sustrato ssRNA (Cas13a o una modificación de Cas9 denominada RCas9) ha permitido modular la expresión de un gen postranscripcionalmente utilizando el sistema CRISPR/Cas [4] [Figuras 4 y 2].

Uno de los mayores inconvenientes de los sistemas CRISPR/Cas para la edición de genomas es la aparición de mutaciones en genes no deseados

EDICIÓN DEL GENOMA DE PLANTAS

Aunque los primeros trabajos de edición de genomas basados en CRISPR/Cas se realizaron en células animales, su empleo se ha extendido rápidamente a otros organismos, incluidas numerosas especies de plantas como *A. thaliana*, tomate, arroz, trigo, etc. Su uso en plantas, no obstante, presenta una serie de características y problemas asociados que se deben considerar al diseñar la estrategia de edición:

1. Mutaciones no deseadas. Uno de los mayores inconvenientes de los sistemas CRISPR/Cas para la edición de genomas es la aparición de mutaciones en genes no deseados (*off-targets*). El reconocimiento entre la secuencia del sgRNA y el DNA diana no requiere un 100 % de complementariedad entre ambas secuencias. Los estudios han mostrado que pueden existir algunos desapareamientos dependiendo del número y la posición de estos, siendo más permisivos los cambios en la zona más distal al motivo PAM. Como consecuencia de estos análisis se han desarrollado numerosas herramientas bioinformáticas (CRISPOR; CRISPR-P 2.0) que permiten el diseño de sgRNA con probabilidades muy bajas de producir mutaciones no deseadas en el genoma. Otra de las causas que puede favorecer la aparición de estas mutaciones, es el empleo de promotores potentes para la expresión de Cas9 y el sgRNA.

2. Quimeras. Otra de las limitaciones para generar mutantes en plantas mediante el uso de los sistemas CRISPR/Cas es la aparición de individuos quiméricos. Para generar una planta mutante es necesario introducir las construcciones que expresan sgRNA y Cas9 en las células vegetales y generar a partir de ellas un organismo transgénico. Durante la regeneración de la planta, la acción sgRNA y Cas9 produce mutaciones en la secuencia diana que puede ser diferentes en cada célula, generando un organismo quimérico. Para obtener una planta mutante genéticamente pura es necesario, por tanto, obtener semillas del transformante original y seleccionar entre la descendencia aquellas plantas que contengan las mutaciones apropiadas.

3. La eliminacion del sgRNA/Cas9. Una vez generada la planta mutante, se ha de eliminar, mediante segregación, el transgén que contiene Cas9 y los sgRNA para evitar la inducción de mutaciones no deseadas y poder utilizar las plantas en ensayos de complementación genética, necesarios en muchas ocasiones para confirmar el origen de los fenotipos observados en los mutantes. Para facilitar la selección de estas plantas, se han desarrollado vectores para la transformación que contienen, además de las construcciones para la expresión de Cas9 y los sgRNA, un casete para la expresión de fluoróforos. De esta forma, mediante un retrocruzamiento, es posible identificar entre las plantas segregantes, aquellas que conservan la mutación pero que no contienen transgenes. Para evitar el inconveniente que representa la generación de plantas transgénicas, se están desarrollando protocolos para introducir en la célula complejos proteicos preensamblados sgRNA-Cas9 (RNP).

Mediante un retrocruzamiento, es posible identificar entre las plantas segregantes, aquellas que conservan la mutación pero que no contienen transgenes

USO DE CRISPR/Cas PARA GENERAR RESISTENCIAS A PATÓGENOS EN PLANTAS

La generación de resistencia a patógenos mediante el sistema CRISP/Cas se puede

Patógeno	Gen diana	Planta	Referencia
VIRUS			
BSCTV	LIR y Rep/RepA	*N. benthamiana*	Baltes, N. J. *et al.* (2015). *Nature Plants* **1**: 15145
TYLCV; BCTV; MeMV	CP, Rep e IR	*N. benthamiana*	Ali, Z. *et al.* (2015). *Genome Biol.* **16**: 238
CLCuKoV; MeMV; TYLCV; TYLCSV	CP, Rep e IR	*N. benthamiana*	Ali, Z. *et al.* (2016). *Sci. Rep.* **6**: 26912
TuMV	GFP1, GFP2, HC-Pro, CP	*N. benthamiana*	Aman, R. *et al.* (2018). *Genome Biol.* **19**: 1
CMV; TMV	ORF1, 2, 3, CP y 3'UTR	*N. benthamiana* y *A. thaliana*	Zhang, T. *et al.* (2018). *Plant Biotechnol.* J. **16**:1415
CVYV, ZYMV, PRSV-W	eIF4E	*Cucumis sativa*	Chandrasekaran, J. *et al.* (2016). *Mol. Plant Pathol.* **17**:1140
TuMV	eIF(iso)4E	*A. thaliana*	Pyott, D. E. *et al.* (2016). *Mol. Plant Pathol.* **17**: 1276
RTSV	eIF4G	*Oryza sativa L. japonica*	Macovei, A. *et al.* (2018). *Plant Biotechnol.* J. **16**:1918
HONGOS			
Blumeria graminis	MLO-A1	*Triticum aestivum*	Wang, Y. *et al.* (2014). *Nat. Biotechnol.* **32**: 947
Oidium neolycopersici	MLO1	*Solanum lycopersicum*	Nekrasov, V. *et al.* (2017). *Sci. Rep.* **7**: 482
Erysiphe necator	MLO-7	*Vitis vinifera*	Malnoy, M. *et al.* (2016). *Front. Plant Sci.* **7**:1904
Botrytis cinerea	WRKY52	*Vitis vinifera*	Wang, X. *et al.* (2018). *Plant Biotechnol. J.* **16**: 844
Phytophthora tropicalis	NPR3	*Theobroma cacao*	Fister, A. S. *et al.* (2018). *Front. Plant Sci.* **9**: 268
Magnaporthe oryzae	ERF922	*Oryza sativa L. japonica*	Wang, F. *et al.* (2016). *PLoS One*. **11**: e0154027
Magnaporthe oryzae	SEC3A	*Oryza sativa L. japonica*	Ma, J. *et al.* (2018). *J. Exp. Bot.* **69**: 1051
Blumeria graminis	TaEDR1	*Triticum aestivum*	Zhang, Y. *et al.* (2017). *Plant J.* **91**: 714
BACTERIAS			
Xanthomonas oryzae	SWEET13	*Oryza sativa*	Zhou, J. *et al.* (2015). *Plant J.* **82**: 632
Xanthomonas citri	CsLOB1	*Citrus paradisi Macfadyen*	Jia, H. *et al.* (2016). *Plant Biotechnol.* J. **14**: 1291
Xanthomonas citri	CsLOB1	*Citrus sinensis Osbeck*	Peng, A. *et al.* (2017). *Plant Biotechnol.* J. **15**: 1509
Erwinia amylovora	DIPM-1; DIPM-2; DIPM-4	*Malus domestica*	Malnoy, M. *et al.* (2016). *Front. Plant Sci.* **7**: 1904

Figura 5. Ensayos para la generación de resistencia a patógenos mediante el sistema CRISP/Cas en plantas. **Abreviaturas**: BeYDV: *Bean yellow dwarf virus*; BSCTV: *Beet severe curly top virus*; TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*; BCTV: *Beet curly top virus*; MeMV: *Merremia mosaic virus*; CLCuKoV: *Cotton leaf curl Kokhran virus*; TYLCSV: *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*; TuMV: *Turnip mosaic virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; TMV: *Tobacco mosaic virus*; CVYV: *Cucumber vein yellowing virus*; ZYMV: *Zucchini yellow mosaic*; PRSV-W : *Papaya ring spot mosaic virus-W*; PVX: *Potato virus X*; TCV: *Turnip crinkle virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; RTSV: *Rice tungro spherical virus*. CP: *proteína de la cápside*; Rep: *Replication association protein*; IR: *Región intergénica*; LIR: *Región intergénica larga*; GFP: *Proteína verde fluorescente*; HC-Pro: *supresor de silenciamiento Helper component proteinase*; ORF: *marco abierto de lectura*; UTR: *untranslated terminal repeat*; eIF4E: *eukaryotic translation initiation factor 4E*; eIF4G: *eukaryotic translation initiation factor 4G*; MLO: *Mildew resistant locus*; NPR3: *Non-Expressor of Pathogenesis-Related 3* , ERF: *Ethylene responsive factor*; TaEDR1: *Enhanced disease resistance*; CsLOB: *Lateral Organ Boundaries*; DIPM: *DspE-interacting proteins of Malus* (*Figura* elaborada por Ana P. Luna).

conseguir mediante la inducción de mutaciones en dos tipos de dianas: el genoma del patógeno o genes de la planta implicados en la infección [Figura 5].

CRISPR/Cas dirigido contra el genoma de los patógenos

La tecnología disponible limita el uso de esta técnica a la inducción de resistencia a patógenos intracelulares como los virus, cuyo genoma es accesible a la maquinaria enzimática del sistema. Aunque la especificidad por DNA de las proteínas Cas9 ha limitado el uso de esta tecnología a virus de DNA, la identificación reciente de proteínas capaces de reconocer y digerir ssRNA está permitiendo emplear esta estrategia contra virus de RNA.

Al igual que ocurre con otras tecnologías desarrolladas para la generación de resistencia mediante la expresión de secuencias de RNA complementarias a las del genoma de los virus (RNA antisentido,

Es previsible que la estrategia de CRISPR/Cas9 sea mucho más efectiva y duradera que las basadas en el silenciamiento génico

La generación de plantas resistentes a virus, implica la necesidad de expresar de forma continua el sistema CRISPR/Cas9 en la planta

RNAi, amiRNA), la eficacia del sistema CRISPR/Cas9 requiere el diseño de secuencias complementarias específicas de genes/regiones de los virus esenciales para la infección. No obstante, es previsible que la estrategia de CRISPR/Cas9 sea mucho más efectiva y duradera que las basadas en el silenciamiento génico, ya que los patógenos carecen de proteínas que puedan interferir en el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9, como ocurre con los supresores virales del silenciamiento génico.

Hasta la fecha este sistema se ha empleado con éxito para controlar la infección de varias especies de virus de DNA de la familia *Geminiviridae* en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis* usando sgRNA dirigidos contra secuencias codificantes de los virus o contra la región intergénica (IR), que contiene el origen de replicación y los promotores para la expresión de los genes virales. Los resultados obtenidos en los ensayos en laboratorio han sido muy prometedores, obteniéndose una reducción tanto en la replicación como en la acumulación de virus durante la infección. Esta reducción fue significativamente mayor cuando se usaron sgRNA contra zonas de la región intergénica [Figura 5]. Cuando se emplearon sgRNA complementarios de secuencias codificantes se detectaron variantes virales que fueron capaces de replicarse y de generar una infección al inocular nuevas plantas, mientras que los sgRNA dirigidos contra las IR no dieron lugar a la aparición de formas virales viables, siendo las moléculas virales recuperadas incapaces de infectar otras plantas. De esta forma, el uso de sgRNA contra las IR podría ser una solución a uno de los principales problemas asociados al uso de esta estrategia: el incremento en la frecuencia de generación de virus recombinantes como consecuencia de DSB producidas por el sistema CRISPR/Cas que puedan escapar al sistema de resistencia o adquieran mayor capacidad patogénica. Este problema puede ser de especial relevancia en cultivos comerciales donde las infecciones mixtas son muy frecuentes. Otra estrategia para evitar esta posibilidad es la expresión de múltiples sgRNA que tengan como diana el genoma del virus. De esta forma la probabilidad de que las moléculas virales se reparen es muy baja, ya que serían cortadas en varios puntos y, como consecuencia, degradadas[5].

La identificación de enzimas Cas capaces de unirse y cortar moléculas de RNA ha permitido ampliar esta estrategia para el control de virus de RNA. Así mediante expresión de FnCas9 y sgRNA específicos contra el *Cucumber mosaic virus* (CMV) y el *Tobacco mosaic virus* (TMV) en plantas de *Arabidopsis* y *N. benthamiana*, se ha generado resistencia a estos virus, que se ha mantenido activa al menos hasta la generación T6 y que es independiente de la actividad nucleasa de FnCas9, pero dependiente de la unión a RNA. En un segundo ejemplo se ha utilizado Cas13a dirigiendo esta ribonucleasa contra varias regiones del genoma viral de RNA de *Turnip mosaic virus* (TuMV) en tabaco.

La generación de plantas resistentes a virus implica la necesidad de expresar de forma continua el sistema CRISPR/Cas9 en la planta, lo que limita el uso de esta tecnología en los países en los que existen recelo al uso de plantas transgénicas. Aunque este problema se podría evitar suministrando a la planta los complejos proteicos preensamblados sgRNA-Cas9, o versiones intermedias, como RNA que codifiquen Cas9 y un RNA representando el sgRNA. Sin embargo, la dificultad de uso de estos sistemas y su alto coste impiden que se pueda convertir en un sistema rutinario en la agricultura[6,7].

CRISPR/Cas9 dirigido contra genes de la planta

Otra alternativa para generar resistencia a patógenos mediante el sistema CRISPR-Cas es inducir mutaciones en genes

Para generar resistencia a patógenos, la edición de genes de susceptibilidad o genes S es una buena alternativa

Las dificultades para la transformación estable de muchas especies leñosas representan una limitación importante para el uso de CRISPR/Cas en este tipo de plantas

de la planta implicados en la infección. La edición de genes de susceptibilidad o genes S (dianas de efectores de patógenos o reguladores negativos de inmunidad) es una buena alternativa, ya que son necesarios para una interacción planta-patógeno compatible y permiten inducir resistencia a cualquier tipo de patógenos. La principal limitación de esta estrategia es que muchos de los genes S participan en procesos celulares generales y, por tanto, su modificación puede dar como resultado alteraciones no deseadas en el desarrollo, metabolismo, etc.[8,4,7].

Resistencia frente a virus

Los virus dependen de un gran número de factores de la planta para llevar a cabo la infección, lo que hace a estos genes excelentes candidatos para generar resistencia a estos patógenos intracelulares. Un ejemplo de esta estrategia son los factores de inicio de la traducción eucariótica, eIF4E, eIF(iso)4E y eIF4G, cuya modificación por CRISPR/Cas9 en plantas de pepino, de *Arabidopsis* y más recientemente en arroz, han logrado producir resistencia contra varios potivirus y otros virus de RNA[8]. En todos los casos descritos, la resistencia se mantuvo en las plantas no transgénicas obtenidas mediante retrocruzamiento, sin que se detectaran mutaciones en otros genes, ni alteraciones en la morfología o el desarrollo de las plantas [Figura 4].

Resistencia frente a hongos y bacterias

Existen varios ejemplos de esta estrategia aplicada a la generación de resistencia a distintos hongos en varias especies de interés agrícola, como tomate, trigo o arroz [Figura 5]. En estos estudios se han generado plantas con mutaciones en diversos genes S como *MLO* (*Mildew resistant locus*, *TaEDR1* (*Enhanced disease resistance*) o el factor de transcripción implicado en respuesta a estrés biótico de vid (VvWRKY52), obteniéndose resistencia a infecciones por *Phytophthora capsici*, *Blumeria graminis*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae*, etc. En la mayoría de los casos, la planta transgénica generada no mostró ningún defecto aparente en su desarrollo, excepto en el caso de las plantas de arroz con una mutación del gen *OsSEC3* (subunidad de un complejo implicado en exocitosis) que, a diferencia de las plantas mutadas en el gen *OsERF922* (factor de respuesta a etileno 922), mostraron efectos pleiotrópicos en su fenotipo, entre ellos un menor tamaño de la planta [Figura 5].

Las dificultades para la transformación estable de muchas especies leñosas representan una limitación importante para el uso de CRIPS/Cas en este tipo de plantas. No obstante, se han obtenido algunos resultados mediante transformación transitoria en algunas especies como el cacao, donde se han obtenido hojas más resistentes a *Phytophthora tropicalis* expresando por agroinfiltración los componentes del sistema dirigidos contra el supresor del sistema inmune NPR3 (*Non-Expressor of Pathogenesis Related*).

Existen pocos ejemplos publicados sobre la aplicación del sistema CRISPR/Cas para producir resistencias contra bacterias fitopatógenas. Se han obtenido plantas de arroz resistentes a varias bacterias del género *Xanthomonas* mutando el gen *OsSWEET13*. El sistema CRISP/Cas se ha usado también con éxito en leñosas como el pomelo Duncan o el naranjo dulce para producir resistencia a *X. citri*. En ambos casos, se modificó la secuencia promotora del gen *CsLOB1* (*Lateral organ boundaries 1*). Las plantas modificadas mostraron resistencia al patógeno sin que se detectara ningún defecto agronómico. En el caso del manzano, sin embargo, no se ha llegado a regenerar plantas a partir de los protoplastos transformados, aunque se transformaron con éxito protoplastos con RNP contra varios genes *DIPM* (*DspE-interacting proteins of Malus*) para obtener resistencia frente a *Erwinia amylovora* [Figura 5][8].

PERSPECTIVAS FUTURAS

La preocupación sobre el uso de pesticidas y cómo estos afectan al medioambiente y a la salud hace que la protección de cultivos mediante la mejora genética usando el sistema CRISPR/Cas sea una alternativa bastante atractiva. Sin embargo, para que esta posibilidad se convierta en algo real habría que vencer varios obstáculos muy importantes: primero, demostrar que las resistencias a los fitopatógenos obtenidas en los laboratorios se pueden dar en condiciones de campo y se pueden mantener a lo largo del tiempo; y, segundo, y probablemente más difícil que lo anterior, conseguir que la legislación y la opinión pública deje de ver con recelo el uso de la edición de genomas de plantas en la mejora genética.

REFERENCIAS

[1] Wang, H., La Russa, M. y Qi L. S. (2016). "CRISPR/Cas9 in "Genome Editing and Beyond". *Annu. Rev. Biochem.* **85**: 227-264.

[2] Mojica, F. J. M. y Montoliu, L. (2016). "On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals". *Trends in Microbiology.* **24**: 811-820.

[3] Koonin, E. V., Makarova, K. S. y Zhang, F. (2017). "Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems". *Current Opinion in Microbiology* **37**: 67-78.

[4] Langner, T., Kamoun, S. y Belhaj, K. (2018). "CRISPR Crops: Plant Genome Editing Toward Disease Resistance". *Annu. Rev. Phytopathol*. **56**: 479-512.

[5] Zaidi, S. S. *et al*. (2016). "Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance". *Front. Plant. Sci.* **7**: 364.

[6] Mahas, A. y Mahfouz, M. (2018). "Engineering virus resistance via CRISPR-Cas systems". *Curr. Opin. Virol*. **32**: 1-8.

[7] Khatodia, S., Bhatotia, K. y Tuteja, N. (2017). "Development of CRISPR/Cas9 mediated virus resistance in agriculturally important crops". *Bioengineered*, **8**: 274-279.

[8] Borrelli, V. M. *et al.* (2018). "The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology". *Front. Plant. Sci.* **9**: 109.

Técnicas de visión artificial y *deep learning* sobre dispositivos móviles para la identificación automática de síntomas de enfermedades en campo

Artzai Picón[1], Alexander Johannes[4], Aitor Álvarez-Gila[1], Maximiliam Seitz[3,4] Jone Echazarra[1], Sergio Rodríguez-Vaamonde[1], Ana Díez Navajas[2] y Amaia Ortiz-Barredo[2]

[1]Computer Vision, TECNALIA, Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio (Vizcaya)
[2]NEIKER, Departamento de Producción y Protección Vegetal. Vitoria-Gasteiz (Álava)
[3]Institute of Process Engineering in Plant Production, University of Hohenheim, Stuttgart, Alemania
[4]BASF SE, Limburgerhof, Alemania

Tecnalia es un instituto privado de I+D+i . El grupo de *Computer Vision* tiene más de 30 años de experiencia en el campo del procesado de imágenes e inteligencia artificial. El grupo ha obtenido 19 patentes y sus resultados han sido reconocidos por distinciones como ONCE Foundation International R&D Award, EARTO-2011 y EARTO-2014 European Innovation Awards.

NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, es una sociedad pública del Gobierno vasco y miembro de la Corporación Tecnalia. Este trabajo ha sido desarrollado por miembros del equipo de sanidad vegetal que mantiene sus líneas de investigación enfocadas en el diagnóstico y control integrado de las enfermedades de cultivos extensivos,

Introducción

Para muchas enfermedades que afectan a los cultivos, es necesario identificar los primeros síntomas que aparecen en las plantas; de ello depende el tomar decisiones correctas para incrementar la eficiencia y eficacia de las medidas de control a poner en marcha. En los últimos años, varias metodologías de visión artificial han sido propuestas para la identificación de enfermedades. Dentro de estas metodologías, está el uso de las redes neuronales convolucionales (CNN), que han resultado satisfactorias para las tareas de clasificación necesarias para la identificación de síntomas en condiciones de campo. En este artículo presentamos una breve revisión de las aproximaciones computacionales hasta ahora aplicadas en agricultura para la identificación de enfermedades, sus avances y las dificultades encontradas. En 2014, los equipos de Tecnalia, BASF y NEIKER unieron sus conocimientos para aplicar las metodologías de *machine learning* a la identificación de tres conocidas enfermedades de trigo: septoriasis (*Septoria tritici*), helmistosporiosis o *Tan Spot* (*Drechslera tritici-repentis*), y roya amarilla y roya parda (*Puccinia striiformis* y *Puccinia triticina*). El desarrollo de los algoritmos se ha realizado sobre fotografías tomadas con dispositivos móviles (teléfonos y tabletas) comúnmente usados por técnicos o agricultores. Para el desarrollo de los primeros algoritmos, fue necesario analizar más de 12 000 fotografías tomadas durante tres campañas (2014, 2015 y 2016). El último análisis piloto realizado en Alemania ha revelado una precisión cercana al 100 % en la identificación de los primeros síntomas de estas tres enfermedades. Esta metodología ha sido aplicada con éxito también en otros cultivos y enfermedades por nuestro equipo.

Puede consultarse información detallada en publicaciones previas de los autores:

- Johannes, A. *et al.* (2017). *Computers and Electronics in Agriculture* **138**: 200-209
- Picón, A. *et al.* (2018). *Computers and Electronics in Agriculture*. En prensa

Visión artificial y deep learning en diagnóstico de fitopatologías

con especial atención a cereal, patata y viñedo.

BASF es una de las empresas químicas líderes en el mundo que combinan el éxito económico con la protección del medio ambiente y la responsabilidad social a través de la ciencia y la innovación.

En programas de control integrado, el umbral de tratamiento para muchas enfermedades de los cereales es la detección de los primeros síntomas

PUNTOS DE ENCUENTRO DEL CONTROL INTEGRADO DE ENFERMEDADES DE LOS VEGETALES Y LOS MÉTODOS DE VISIÓN ARTIFICIAL

La identificación de los primeros síntomas de una enfermedad es uno de los principales retos de los técnicos y agricultores en campo, por varias razones; por un lado para aplicar a tiempo las medidas fitosanitarias adecuadas e incrementar así la eficiencia y eficacia de los tratamientos; y reducir, en su caso, el uso de los mismos. Por otro lado, la identificación de las enfermedades en muchas ocasiones resulta difícil especialmente porque se desconocen los síntomas característicos de los primeros estadios de la enfermedad o bien se identifican cuando ya es tarde para aplicar medidas de control eficaces. Es importante tener en cuenta que, en programas de control integrado, el umbral de tratamiento para muchas enfermedades de los cereales es la detección de los primeros síntomas. La investigación en el ámbito de la visión artificial necesita que sea orientada a la identificación de síntomas tempranos de forma precisa, rápida y sencilla, usando dispositivos de uso rutinario y en condiciones de campo, con fotografías expuestas a distintos tipos de iluminación y foco. Uno de los ejemplos más relevantes de esta cuestión es la incidencia y gravedad de la roya amarilla en Europa a partir de 2011. En varias variedades se registraron pérdidas de producción superiores al 40 % con incidencia y gravedad hasta entonces desconocida. Estos daños han sido atribuidos, entre otras, a nuevas razas denominadas Worrior (datos del Global Rust Reference Centre, 2017) que han empujado a un cambio de la estructura varietal así como a la necesidad de poner a punto modelos de predicción del riesgo de aparición de la enfermedad o de su detección temprana.

Hasta el momento, muchos sistemas de identificación de síntomas de enfermedades de los vegetales se han apoyado en la identificación de variaciones de color, han sido enfocados a la descripción de su gravedad en la planta o incidencia en el cultivo, pero no han generado suficiente información para el diagnóstico. Este artículo presenta una de las tecnologías pioneras de visión artificial enfocada al diagnóstico de enfermedades que ha sido validada en Europa para cuatro enfermedades endémicas de trigo. Para ello fue necesario unir el conocimiento de tres equipos (Tecnalia, BASF y NEIKER) con gran experiencia en el reconocimiento de enfermedades mediante sintomatología y análisis de laboratorio, en el desarrollo diferencial de síntomas según la variedad u otras variantes agrícolas y, finalmente, en el desarrollo de técnicas innovadoras de *machine learning* que permitieron resolver todas las variantes que podemos encontrar en el campo para la identificación automática de las enfermedades con la máxima precisión.

Distintos autores ya habían propuesto modelos de análisis de imágenes previamente. Los sistemas se basaban en el análisis del color de la planta u hoja infectada. Otros, combinaron las variaciones de color, textura y forma para identificar con más éxito las enfermedades. Sin embargo, todos ellos se enfocaron en analizar imágenes que contenían únicamente una enfermedad o daño y en estados avanzados, nunca sobre los primeros síntomas de la enfermedad que, en muchos casos, son completamente distintos a los síntomas más tardíos. Otros sistemas como *PlantVillage*[3] consistieron en colecciones de más de 50 000 imágenes de hojas sanas e infectadas, diestramente clasificadas, de 14 diferentes cultivos (manzano, maíz, vid, etc.) y de 26 diferentes enfermedades.

Nuestra primera aproximación fue identificar cada enfermedad en hojas en las que aparecían simultáneamente más de una; mediante métodos de procesamiento de imagen e inferencia estadística se lograron

configurar los algoritmos de identificación. Estos pudieron ser aplicados a varios dispositivos móviles de adquisición fotográfica (tabletas o *smartphones*) que eran suficientemente versátiles y disponibles en la práctica agrícola. Posteriormente se consiguió mejorar la precisión de la identificación de síntomas tempranos mediante el uso y adaptación de redes neuronales convolucionales, sistemas de clasificación de imágenes más avanzados, que han resultado ser extraordinariamente prometedores para este objetivo.

Los sistemas clásicos de visión artificial se han usado frecuentemente para la identificación automática de enfermedades

Los primeros usos de la visión artificial en agricultura se publicaron en 2011

Los sistemas clásicos de visión artificial se han usado frecuentemente para la identificación automática de enfermedades. En este ámbito, los estudios pioneros fueron los desarrollados por Sannakki en 2011[8] para enfermedades en hojas. Su propuesta analizaba la información de variaciones de color donde un algoritmo no supervisado de *clustering* permite separar las zonas infectadas mientras que técnicas posteriores de lógica difusa permitían la identificación de las zonas localizadas. En 2016, Sircharoen y su equipo[9] desarrollaron una técnica que combinaba textura, color y forma para detectar la presencia de una enfermedad específica en una planta.

Desde 2014 a 2016 nuestro equipo generó una extensa base de fotografías tomadas en campos de trigo, que barría una amplia gama de estadios fenológicos, 36 variedades, condiciones climáticas y de ambiente o enfoque distinto, y con diferentes dispositivos fotográficos móviles. Esto permitió cubrir una amplia gama de posibilidades, todas ellas en condiciones de campo para la identificación de septoriasis (*Septoria tritici*), helmintosporiosis o *Tan Spot* (*Drechslera tritici-repentis*), y roya amarilla y parda (*Puccinia striiformis* y *Puccinia recondita*) de trigo. El algoritmo configurado fue validado en condiciones reales de trabajo, con la participación de más de una decena de técnicos de varias zonas agroclimáticas europeas y mostró una AuC (*Area under the Receiver Operating Characteristic -ROC-Curve*) superior al 0,80 y una precisión en torno al 0,82 para síntomas de estadios medios o avanzados de la enfermedad, y de un 0,76 para síntomas tempranos. El algoritmo desarrollado se basaba en un algoritmo clásico de procesamiento de imágenes que permitía describir la imagen en términos de sus características visuales soportado por algoritmos de aprendizaje máquina que le permitían asociar dichas características con las enfermedades asociadas. Este algoritmo dispone de un primer módulo de procesamiento y normalización de iluminación con un filtro inicial que permite detectar las regiones candidatas a presentar síntomas de enfermedad. A ello se le une una segunda fase donde cada una de las regiones se describe en términos de su textura y su color, donde un algoritmo de clasificación basado en *random-forests* permitía la detección de enfermedades.

Las redes convolucionales profundas proporcionan un marco que permite la definición de modelos que actúan como un extractor de características jerárquico, y como un clasificador

Aunque los resultados fueron muy prometedores, estas técnicas clásicas de procesamiento de imagen tienen un nivel descriptivo limitado que hacen que el modelo tenga un punto de saturación que no le permite generalizar el conocimiento y tomar ventaja de un número elevado de imágenes de entrenamiento. Como alternativa para mejorar el poder expresivo de los algoritmos de visión, las redes convolucionales profundas proporcionan un marco que permite la definición de modelos que actúan, por un lado, como un extractor de características jerárquico, y por otro, como un clasificador. Las topologías de las CNN pueden ser extendidas (por ejemplo, acoplando diferentes capas convolucionales) de tal forma que la complejidad crezca para mapear el poder expresivo requerido para cada tarea objetivo dada y a la cantidad de datos disponibles. El mejor ejemplo de esto es la

Visión artificial y deep learning en diagnóstico de fitopatologías

El mundo de la visión artificial ha experimentado una tremenda eclosión de numerosas soluciones basadas en *deep learning* y redes convolucionales

Los síntomas de varias enfermedades pueden aparecer simultáneamente en las hojas e incluso junto a otras lesiones producidas por plagas o fisiopatías

competición *ImageNet Large Scale Visual Recognition Competition* (ILSVRC2012) aplicada por Russakovsky en 2015[7], que superaron en más de un 10 % la precisión mediante el uso de CNN. Esta competición pide a los contendientes clasificar un *set* de imágenes en diez clases conocidas pudiendo utilizar un millón de imágenes de entrenamiento. A partir de este resultado, el mundo de la visión artificial ha experimentado una tremenda eclosión de numerosas soluciones basadas en *deep learning* y redes convolucionales que permiten superar con creces los resultados tradicionales obtenidos por las técnicas clásicas de visión. Todas estas aproximaciones han sido extensamente analizadas en un amplio rango de aplicaciones, desde el diagnóstico médico sobre imágenes dermatológicas e histopatológicas, entre otras, hasta coches de conducción autónoma y control de calidad en la industria de manufactura.

Las aplicaciones en agricultura no han sido una excepción en esta tendencia. Las redes neuronales (*Deep neural nets*) se han empleado satisfactoriamente para predicción del uso del suelo a partir de imágenes de satélite[2], fenotipado de plantas[6] y detección de malas hierbas[1]. En el dominio de la identificación de enfermedades, en 2016 se aplicó una red [10] basada en *AlexNet*[4] para modelar 13 enfermedades a partir de un conjunto de imágenes obtenidas a partir de una búsqueda de internet. Iniciativas como *PlantVillage* ha permitido a sus promotores el diseño de aplicaciones basadas en una arquitectura *GoogleNet*[5], donde han aplicado técnicas de transferencia de conocimiento para adecuar el modelo al caso de uso concreto. Estos autores proporcionan una precisión del 99,35 % en sus modelos. Sin embargo, cuando estos algoritmos son analizados bajo diferentes condiciones fuera de sus colecciones fotográficas de entrenamiento, la precisión baja hasta el 31,4 %. El hecho de que las colecciones fotográficas usadas hayan sido tomadas en condiciones controladas y que los modelos sólo hayan sido entrenados basándose en síntomas de estados avanzados de la enfermedad, impide su aplicación para la detección temprana de las enfermedades en condiciones de iluminación variadas, algo esencial para su aplicación eficaz. Además, estos algoritmos no tienen en cuenta los casos en los que una misma planta u hoja puede presentar síntomas de dos o más enfermedades simultáneamente; sólo pueden identificar la enfermedad más extendida, que no tiene por qué ser la de mayor importancia para el cultivo en términos de control integrado de enfermedades.

Aproximación metodológica para la aplicación de visión artificial con CNN a la identificación de enfermedades de trigo en el campo

A continuación, se describen brevemente los pasos metodológicos abordados para la identificación de los primeros síntomas de enfermedades de trigo mediante nuestra propuesta de visión artificial. La secuencia es una muestra de los puntos críticos a tener en cuenta para su uso eficaz y preciso en condiciones de campo. Los síntomas de varias enfermedades pueden aparecer simultáneamente en las hojas e incluso junto a otras lesiones producidas por plagas o fisiopatías que no son objetivo de este trabajo.

Captura de imágenes en condiciones de campo. Se usaron fotografías tomadas con siete dispositivos móviles comerciales con sistemas operativos Windows, Android e iOs. Se realizaron en diferentes estados fenológicos de la planta en, al menos, 36 variedades con diferente sensibilidad a las enfermedades objeto del estudio y barriendo todo el abanico de síntomas, desde los más tempranos a los más tardíos, apareciendo o no simultáneamente en una misma hoja o junto a otras lesiones no asociadas a estas enfermedades. Finalmente,

Visión artificial y deep learning en diagnóstico de fitopatologías

Se creó una base fotográfica con cinco cultivos incluyendo las enfermedades más frecuentes cuyo control está condicionado a la aparición de los primeros síntomas en campo

Se ha desarrollado un algoritmo de visión artificial para identificación de enfermedades vegetales que ha sido validado en condiciones de campo para cuatro enfermedades de trigo

cada foto fue tomada bajo distintas condiciones de luz, localización o fecha, tiempo de exposición, orientación, etc. Durante tres años consecutivos se tomaron cerca de 12 000 fotografías que constituyeron la base fotográfica de referencia para la definición del algoritmo computacional de identificación [Figura 1].

Figura 1. Algunas de las fotografías que componen la colección creada para el desarrollo de algoritmos de visión artificial.

Creación de la *DataSet* de imágenes inicial. Se creó una base fotográfica con cinco cultivos (trigo, avena, cebada, colza y maíz), incluyendo, en cada uno de ellos, las enfermedades más frecuentes cuyo control está condicionado a la aparición de los primeros síntomas en campo. A partir de ella se desarrolló un algoritmo más generalista, capaz de distinguir los primeros síntomas de un amplio grupo de enfermedades. Para las labores de validación, se usaron cuatro enfermedades de trigo (septoriosis, helmintosporiosis y roya parda y amarilla).

Segmentación y anotación manual de síntomas. Todas las imágenes fueron segmentadas por técnicos expertos en las enfermedades y adiestrados para este fin. Tal y como se presenta en la Figura 2, cada fotografía quedó codificada según la zona a analizar (hoja) y la zona con presencia de síntomas o signos de la o las enfermedades presentes.

Algoritmo de inteligencia artificial. Una vez desarrollado el algoritmo de visión artificial, se optimizó su precisión mediante diferentes configuraciones. Se adaptaron topologías de redes neuronales convolucionales para lidiar con distintas enfermedades de forma simultánea en estadios tempranos de la enfermedad, teniendo en cuenta el preprocesamiento, extracción de zonas de interés, aumento artificial de

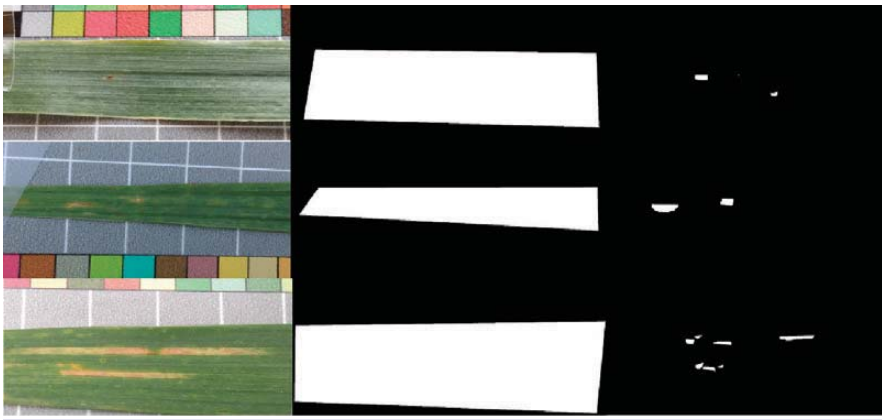


Figura 2. Proceso de segmentación manual de cada fotografía. *Izda.*: Imagen original; *Centro*: Hoja a analizar; *Dcha.*: Zonas de manchas o puntos característicos de las enfermedades.

Visión artificial y deep learning en diagnóstico de fitopatologías

Las técnicas de visión artificial y *deep learning* abren nuevas posibilidades para daños causados por plagas e incluso la identificación de plantas adventicias

la cantidad de datos disponibles, topología de la red y el diseño de una red completamente convolucional.

Validación del algoritmo. Un grupo de 20 agricultores y técnicos fueron los encargados de realizar las labores de validación del sistema, en Alemania y España. Usaron sus propios *smartphones* y una aplicación (App) diseñada para tal fin. En paralelo, todas las fotografías tomadas fueron finalmente revisadas por un experto de NEIKER para confirmar la operatividad del sistema, y se calculó su precisión contrastando los resultados con el algoritmo previamente definido.

Aplicación para Smartphone (App). Ha sido desarrollada una aplicación para *smartphone* que permite la adquisición de imágenes y el reconocimiento automático de las enfermedades presentes en la captura. La aplicación funciona con Android, iOS, y Windows Phone. Permite la identificación en menos de tres segundos y guarda todas las imágenes recogidas para desarrollos estadísticos posteriores y mejoras del sistema.

Conclusiones

Se ha desarrollado un algoritmo de visión artificial para identificación de enfermedades vegetales que ha sido validado en condiciones de campo para cuatro enfermedades de trigo: septoriosis (*Septoria tritici*), helmintosporiosis o *Tan Spot* (*Drechslera tritici-repentis*) y royas (*Puccinia striiformis* y *Puccinia recondita*) y ha sido adaptado a una aplicación para *smartphones*. La precisión del mismo se ha perfeccionado mediante el uso de una red convolucional basada en bloques residuales con diversas mejoras, incluyendo técnicas de aumento de datos y selección de zonas de interés, que ha permitido la identificación de enfermedades en estadios tempranos manteniendo una alta especificidad.

Los resultados observados en condiciones reales demuestran que nuestros valores de exactitud equilibrada (*Balanced Accuracy*-BAC) se han incrementado de 0,78 con la aproximación clásica, a BAC de 0,84 aplicando una topología CNN basada en una red residual sin ninguna mejora. Sin embargo, esto provocaba bajas especificidades que no permitían la detección correcta en estadios tempranos donde el BAC era de 0,78. La mejora en la estimación de confianza, la segmentación superpíxel y el entrenamiento con fondos aleatorios, incrementaron el desempeño del algoritmo hasta un BAC de 0,87 tanto para estadios tempranos como tardíos. El uso de técnicas de aumento de datos permitió obtener una mejora de un 2 % adicional. Nuestro algoritmo de visión artificial aplicando técnicas de *deep learning*, permite identificar los primeros síntomas de varias enfermedades de los vegetales bajo los condicionantes habituales encontrados por técnicos y agricultores en campo con una precisión superior al 96 % de acuerdo con los pilotos de campo realizados.

Las técnicas de visión artificial y *deep learning* sobre dispositivos móviles proporcionan una nueva herramienta para la identificación de enfermedades en estadios tempranos y abren nuevas posibilidades, también para daños causados por plagas e incluso la identificación de plantas adventicias.

El próximo paso de este equipo de trabajo será, además de validar el sistema de visión artificial sobre otras enfermedades, conocer en qué medida este desarrollo se convierte en una herramienta de apoyo para la aplicación eficiente de tratamientos fitosanitarios y contribuye a la reducción de uso de los mismos.

REFERENCIAS

[1] Di Cicco, M. *et al.* (2016). "Automatic Model Based Dataset Generation for Fast and Accurate Crop and Weeds Detection". *arXiv* 1612.03019v3.

[2] Hu, F. *et al.* (2015). "Transferring deep convolutional neural networks for the scene classification of high-resolution remote sensing imagery". *Remote Sens.* **7**: 14680-14707.

[3] Hughes, D. *et al.* (2015). "An open access repository of images on plant health to enable the development of mobile disease diagnostics". *arXiv*.1511. 08060.

[4] Krizhevsky, A., Sutskever, I. y Hinton, G. E. (2012). "ImageNet classification with deep convolutional neural networks". En: Pereira, F., Burges, C. J. C., Bottou, L., Weinberger, K. Q. (Eds.), *Advances in Neural Information Processing Systems* **25**: 1097-1105.

[5] Mohanty, S. P., Hughes, D. P. y Salathé, M. (2016). "Using deep learning for image-based plant disease detection". *Front. Plant Sci.* **7**: art.1419.

[6] Pound, M. P. *et al.* (2017). "Deep machine learning provides state-of-the-art performance in image-based plant phenotyping". *Gigascience* **6**: 1-10.

[7] Russakovsky, O. *et al.* (2015). "ImageNet large scale visual recognition challenge". *Int. J. Comput. Vision* **115**: 211–252.

[8] Sannakki, S. S. *et al.* (2011). "Leaf disease grading by machine vision and fuzzy logic". *Int. J. Comp. Tech. Appl.* **2**: 1709-1716.

[8] Siricharoen, P. *et al.* (2016). "A Lightweight Mobile System for Crop Disease Diagnosis". En: Campilho A. y Karray F. (Eds) *Image Analysis and Recognition ICIAR. Lecture Notes in Computer Science* **9730**: 783-791. Springer, Cham.

[8] Sladojevic, S. *et al.* (2016). "Deep neural networks based recognition of plant diseases by leaf image classification". *Comput. Intell. Neurosci.* **2016**: art. 3289801.

Todas las figuras han sido realizadas y pertenecen a los autores del artículo

Historias de la inmunología/ serología en España contadas por un fitopatólogo

Mariano Cambra Álvarez
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).
(jubilado)
Moncada (Valencia)

INTRODUCCIÓN

Érase una vez una Patología Vegetal que hasta la década de 1970 basaba los métodos de detección, diagnóstico y caracterización de agentes patógenos en observación de síntomas, inoculación mecánica de plantas indicadoras herbáceas o injerto de plantas indicadoras leñosas, transmisión por cuscuta o por vectores, aislamiento en medios de cultivo, microscopía óptica y electrónica, pruebas bioquímicas y fisiológicas, y en algunas pruebas inmunológicas o serológicas. Entre estas últimas, las más utilizadas eran: métodos de aglutinación simple o al látex o bentonita en tubo o portaobjetos, precipitación y difusión doble de Ouchterlony [Figura 1] y radial o de Mancini en medio con agar [Figura 2], inmunoelectroforesis e inmunofluorescencia indirecta.

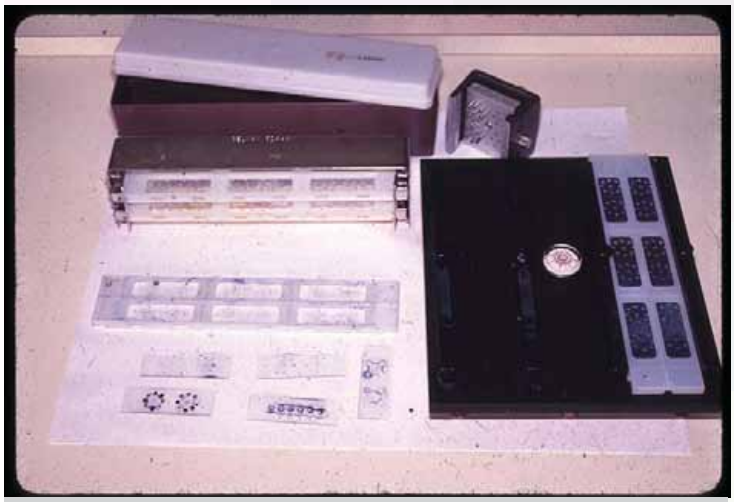


Figura 1. Equipo de inmunodifusión: mesa de nivel para el medio con agar en soportes de plástico para portaobjetos de cristal, tanques incubadores y troquel. En la parte inferior izquierda de la vetusta diapositiva, varios ejemplos ya desecados y teñidos de comparación de antígenos por inmunodifusión doble o de Ouchterlony (el antisuero diluido en el pocito central; y, alrededor, distintos antígenos para ser comparados) y titulación de antisueros en diluciones seriadas de los mismos.

En este relato, que no cuento histórico novelado o de ficción, me referiré a métodos inmunológicos (también conocidos comúnmente por serológicos), frecuentemente desarrollados en Europa, es decir, a aquellos métodos que están relacionados con la inmunización de animales para producir antisueros (anticuerpos policlonales), anticuerpos monoclonales específicos mediante la tecnología de hibridomas, y anticuerpos recombinantes. Pero también, especialmente el término 'serología', se refiere al uso de los anticuerpos producidos para detectar e identificar comparativamente antígenos (patógenos de plantas o sus metabolitos), y realizar estudios epidemiológicos para mejorar el control, pues a todo ello han contribuido significativamente, en especial desde 1976 hasta la actualidad, la inmunología y la serología aplicadas a la Fitopatología. En unas líneas veremos la razón de esa

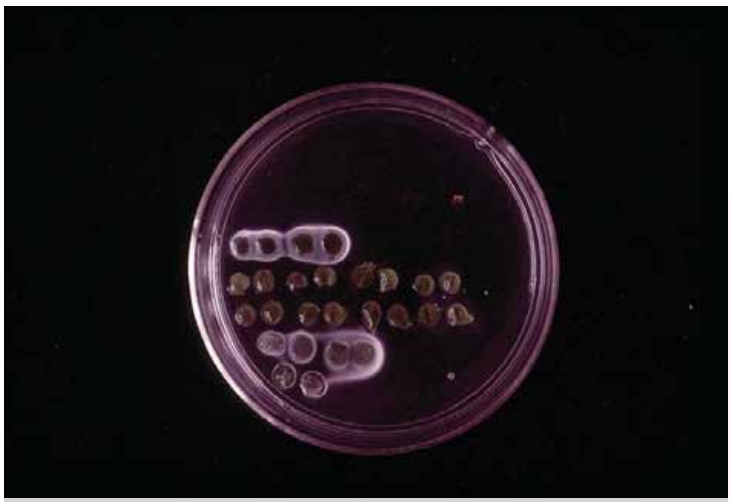


Figura 2. Inmunodifusión radial o de Mancini. Se observa un halo de precipitado alrededor de las muestras (extracto bruto o discos de hoja) infectadas, colocadas dentro del gel que contiene anticuerpos específicos del patógeno a detectar. Constituyó un intento de detección rutinaria de virus y bacterias en la época.

fecha concreta, tan lejana para muchos y tan próxima para otros con más experiencia.

El objetivo de los virólogos y bacteriólogos involucrados en inmunología básicamente ha sido la generación de anticuerpos y su uso mediante técnicas serológicas. Actualmente, la inmunología para los fitopatólogos incluye la producción, purificación y expresión de antígenos, producción de anticuerpos, así como la expresión de genes de anticuerpos en sistemas heterólogos para producción de "fitoanticuerpos" y el uso de los anticuerpos producidos en variados formatos en función del objetivo a conseguir.

El recorrido de la inmunología hasta su estado actual ha sido largo, pero prolífico en desarrollos científicos y tecnológicos y en su transferencia para resolver problemas. Estos hechos se han sucedido de manera muy rápida y en pocos años, debido a los sucesivos y significativos avances en inmunología/serología, que han revolucionado el diagnóstico, la detección y la caracterización de virus y bacterias, y han abierto el camino a su aplicación a otros patógenos de plantas.

En España fueron pioneros en la producción y uso de antisueros de interés en Fitopatología durante el periodo 1966-1976: Pedro Urquijo y Juan Rodríguez Sardiña, que los aplicaron a virus de la patata en la Estación de Fitopatología Agrícola de Magedondo, Centro Regional de Investigación y Desarrollo Agrario (CRIDA 01) de la Región Galicia y Norte del INIA (La Coruña, actual CIAM de la Xunta de Galicia); Genoveva Tejerina y Maite Serra, para bacterias, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)-Madrid; Pascual Cuñat, Enrique Hernández y Eduardo Primo, para el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia (IATA-CSIC); y los laboratorios de virología de Miguel Rubio-Huertos (CIB-CSIC)-Madrid y el de Antonio Peña en el CRIDA 06 del INIA-Madrid para su uso en inmunodifusión doble e inmunoelectromicroscopía. Pero su mayor aplicación fue para el control de la sanidad de la patata de siembra frente a virus, gracias al esfuerzo y dedicación de Antonio García Orad y Francisco Pérez de San Román, en la Granja Modelo o Estación de Mejora de la Patata de Arkaute, Vitoria (CRIDA 03 del INIA, actual Neiker). A los dos últimos, la SEF les reconoció sus contribuciones en este campo del conocimiento durante el X Congreso Nacional de Fitopatología celebrado en Valencia en 2000.

El recorrido de la inmunología hasta su estado actual ha sido largo, pero prolífico en desarrollos científicos y tecnológicos y en su transferencia para resolver problemas

En 1977, tras mi integración en el CRIDA 07 del INIA (actual IVIA), se creó un laboratorio de Inmunología con animalario donde se han realizado cientos de antisueros en conejo, para uso en Virología y Bacteriología y como servicio para otros centros; desde 1989, anticuerpos monoclonales y, a partir de 1994, anticuerpos recombinantes, pero todo ello se comentará en unas líneas más adelante.

Comenzaré estas historias por una de las técnicas serológicas más usadas en Bacteriología en la década de 1970:

La inmunofluorescencia (IF), una técnica todavía vigente

En su variante denominada IF indirecta se ha utilizado y se sigue aplicando en numerosos laboratorios europeos para la detección de bacterias[15]. Esta técnica de inmunomarcado de antígenos fijados en un portaobjetos, utiliza en primer lugar anticuerpos específicos y posteriormente inmunoglobulinas *anti* la especie animal utilizada en primer lugar, marcados con sustancias fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, ferritina, etc.), que al ser epiiluminadas con luz ultravioleta permiten visualizar las células bacterianas [Figura 3]. Aunque subjetiva, es sensible (10^3 células/ml) pero su especificidad depende de la de los anticuerpos empleados. Se utiliza en España desde 1975 (CIB-CSIC), se le dio un importante impulso a partir de 1977 (Bacteriología del actual IVIA) y se continúa utilizando en Laboratorios de Diagnóstico de diferentes CC. AA., principalmente en Aldearrubia (Salamanca) y Neiker (Vitoria) para bacterias de la patata (*Ralstonia solanacearum* y *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), ya que está recomendada en las Directivas europeas sobre estos patógenos y en protocolos internacionales de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

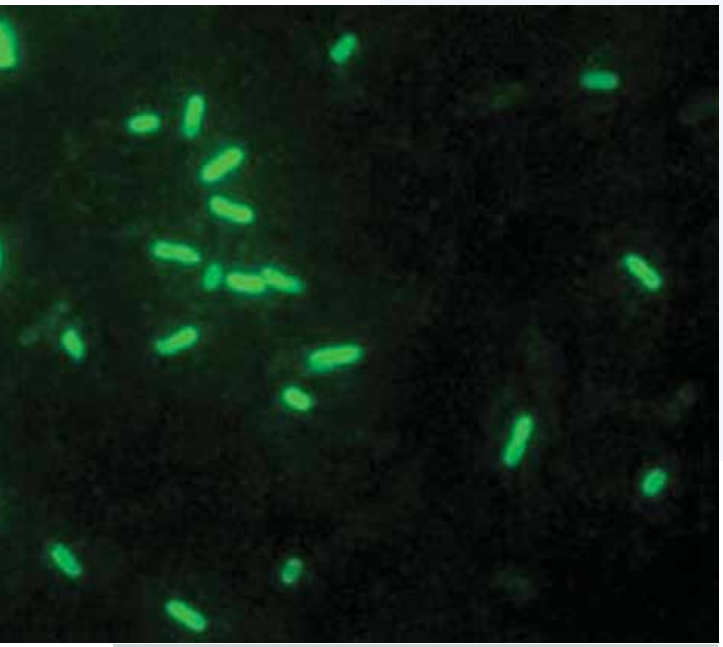


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta. Células de *Xylophilus ampelinus* de una viña enferma de necrosis bacteriana. Al ser epiiluminados con UV, aparecen fluorescentes las células bacterianas reconocidas por los anticuerpos específicos.

La primera revolución en inmunología/serología: el método ELISA

El método inmunoenzimático EIA (acrónimo de "inmunoensayo enzimático", en inglés) comenzó en 1969 al ponerse a punto la conjugación de enzimas a proteínas mediante el uso del glutaraldehído, para detectar intracelularmente antígenos y anticuerpos. Su uso en microplacas de titulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (antes se realizaba habitualmente en tubos), se debe a Voller *et al.* (1974)[24] que lo aplicó a la detección de la malaria. En 1976 lo denominaron ELISA (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*) y, en su formato de doble sándwich de anticuerpos (DAS), se aplicó por vez primera a la detección de virus de frutales (*Arabis mosaic virus*, ArMV; y *Plum pox virus*, PPV) por Voller *et al.* (1976) [23] y Clark y Adams (1977) [6]. Posteriormente, se aplicó a otros patógenos de plantas, virus y bacterias, citados en revisiones por Garnsey y Cambra (1991, 1993)[9,10], Cambra *et al.* (1996, 2011)[3,2]. En todos los casos se utilizaron extractos brutos no purificados, lo que constituyó una enorme ventaja al no tener que tratar la muestra [Figura 4]. Por cierto, la actual y popular pipeta automática de pistón fue patentada en 1965 por Heinrich Schnitger (Universidad de Marburgo, Alemania) y distribuida inicialmente por Eppendorf y después por Gilson en su variante de volumen variable y puntas desechables de plástico (1972). Esta pipeta jugó un papel clave en el desarrollo

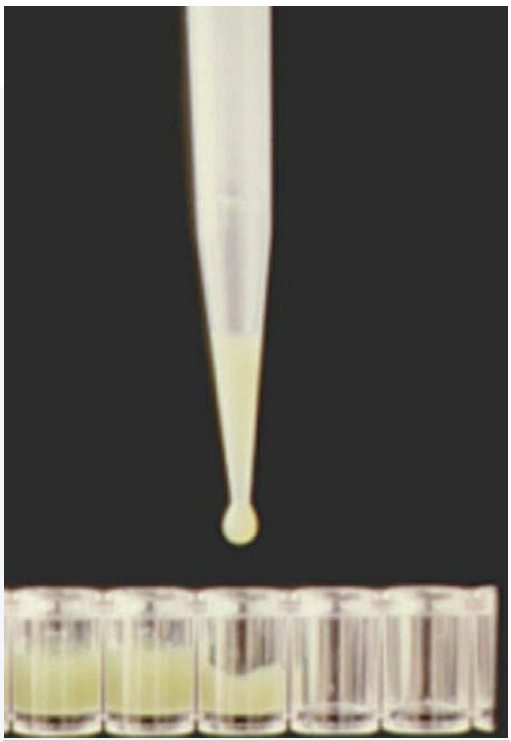


Figura 4. Dispensado de 0,2 ml de extracto bruto/pocillo de placa ELISA (96 pocillos 8x12) con la ayuda de una pipeta automática de pistón y cono desechable de plástico.

Figura 5. Inicialmente, se efectuaba la lectura de placas ELISA visualmente, una vez frenada o paralizada la reacción por adición de 50 microlitros/pocillo de NaOH 10M. También se leían trasvasando el contenido de cada pocillo a una microcubeta para determinar la absorbancia o densidad óptica en un espectrofotómetro a 405 nm para el color amarillo de la fosfatasa alcalina, y obtener así valores ELISA cuantitativos.

de la técnica ELISA. La primeras pipetas automáticas se adquirieron en España en 1974 (Centro Nacional de Biotecnología e INIA-Patología Animal, Madrid) y en 1977 en el IVIA para nuestro laboratorio de serología. Las pipetas multicanal aparecieron en 1978 para adaptarse a la tecnología ELISA en pleno desarrollo en el sector sanitario.

Como curiosidad premonitoria del auge que tendría en España el método ELISA, merece la pena recordar que casualmente fue presentado por vez primera por A. Voller, A. Bartlett y D. Bidwell durante el "3rd International Congress of Virology" celebrado en Madrid en 1975. Unos años más tarde, el Dr. Alister Voller fue invitado al INIA de Madrid en 1980, con motivo del 1er Simposio ELISA, organizado por José Manuel Sánchez-Vizcaíno y por mí, para divulgar el método en Medicina y Patología Animal y Vegetal. Nos comentó que lo denominaron así ya que buscaron un acrónimo femenino y que pudiera pronunciarse fácilmente en la mayoría de idiomas. A este primer simposio siguieron otros en 1981 y 1982 organizados por los mismos anteriores y el médico Ignacio Moneo del Hospital Ramón y Cajal-Madrid.

Además, en una serie de cursillos teórico-prácticos, organizados por el INIA, se dio a conocer la técnica a nivel nacional en distintos ámbitos científicos e industriales y se publicó la primera monografía sobre ELISA en Patología Animal y Vegetal por el INIA (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1981)[17], que despertó gran interés en la época. En 1987 se tradujo al francés e inglés a requerimiento de la Office International des Epizooties (OIE), que lo publicó. Pero aquel era un país con una administración central, coordinada por el Ministerio de Agricultura y el INIA en aspectos relacionados con la Fitopatología y la Sanidad Vegetal, donde era posible realizar fácilmente estas actividades a nivel nacional.

En España, el primer laboratorio ELISA para Fitopatología se montó en septiembre de 1977 en Virología e Inmunología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del CRIDA 07 del INIA (actual IVIA), tras mi incorporación al Centro. Al principio se leían las placas pocillo a pocillo muy rudimentariamente [Figura 5] y después, en 1978, se adquirió un lector automático de placas [Figura 6] y un homogeneizador de vástago Polytron para muestras leñosas [Figura 7], que facilitaron enormemente el trabajo. El segundo laboratorio ELISA se creó en 1978 en la Estación de Mejora de la Patata CRIDA 03 del INIA en Arkaute, Vitoria (actual Neiker), para seleccionar patata de siembra libre de virus. El tercer laboratorio se estableció en 1980 en el Servicio de Sanidad Vegetal de Montequinto (Sevilla) para evaluar la viabilidad de un programa de erradicación del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en Andalucía. El cuarto laboratorio se estableció en 1981 en el Servicio de Sanidad Vegetal de Silla (Valencia) para realizar una amplia prospección de CTV a nivel de tér-

Figura 6. El uso de lectores automáticos permitió realizar cinéticas de la reacción y aplicar la técnica ELISA a miles de muestras de una forma objetiva (cuantitativa). En la imagen, el primer lector adquirido en el IVIA en 1978.

Figura 7. La preparación de muestras de plantas leñosas en homogeneizadores de vástago tipo Polytron®, permitió analizar más fácilmente extractos y popularizar la detección y diagnóstico en dichos cultivos.

mino municipal en la Comunidad Valenciana; tenía el objetivo de proporcionar consejos a los agricultores en función de la prevalencia del virus, para el cambio de una citricultura clásica a una moderna que debía de estar basada en el uso de variedades libres de virus injertadas sobre patrones seleccionados, sanos y tolerantes al síndrome de tristeza. Se diseñó una verdadera fábrica de realizar análisis ELISA, que era capaz de procesar 900 árboles/día con resultados en 24 horas gracias a un equipo de tres operarios homogeneizadores [Figura 8], lavador y lector automático de placas. El test habitual hasta entonces consistía en inocular por injerto plantas indicadoras de lima mexicana que, tras 6-8 meses de cultivo en invernadero climatizado, permitían saber por sus síntomas, si el árbol analizado estaba libre de CTV en el momento de toma de la muestra. Como una potente citricultura como la española no se podía permitir exclusivamente un sistema de detección tan lento, se implantó este método serológico y se pasó de analizar unos 600 árboles/año por injerto a 4500 árboles/semana por ELISA. Ello indica claramente alguna de las ventajas de la técnica (rapidez diagnóstica y capacidad de uso masivo). Pero además, el coste de una prueba biológica en plantas indicadoras para análisis de CTV pasó de ser (entonces, en pesetas) el equivalente a unos 48 €/árbol mediante inoculación de plantas indicadoras a 1,3 €/árbol por ELISA con extractos y a 0,12 €/impresión por inmunoimpresión-ELISA, como se relata más tarde.

El método revolucionó la detección y diagnóstico de patógenos de plantas al permitir su aplicación masiva a gran número de muestras de forma simple, cuantitativa (objetiva), semiautomática y económica. Se pudieron analizar miles de muestras durante prospecciones, campañas de erradicación y reducción de inóculo, controles en viveros y para el control cuarentenario y selección sanitaria de plantas madre sanas. El método se popularizó a partir de 1987 en la práctica totalidad de Laboratorios de Diagnóstico de las CC. AA. y en muchos Centros de Investigación. Adquirió especial relevancia en virología de plantas leñosas y otros cultivos de multiplicación vegetativa, desplazando completamente a otros métodos por su sencillez, robustez, bajo coste y sensibilidad, a pesar de que el uso de anticuerpos policlonales de antisueros, frecuentemente presentaba serios problemas de especificidad, que limitaban su uso extensivo y fiabilidad.

La tecnología de hibridomas para generar anticuerpos monoclonales específicos

La producción y uso de anticuerpos monoclonales específicos constituyó una segunda revolución en inmunología aplicada a Patología Vegetal, al aportar, además de total especificidad, una gran sensibilidad.

Figura 8. Tres operadores con homogeneizadores de vástago en el laboratorio de ELISA diseñado en 1981 en el servicio de Sanidad Vegetal de Silla (Valencia), para análisis masivo de muestras de especies leñosas. Permitía analizar 900 árboles/día.

El uso de anticuerpos monoclonales específicos constituyó una segunda revolución en inmunología aplicada a Patología Vegetal

La introducción del procedimiento para "inmortalizar" células secretoras de anticuerpos (linfocitos) de animales (ratones) inmunizados, mediante su fusión con células tumorales de mieloma, dio como resultado la tecnología de hibridomas[17], por la que les concedieron el premio Nobel de Medicina en 1984 a los británicos Georges Köhler y Niels Jerne y al argentino César Milstein. Las células de hibridomas combinan dos rasgos parentales: la producción de anticuerpos específicos de un único epítopo o determinante antigénico y el crecimiento y cultivo continuo *in vitro*. Esta sofisticada tecnología permite la producción ilimitada de grandes cantidades del mismo anticuerpo específico de forma reproducible. Se les denomina anticuerpos monoclonales ya que son segregados por un único clon celular y, consecuentemente, son homogéneos. Un anticuerpo monoclonal reconoce o reacciona con un único epítopo del antígeno con el que se inmunizó al ratón Balb/c donante.

En 1983-84 se produjeron, patentaron y comercializaron anticuerpos monoclonales específicos de CTV, y de los virus X e Y de la patata y del virus de la sharka

La tecnología de hibridomas fue aplicada internacionalmente por muy escasos laboratorios de Patología Vegetal y empresas de diagnóstico en la década de 1980-1990. Las primeras aplicaciones en Fitopatología las realizaron Briand *et al.* (1982)[1] y Gugerli y Fries (1983)[12]. En España fueron pioneros y los únicos laboratorios que han producido anticuerpos monoclonales útiles para Fitopatología, la empresa Inmunología y Genética Aplicada (Ingenasa) de Madrid, y el Laboratorio de Virología e Inmunología del actual IVIA. La acertada visión del INIA en 1983 llevó a la firma de un convenio entre la entonces empresa pública del grupo INI (Instituto Nacional de Industria) Ingenasa y el actual IVIA, para la producción de anticuerpos monoclonales frente a virus que afectaban a cultivos estratégicos del país. Así en 1983-84 se produjeron, patentaron y comercializaron anticuerpos monoclonales específicos de CTV[20], y después, de los virus X e Y de la patata y del virus de la sharka (PPV). En el actual IVIA se produjeron desde 1989 anticuerpos monoclonales específicos de la bacterias *Xylophilus ampelinus*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* y otros de *Plum pox virus*-PPV (anticuerpo 5B-IVIA/AMR), todos ellos de referencia internacional y muchos patentados. Muy recientemente las empresas españolas Plant Print Diagnòstics SL, en colaboración con Ingenasa, han producido anticuerpos monoclonales específicos frente a la bacteria emergente *Xylella fastidiosa*, patógeno que pone en peligro cultivos estratégicos españoles.

La distribución internacional de los kits de diagnóstico basados en anticuerpos monoclonales ha estado siempre en mano de empresas españolas (Ingenasa, Madrid; Durviz Comercio Exterior, Paterna, Valencia; AMR Lab España, Valencia y Barcelona; y Plant Print Diagnòstics SL, Guadassuar, Valencia) aunque los han distribuido las principales empresas internacionales de diagnóstico como Bioreba-Suiza, Adgia-EE.UU., Agritest-Italia y Loewe-Alemania, por su calidad y para completar el catálogo de patógenos de cuarentena.

El impacto de la técnica ELISA basada en anticuerpos monoclonales sobre el diagnóstico, detección e identificación de patógenos de plantas ha sido enorme, confiriéndole especificidad, sensibilidad y anticuerpos caracterizados en lotes idénticos en el tiempo, a un precio/muestra sostenible. Para dar una idea de su repercusión, baste citar el número de análisis realizados con anticuerpos generados en España para algunos patógenos. Para detección y diagnóstico de CTV se estima que se han realizado desde 1985 más de 4,5 millones de análisis ELISA con los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 en España y casi un millón adicional en otros países. Otro anticuerpo monoclonal español que ha tenido mucha aceptación por su es-

pecificidad, avidez y por reaccionar frente a todos los tipos descritos de PPV (sharka) es el 5B-IVIA/AMR y la secuencia del epítopo que reconoce ha sido patentada y publicada. Se estima que se han realizado, desde su obtención en 1993, más de 3,5 millones de análisis en España y unos 5 millones en otros países especialmente en Canadá y EE. UU., donde ha servido de base en los inicios de sus programas de erradicación del virus. Estos anticuerpos monoclonales, así como la mayoría de los producidos en España, han sido validados y aparecen como recomendados en protocolos o estándares de detección y diagnóstico internacionales de la EPPO y de la International Plant Protection Convention (IPPC) de la FAO.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales producidos en ratón ha permitido configurar distintos formatos de ELISA con anticuerpos policlonales (de conejo o cabra). Estas variantes están muy adaptadas para distintos fines y según la posibilidad de producción o adquisición de anticuerpos de los usuarios. Dicha versatilidad ha permitido configurar diversas variantes de ELISA directa (D), indirecta (I), doble sándwich de anticuerpos (DAS) y doble sándwich de anticuerpos indirecto (DASI) también denominado triple sándwich de anticuerpos-TAS[32], aunque las más populares para detección son DAS y DASI con extractos y D (versión inmunoimpresión).

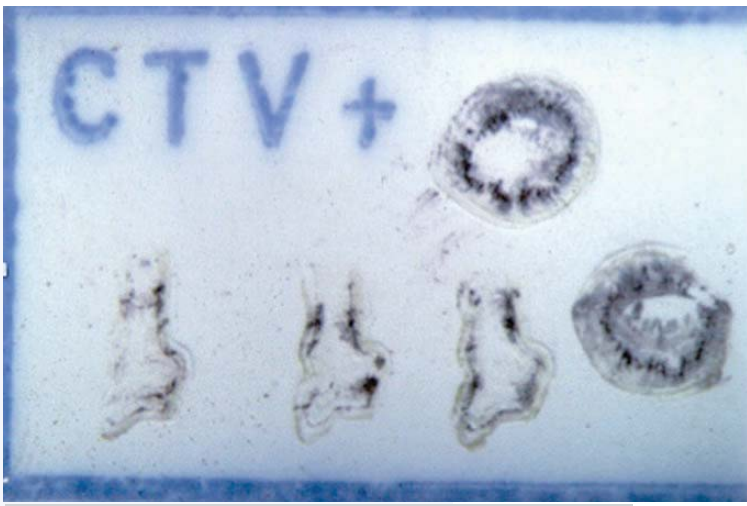


Figura 10. Inmunoimpresión o *Tissue print*-ELISA de testigo positivo del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) contenido en el kit. Se observan acúmulos de precipitado violáceo en el floema de la sección impresa de un brote, correspondientes a epítopos de la capsida proteica del virus reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

Para la detección de virus o bacterias, la inmunoimpresión directa-ELISA (Direct Tissue Blot Immuno Assay-DTBIA o Tissue-print ELISA®) permite detectar y localizar antígenos en improntas o impresiones realizadas en membranas de nitrocelulosa. Todo ello sin realizar extractos y mediante un método sencillo que posibilita su ejecución por personal no especializado en técnicas de laboratorio, ya que el kit comercial desarrollado en 1994 por convenio entre Plant Print Diagnòstics e IVIA [Figura 9], contiene todo lo necesario incluso testigos impresos en la membrana, para realizar la prueba en horas. Este método, aplicado y desarrollado comercialmente en España, ha popularizado el diagnóstico y detección en viveros de cítricos. El sistema es discreto, muy económico, no precisa laboratorio y pueden revelarse las membranas en un espacio reducido, o incluso ser enviadas por correo para su revelado y es muy útil para localizar proteínas de patógenos, o incluso ARN de doble cadena viral en secciones de tejidos [Figuras 10 y 11]. El método en forma de kit comercial es muy utilizado por viveristas de cítricos para detección de CTV [Figuras 12, 13, 14 y 15] y en otros cultivos como tomate para detección de virus. La lectura de membranas se realiza a simple vista o con ayuda de una lupa binocular, pues fácilmente se distinguen las muestras positivas de las negativas [Figura 16]. Se estima en más de medio millón las plantas/año que son analizadas por los propios viveristas con un coste de unos 20 céntimos/planta. Esta técnica permite el análisis individual de plantas inmediatamente antes de una exportación concertada y garantiza la ausencia del virus

Figura 9. Kits completos de inmunoimpresión que contienen testigos impresos, membranas, tampones y substrato para revelar las improntas impresas (*Imagen* cedida por Plant Print Diagnostics de su página web www.plantprint.net).

Figura 11. Inmunolocalización de ARN de doble cadena en el floema de una sección de tallo joven de naranjo dulce infectado por el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), impresa en nitrocelulosa y revelada con anticuerpos anti-polinucleótidos sintéticos por inmunoimpresión-ELISA.

de la tristeza en el material analizado individualmente. Este sistema validado es más sensible que la técnica ELISA convencional, puesto que no usa extractos que pueden inhibir la reacción o modificar epítopos y no posee riesgos de contaminación cruzada entre muestras.

Otra interesante variante la constituye el denominado enriquecimiento-ELISA-DASI para la detección de bacterias. Dado que la sensibilidad de la técnica convencional a veces no es la deseada, en una fase previa las bacterias de la muestra son incubadas en un medio semiselectivo o selectivo, para su enriquecimiento o multiplicación, que puede efectuarse en la misma microplaca ELISA. Luego, las bacterias diana son capturadas con anticuerpos policlonales y, finalmente, se detectan por anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fosfatasa alcalina, garantizándose así la especificidad de la detección de la bacteria diana aunque esté entre otras enriquecidas. Su sensibilidad es de hasta 10 ufc/ml en la muestra inicial[15].

Actualmente existe una cierta tendencia a utilizar tiras diagnósticas de flujo lateral basadas en anticuerpos de alta especificidad y, a pesar de su menor sensibilidad comparado con ELISA convencional o inmunoimpresión-ELISA y su elevado precio/muestra, cumplen su papel al ser de uso sencillo y obtener el resultado en unos minutos incluso en condiciones de campo o aduana. Todas estas últimas posibilidades serológicas, sencillas para el usuario, han sido revisadas y recomendadas[7].

La última revolución en inmunología: la ingeniería de anticuerpos, clonado y expresión de genes de anticuerpos

La producción de anticuerpos funcionales (inmunoglobulinas G) en plantas transgénicas la describieron Hiatt *et al.* (1989)[13]. Al principio de la década de 1990, el clonado y expresión de genes de anticuerpo revolucionó la tecnología de producción de anticuerpos, ya que minimiza o incluso elimina el uso de animales de laboratorio. En la actualidad, el uso de animales para producir anticuerpos, se regula con normas legales que tienden a evitar su sufrimiento, a incrementar la eficiencia y a disminuir costes de su producción. Un anticuerpo recombinante es cualquier molécula, expresada en un sistema heterólogo, que sea capaz de reconocer o unirse específicamente a epítopos en moléculas antigénicas o no. En contraste con los anticuerpos derivados de antisueros o de cultivo de hibridomas, se hizo patente la posibilidad de generar fragmentos de anticuerpo o anticuerpos completos recombinantes sintéticamente, e incluso su uso para inmunomodular la infección por patógenos en plantas transgénicas que los expresen. Una

Figura 12. Toma de muestras en Viveros Valencia de cítricos realizada por los viveristas. Hojas de la planta madre a analizar (4-10 según tamaño de la planta) son insertadas en un alambre para, posteriormente en laboratorio, proceder a la impresión de una sección fresca de su peciolo y su revelado.

Figura 13. Ristra de hojas de cítricos insertadas en alambre para su análisis por inmunoimpresión-ELISA en laboratorio. La imagen da idea del número de muestras que es posible analizar por esta técnica de una forma sencilla, sensible y económica.

completa revisión del tema ha sido publicada por la SEF[11] y merece la pena citar las contribuciones españolas de Terrada *et al.* (2000)[19] [Figura 17], que demostró que se pueden generar anticuerpos recombinantes e incluso conjugados, que muestran la misma o mayor eficacia de reacción en ELISA que los anticuerpos convencionales. La interferencia de anticuerpos recombinantes con la infección viral la demostraron Tavladoraki *et al.* (1993)[18] y fue aplicada en nuestro país por Esteban *et al.* (2003)[8] con fragmentos scFv de anticuerpo contra la ARN replicasa NIb de PPV, y por Cervera *et al.* (2010)[5] en limas mexicanas transgénicas resistentes al CTV, por expresión de una versión recombinante de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5.

Pero no todo lo que reluce es ELISA. Para finalizar las loas a la serología hay que reseñar que también son frecuentes los revelados serológicos, tras separación electroforética o inmunoelectrotransferencia con anticuerpos marcados con digoxigenina, y que durante muchos años se realizaron métodos de captura con anticuerpos previos a PCR convencional (inmunocaptura-PCR), o se siguen empleando anticuerpos marcados con oro coloidal o metales pesados en inmunoelectromicroscopía.

Epílogo o desenlace

La demanda e interés de la inmunología/serología en Fitopatología, llevó a la organización en el IVIA de dos cursos internacionales del programa BRIDGE patrocinado por la EU. Sin embargo, el riesgo es que en una futura edición de esta historia comencemos por "Érase una Patología Vegetal con escasos fitopatólogos duchos y expertos en serología", que inexorablemente llevará al análisis de un menor número de muestras de forma sostenible y me temo que esto refleja la realidad vigente. Lo actualmente popular son las técnicas de amplificación molecular que tienen indudables ventajas y se divulga que son muy sensibles, pero el coste de su sensibilidad son los falsos positivos. Claro está que el coste de la especificidad serológica puede ser la presencia de falsos negativos. No obstante, en el equilibrio está la virtud (precisión o exactitud) y los altos valores predictivos de positivos y negativos[16,21,22]. Por ello, la EPPO requiere, para confirmar casos críticos o en transacciones económicas de alto valor o para la publicación oficial de la introducción de un nuevo patógeno, realizar los análisis por dos métodos basados en distintos principios biológicos. Normalmente, en virología, por una técnica basada en

Figura 14. Toma de muestras en Viveros Alcanar de cítricos: dos operarios toman muestras que son impresas en invernadero y posteriormente reveladas por los mismos operarios (1400 plantas/día) mediante inmunoimpresión-ELISA.

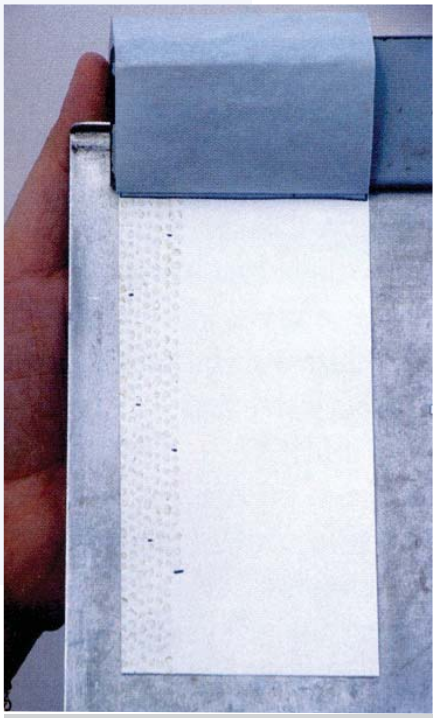


Figura 15. Aspecto de una membrana en la que se han ido impresionando secciones frescas de peciolo de hoja (dos/plantón de vivero) en campo o invernadero. Se suelen imprimir de 1000 a 1100 peciolos/membrana de 7x13 cm.

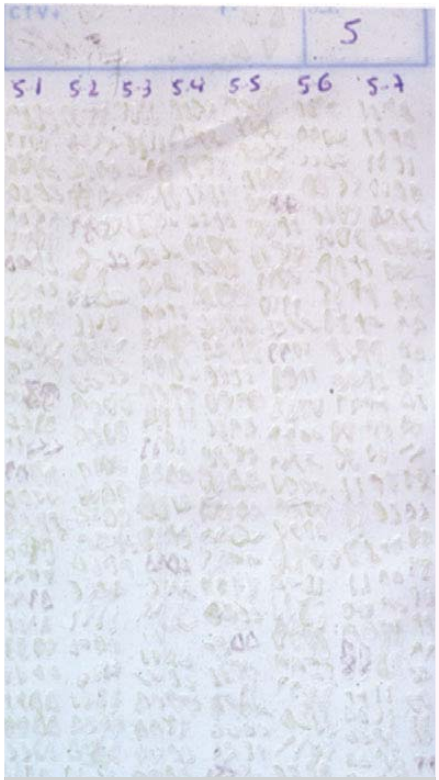


Figura 16. Membrana revelada en la que se pueden apreciar la impresión (2 brotes/planta x 2 impresiones/brote que resultan en 4 improntas/planta) de secciones frescas de brotes. Las muestras positivas muestran coloración. Normalmente los viveristas realizan unas 820 impresiones de brote/membrana que corresponde al análisis de 205 plantas/membrana. Es más popular el uso de peciolos de hoja pues supone más muestras (aproximadamente 1050/membrana) y es menos destructivo para la planta.

PCR y por una serológica, a ser posible con anticuerpos monoclonales específicos.

En España el IVIA ha liderado la campaña para comparar y validar las denominadas técnicas moleculares con las serológicas con parámetros de diagnóstico adecuados (no solo sensibilidad y especificidad). La conclusión es que, frecuentemente, el criterio de referencia alterna entre una técnica molecular o una serológica, especialmente si se tiene en cuenta para la elección de una técnica de detección la prevalencia del patógeno, como se efectúa en Sanidad Humana y Veterinaria. Unos ejemplos claros son los evaluados para CTV y PPV por algunos autores[16,4,21,22].

Frente a una alta prevalencia esperada del patógeno, suele ser más adecuado emplear la técnica más sensible; pero si se espera una baja prevalencia, es más conveniente usar la técnica más específica. Esto es justo lo contrario de lo que se suele aplicar en muchos laboratorios de Patología Vegetal al diseñar una prospección. Igualmente, si se desea evitar la entrada de un patógeno en frontera (cuarentena), la aplicación de la técnica más sensible es recomendable aunque pueda conducir a falsos positivos. Otros criterios son el económico y de cribado: la realización de numerosos controles por la técnica más específica es más efectiva, para conocer la realidad, que la realización de escasos análisis por la técnica más sensible. Ello atañe actualmente a la detección de *Xylella fastidiosa*, por ejemplo, donde se realizan análisis casi exclusivamente por PCR en tiempo real (aproximadamente a 7 €/muestra sin contar amortización de equipos) y se efectúan escasas pruebas serológicas de muy inferior coste y gran sencillez, especialmente si se emplean reactivos específicos como los anticuerpos monoclonales ahora disponibles. Esta filosofía serológica permitiría analizar rutinariamente miles de plantas de vivero, incluso privadamente y, tras resultados negativos, realizar algunos tests por PCR para certificar la ausencia del patógeno en una amplia zona o vivero y avanzar así en el conocimiento rápido de la situación para el control efectivo

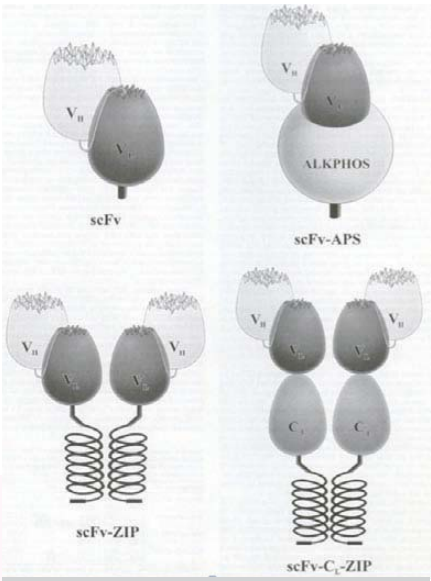


Figura 17. Representación figurada de las proteínas globulares obtenidas por ingeniería genética que conforman un fragmento scFv de anticuerpo recombinante (Vl y Vh, cadena variable ligera y pesada, respectivamente enlazados por un péptido de unión), de conjugados recombinantes con fosfatasa alcalina (alkaphos) como producto de fusión y de minianticuerpos estabilizados con cremallera de leucina (zip) (Tomada de Terrada *et al.* 2000, *Phytopathology* **1013**, 1337-1344; acceso abierto).

de las enfermedades que causa y poder tomar las medidas más adecuadas para su prevención, contención y erradicación, con base científica, que no solamente política.

La pasión me ha desbordado y temo que me he extendido más de lo aconsejado y deseable. Por ello pido disculpas a los pacientes lectores y a los editores de la SEF. Gracias a todos los que han contribuido a ensanchar los conocimientos sobre la inmunología/serología en España y, especialmente, a los que durante los últimos 45 años han inmunizado animales, generado anticuerpos monoclonales o recombinantes y comparado técnicas en los laboratorios del IVIA, Ingenasa y en los laboratorios oficiales de Diagnóstico de las CC. A.A.

REFERENCIAS

1 Briand, J. P., Al-Moudallal, Z. y van Regenmortel M. H. V. (1982). "Serological differentiation of tobamoviruses by means of monoclonal antibodies". *J. Virol. Methods* **5**: 293-300.

2 Cambra, M. *et al.* (2011). "Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses". Capítulo 55, pp. 303-313. En: *Virus and virus-like diseases of pome and stone Fruits*. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Eds). APS Press, St. Paul, MN, EE. UU. 429 pp.

3 Cambra, M., Gorris, M. T. y Terrada, E. (1996). "Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus". Capítulo 7, pp. 207-254. En: *Patología Vegetal*. G. Llácer, M. M. López, A. Trapero, A. Bello (Eds.). SEF, Phytoma-España, Valencia. 1165 pp.

4 Capote, N. *et al.* (2009). "Direct sample preparation methods for detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR". *Int. Microbiol.* **12**: 1-6.

5 Cervera, M. *et al.* (2010). "Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance". *Transgenic Res*. **19**: 1001-1005.

6 Clark, M. y Adams, A.N. (1977). "Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses". *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.

7 De Boer, S. y López, M. M. (2012). "New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring". *Ann. Rev. Phytopathol*. **50**: 197-218.

8 Esteban, O. *et al*. (2003). "Generation and characterisation of functional recombinant antibody fragments against RNA replicase NIb from plum pox virus". *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **301**: 167-175.

9 Garnsey, S. M. y Cambra, M. (1991). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens" Capítulo Part III, Laboratory methods for detection of CGTPs, pp. 193-216. En: *Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis*. C. N. Roistacher (Ed.). International Organization of Citrus Virologists (IOCV) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Distribution and Sales Section. Roma. 286 pp.

10 Garnsey, S. M. y Cambra, M. (1993). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", Capítulo Serology, pp. 169-192. En: *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. G. P. Martelli (Ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Distribution and Sales Section. Roma. 263 pp.

11 Gil, M. *et al.* (2008). "Anticuerpos recombinantes en Patología Vegetal". pp 437-455. En: *Herramientas biotecnológicas en Fitopatología*. Capítulo 24. Vicente Pallás, Carolina Escobar, Pablo Rodríguez Palenzuela, José F. Marcos (Eds.). SEF, Mundi-Prensa, Madrid. 464 pp.

12 Gugerli, P. y Fries, P. (1983). "Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for detection". *J. Gen. Virol.* **64**: 2471-2477.

13 Hiatt, A., Cafferkey, R. y Bowdish, K. (1989). "Production of antibodies in transgenic plants". *Nature* **342**: 76-78.

14 Köhler, G. y Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity". *Nature* 256: 595-597.

15 López, M. M., Palacio-Bielsa, A. y Roselló, M. (2018). "Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas". pp 125-155. En: *Enfermedades de plantas causadas por bacterias*. M. M. López, E. Murillo, E. Montesinos, A. Palacio-Bielsa (Eds.). SEF-Bubok, Madrid. (pendiente de publicarse).

16 Olmos, A. *et al.* (2008). "An evidence-based approach to *Plum pox virus* detection by DASI-ELISA and RT-PCR in dormant period". *Virology Res. Treatment* **1**: 1-8.

17 Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Cambra, M. (1981). *Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal*. Monografías INIA nº 29. INIA, Madrid. 57 pp.

18 Tavladoraki, P. *et al.* (1999). "A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both Escherichia coli and transgenic plants". *Eur. J. Biochem*. **262**: 617-624.

19 Terrada, E. *et al.* (2000). "Fully 'recombinant enzyme-linked immunosorbent assays' using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of Citrus tristeza virus". *Phytopathology* **1013**: 1337-1344.

20 Vela, C. *et al.* (1986). "Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis". *J. Gen. Virol*. **67**: 91-96.

21 Vidal, E. *et al.* (2012a). "Estimation of the accuracy of two diagnostic methods for the detection of Plum pox virus in nursery blocks by latent class models". *Plant Pathol.* **61**: 413-422.

22 Vidal, E. *et al.* (2012b). "Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of Citrus tristeza virus. A model for other plant pathogens". *Phytopathology* **102**: 114-121.

23 Voller, A. *et al.* (1976). "The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *J. Gen. Virol.* **33**: 165-167.

24 Voller, A. *et al.* (1974). "A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria". *Bull. Wld. Hlth. Org*. **51**: 209-211.

...al Dr. Miguel Á. Cambra Álvarez

El Dr. Miguel Ángel Cambra Álvarez fue jefe del Laboratorio de Diagnóstico fitopatológico del Gobierno de Aragón desde 1982 hasta su reciente jubilación en febrero de 2017. Fue socio de la SEF desde 1987, vocal de la Junta desde 1999 a 2003 y socio fundador del Grupo Especializado en Diagnóstico, Detección e Identificación GEDDI-SEF. En esta entrevista nos revelará su trayectoria profesional, los retos y logros obtenidos en su vasta carrera investigadora y sus experiencias en el mundo de la Fitopatología.

... por Nieves Capote

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA Centro "Las Torres"). Alcalá del Río, Sevilla

¿Nos puedes hacer un breve resumen de tu trayectoria profesional?

Finalicé los estudios en la ETSI Agrónomos de Madrid en 1979, y busqué, sin una vocación clara, trabajos relacionados con la zootecnia ya que "los bichos" me gustaban desde niño. Por entonces, las cosas en materia de empleo estaban mejor que ahora, pero lo que ofrecía el mercado laboral para los que empezábamos eran fundamentalmente pequeños proyectos de construcción de naves para ganado, riegos, revestimiento de acequias y similares, en los que participé realizando mis primeras incursiones profesionales.

En 1981 conseguí un contrato como radarista en la lucha antigranizo. Estuve durante dos campañas, de mayo a octubre cada una, localizando y midiendo la altura, densidad y recorrido de los cúmulos-nimbos con un radar ubicado en el pico de San Caprasio de la Sierra de Alcubierre (Huesca), de 1000 metros de altitud, a 17 km de sitio habitado, al que se accedía por pistas de tierra. Las contrataciones se realizaron en el marco de un convenio existente entre el Ministerio de Agricultura, Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica, y la Diputación Provincial de Zaragoza. Fue una experiencia inolvidable; había que tener vocación de eremita para mantenerte día tras día en aquel solitario monte viendo venir las tormentas.

En 1981 conseguí un contrato como radarista en la lucha antigranizo

En 1982, la Diputación General de Aragón, como ente preautonómico, no podía contratar personal, por lo que se buscó la fórmula de becas de formación para trabajar en Sanidad Vegetal. Esa fue mi verdadera oportunidad. Se publicó una convocatoria para seleccionar a los becarios que trabajarían en esta área y conseguí una de las becas. Desde entonces y hasta mi jubilación he vivido en este mundo de la fitopatología, siempre en el laboratorio de diagnóstico y prospecciones fitosanitarias. Vamos, que nací, crecí y me jubilé como fitopatólogo en el laboratorio.

Realicé el doctorado en la Universidad Politécnica de Valencia en 1997 sobre *La Necrosis Bacteriana de la Vid, causada por* Xylophilus ampelinus. *Detección serológica, distribución en Aragón y sensibilidad varietal.* Mis directores de tesis fueron la Dra. María Milagros López (Chiqui, como bacterióloga) y el Dr. Mariano Cambra (por serología/inmunología); así todo quedaba en casa entre

hermanos. En la tesis estudié un grave problema real de las viñas de Aragón en las décadas de 1980-1990. El trabajo obtuvo el accésit del XIII Premio "Jordán de Asso" de Investigación Agraria (1998), concedido por la institución "Fernando el Católico" de la Diputación Provincial de Zaragoza. En esta etapa aprendí y desarrollé varias técnicas, y me di cuenta de la importancia no solo de aplicar rigurosamente una metodología en el trabajo sino que, además, en muchos casos, había que recurrir a emplear la imaginación para diseñar técnicas sencillas que ayudaran a la recogida y análisis de muestras; y como a mí siempre me ha gustado inventar artilugios, diseñé un método semiautomático para recuperar fluidos xilemáticos de vid, que probablemente fuera también muy útil para detectar ahora la enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*), tan importante actualmente.

En muchos casos, había que recurrir a emplear la imaginación para diseñar técnicas sencillas que ayudaran a la recogida y análisis de muestras

Una parte fundamental, desde el comienzo de mi vida profesional, ha sido la formación continua, participando en más de 50 cursos. Muchos de ellos fueron organizados ante la emergencia de nuevos patógenos y era preciso coordinar y normalizar la analítica a aplicar en todos los laboratorios de las comunidades autónomas (CC. AA). En cuanto a la docencia, he impartido clases en más de 70 cursos y numerosas conferencias de ámbito nacional. En mi trayectoria profesional he intentado combinar el diagnóstico, la transferencia y la investigación; he participado en diez proyectos I+D financiados en convocatorias públicas, he realizado 56 contribuciones a congresos y reuniones científicas, y colaborado en más de 120 publicaciones y documentos científico-técnicos. Además he contribuido, tanto a nivel nacional como internacional, aportando mis fotografías de plagas, enfermedades y fisiopatías, a ilustrar libros, webs y artículos científicos, propios y ajenos, de divulgación, así como boletines para agricultores.

Una vez conseguida la beca inicial para trabajar en Sanidad Vegetal, me fui dando cuenta de que los ingredientes de este trabajo me hacían disfrutar

¿Por qué te dedicaste a la Fitopatología?

Para ser sincero, no sé si decir que fue el destino, el azar o cualquier otra razón diferente de la vocación. Como he comentado, mi primer contrato fue para trabajar en la lucha antigranizo, entonces dependiente del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica, mediante el seguimiento de las tormentas. Estos fueron mis primeros contactos con los funcionarios relacionados con la fitopatología.

Una vez conseguida la beca inicial para trabajar en Sanidad Vegetal, y a medida que fui teniendo más conocimientos y experiencia, me fui dando cuenta de que los ingredientes de este trabajo me hacían disfrutar. La fitopatología que he practicado, y que me ha apasionado, incluye el contacto con los agricultores y viveristas, el uso combinado de técnicas de campo y técnicas en el laboratorio y, en muchos casos, el seguimiento del problema hasta su resolución. Todo ello en situaciones anualmente cambiantes que obligan a aprender todos los días, por lo que no me he aburrido nunca.

Actualmente mi deformación profesional llega a tales niveles que no puedo pasear por campos o jardines sin observar el estado sanitario de las plantas y los árboles que me salen al paso.

He vivido tan intensamente este trabajo, que pronto se convirtió en mi verdadera vocación, y he permanecido, aun a costa de mi promoción personal, en el mismo puesto desde mis comienzos hasta mi jubilación.

¿Qué relación has tenido con la SEF y qué te ha aportado?

Soy miembro de la Sociedad Española de Fitopatología desde 1987 y desde entonces he intentado

participar lo más activamente posible.

Asistí por primera vez a un congreso de la SEF en 1989 en Badajoz y en 1991 moderé la Mesa redonda "Situación Fitopatológica de Aragón" en el ámbito de las jornadas que, con el sector agrario, llevó a cabo la SEF en Zaragoza.

Por otro lado, los integrantes de los laboratorios de Sanidad Vegetal considerábamos que era importante que alguno de nosotros nos representara en la Junta Directiva de la SEF. Con este cometido fui vocal de la Junta desde 1999 a 2003.

¡Cuántas vueltas he dado con una muestra en las manos mostrándola y preguntando si alguien, alguna vez, había visto esos síntomas o tenía experiencia en algo similar!

El ser miembro de la Sociedad y participar en ella me ha aportado mucho porque me ha permitido relacionarme directamente con los fitopatólogos españoles e incluso establecer unas relaciones de amistad que tanto enriquecen, conocer las líneas de trabajo que desarrollan y estar al día en las nuevas técnicas de laboratorio.

También soy miembro del Grupo Especializado en Detección, Diagnóstico e Investigación (GEDDI-SEF) desde su creación en 2011.

¿Cuáles son los inicios del Laboratorio de diagnóstico del Gobierno de Aragón?

Echando la vista atrás, en 1970 se crearon las Estaciones de Avisos Agrícolas que se especializaron fundamentalmente en "plagas" (artrópodos) pero carecían de conocimientos y equipos de laboratorio para el diagnóstico de patógenos. Estos trabajos los realizaban los investigadores fitopatólogos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

En los años 80, con el mayor desarrollo competencial de las CC. AA, se llegó a la conclusión de que era necesario crear los Laboratorios de Sanidad Vegetal; lo que, además, supuso para los investigadores la liberación de trabajos de diagnóstico y detección rutinarios, funciones propias de estos laboratorios, así como las prospecciones fitosanitarias que la legislación europea exige efectuar en origen para el movimiento de material vegetal, en aplicación de las diferentes directivas comunitarias.

El Laboratorio en Aragón está situado junto a Sanidad Vegetal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) y del CSIC, en el Campus de Aula Dei, lo que es un acierto ya que permite compartir conocimientos, recursos y una histórica biblioteca. Tener cerca especialistas e investigadores en distintas materias, como frutales, hortícolas, riegos, fertilización y otros, es una ventaja importante. ¡Cuántas vueltas he dado con una muestra en las manos mostrándola y preguntando si alguien, alguna vez, había visto esos síntomas o tenía experiencia en algo similar!

¿Cuáles son los principales problemas a los que se enfrenta un laboratorio de diagnóstico?

Los problemas, creo que vienen de la necesidad de personal adecuadamente preparado y en actualización constante. Luego, en el día a día, aparecen dudas y problemas en todas las etapas del diagnóstico y la detección, desde la toma de muestra hasta su resolución.

Nos enfrentamos a una gran diversidad de plagas y enfermedades que afectan a un elevado número de cultivos e incluso de masas forestales. Del material vegetal hay que conocer mínimamente su fenología, comportamiento y desarrollo vegetativo. Las técnicas de análisis, a su vez, también evolucionan rápidamente y requieren de equipos y reactivos nuevos, de los que no siempre se dispone con la rapidez deseada y conveniente.

Existe una falta de recursos humanos técnicos adecuadamente formados

También hay que tener en cuenta que las consultas han de ser resueltas y comunicadas con la mayor celeridad posible.

Podemos afirmar que existe una falta de recursos humanos técnicos adecuadamente formados. Por todo

ello habría que incorporar planes de formación continua anuales y participar activamente en los foros de trabajo, no solo los responsables de los laboratorios sino el resto de colaboradores. No debemos olvidar la importancia que tiene la formación en los aspectos de muestreo, que tanto condiciona la emisión de un diagnóstico o una detección fiables.

¿Cuál de los organismos nocivos de los vegetales consideras que ha sido el más devastador o ha causado mayor impacto en la agricultura?

Desde el momento (1993) en que se produjo la libre circulación de mercancías con la desaparición de las fronteras intracomunitarias y el fenómeno de globalización del comercio, la aparición o emergencia de nuevas enfermedades en España ha sido incesante.

Es difícil decidir cuál de las enfermedades detectadas ha sido la más devastadora, ya que gran parte de ellas están esperando su oportunidad para mostrar su virulencia. Posiblemente el fuego bacteriano de las rosáceas (causado por *Erwinia amylovora*) sea la más importante en Aragón, ya que reúne todas las características favorables para causar daños graves: es una bacteria de crecimiento rápido, migra en la planta a gran velocidad siendo capaz de destruir un árbol de especie o variedad sensible en una campaña; afecta a cultivos leñosos de importancia como frutales de pepita, plantas rosáceas ornamentales y silvestres; tiene gran capacidad de diseminación a corta y larga distancia tanto mediante vectores bióticos (insectos polinizadores –abejas– y otros que pueden constituir plaga, pájaros, material vegetal, labores de poda, etc.) como abióticos (lluvia, granizo, viento); y, por último, se carece de medios eficaces de gestión integrada.

Posiblemente el fuego bacteriano de las rosáceas sea la enfermedad más importante en Aragón, ya que reúne todas las características favorables para causar daños graves

En la actualidad se sigue con gran preocupación en Europa el desarrollo y evolución de *Xylella fastidiosa*, bacteria recientemente detectada en España que puede infectar a 360 especies vegetales entre las que se encuentran el olivo, la vid, el almendro, los cítricos, la alfalfa… cultivos fundamentales o estratégicos en el área mediterránea. Además, cada año se detectan nuevas especies hospedadoras, vectores y nuevos genotipos de patogenicidad y gama de huéspedes desconocidas para la ciencia, lo que la hace potencialmente muy peligrosa. Por todo ello, supone y supondrá un reto para todos los laboratorios españoles y europeos.

¿Cuál ha sido tu mayor reto en el mundo de la fitopatología?

El reto es diario con cada consulta que llega al laboratorio y de muy diversa índole. Cada año es climatológicamente distinto e influye en las plagas, enfermedades y fisiopatías que afectan a los diversos cultivos. Formarse como "generalista" en diagnóstico es cuestión de tiempo, de experiencia y de la ilusión que se ponga en ello. Hay que conjugar la observación de síntomas, tanto en el campo como en el laboratorio, y la aplicación de técnicas de análisis.

He de decir que algo que ayudó mucho a la formación de las personas que trabajábamos en diagnóstico fueron los Grupos de Trabajo. En España, a finales de los años 80, se fundó el Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico (GTLD) que reunía, en unas jornadas anuales, a los técnicos de esos laboratorios de las distintas CC. AA. Era un foro en el que se presentaban directamente los problemas que habían surgido y las posibles soluciones en su caso.

En España, a finales de los años 80, se fundó el GTLD que reunía, en unas jornadas anuales, a los técnicos de esos laboratorios de las distintas CC. AA.

Con la "crisis económica", después de más de 25 años de trabajo, desaparecieron. Como es sabido, en la actualidad, la SEF está acogiendo los intereses de los técnicos en torno a un nuevo grupo de trabajo GEDDI- SEF.

¿Cuáles consideras que han sido tus mayores logros a lo largo de tu carrera o aquel que te ha producido mayor satisfacción?

El conseguir, con gente muy diversa y cambiante, un buen equipo de gran calidad humana y técnica, que hemos disfrutado aun en las épocas más difíciles y de mayor volumen de trabajo. Desde luego no fue algo que hiciera yo solo, sino gracias a mis compañeros del laboratorio.

De todos es conocida tu pasión por la fotografía. De hecho, tenemos el inmenso orgullo de que el premio SEF de fotografía lleve tu nombre. ¿Cómo empezó tu afición y qué satisfacciones o sinsabores te ha dado?

Me alegro de la oportunidad que me dais para hacer público mi agradecimiento por poner mi nombre al concurso de fotografía. Nunca me hubiera esperado este reconocimiento y mis sentimientos al saberlo han sido de sorpresa, incredulidad, orgullo y agradecimiento… por el afecto que sé hay detrás de ello.

Pero hablando de fotografía, el primer día que entré a trabajar en el entonces Centro de Protección Vegetal, durante el recorrido por las instalaciones me comentaron que "había instrumentos de fotografía de calidad que no sabían manejar y que estaban interesados en que se utilizasen", y me enseñaron un armario repleto de material y equipos de fotografía, más concretamente para macrofotografía, cámaras réflex, objetivos macro, anillos de extensión, etc. de última generación en su momento. No existían las cámaras digitales. Había que comprar carretes fotográficos que había que enviar a Kodak de Madrid para su revelado. Era una sorpresa constante, ya que no sabías si las diapositivas estaban bien o estaban movidas, a falta de foco, oscuras o quemadas. El proceso era caro y yo tuve la oportunidad de realizar durante años un carrete más o menos semanalmente, todo dependía de las salidas al campo, el número de consultas y de determinaciones a realizar. Y, como todo, la fotografía se aprende haciendo fotos.

En el año 2001 ya disponíamos de equipos fotográficos digitales y se digitalizó una selección de diapositivas; en total 60 CD con 6000 fotos. Ahora es diferente, incluso los teléfonos móviles que tengan cámaras decentes pueden utilizarse teniendo cuidado de encuadrar bien y mantener fija la maquina al disparar y, en su caso, disparar en posición automática (auto).

La verdad es que cuando empecé no sabía nada de fotografía pero, a medida que iba practicando, me fui "enganchando" cada vez más y me hice más consciente de que era una herramienta fundamental para la divulgación y la formación. La cámara ha sido una fantástica compañera con la que he pasado horas y horas de trabajo disfrutando y, en algunas ocasiones, con sus resultados.

En realidad no soy fotógrafo, soy un fitopatólogo que hace fotos, podríamos llamarlo "fitofotopatólogo".

Como responsable del Laboratorio de diagnóstico, ¿cómo han evolucionado los métodos de diagnóstico de patógenos?

En función de las características propias de cada Comunidad Autónoma se organizaron los laboratorios; así, en Aragón se creó uno, mientras que en Andalucía inicialmente se crearon tres por la diversidad de cultivos y la extensión geográfica. Al principio los laboratorios empleaban técnicas clásicas, cámaras húmedas, aislamientos, preparaciones microscópicas y pruebas bioquímicas, biológicas de inoculación de plantas indicadoras y bioensayos *in vitro*.

La implantación de nuevas técnicas siempre ha ido asociada a la detección de un patógeno; así, la serología, y concretamente la técnica ELISA, se instaló en el laboratorio con la aparición del virus de la sharka (*Plum pox virus*); la inmunofluorescencia (IF) se introdujo para analizar las bacterias de cuarentena que afectan a la patata; y las técnicas de amplificación molecular, como la PCR, para el análisis de fitoplasmas.

El futuro pasa por la biología molecular y la incorporación de técnicas rápidas, específicas y sensibles

Hoy en día, en los laboratorios se aplican todas las técnicas disponibles de manera rutinaria. Además, todas ellas evolucionan mejorando la rapidez, la sensibilidad y la especificidad.

¿Cómo ves el futuro de la Fitopatología? ¿Cuáles serán los aspectos clave que deberían ser abordados en el futuro?

Teniendo en cuenta que la globalización del comercio de material vegetal es un hecho imparable, el futuro pasa por la biología molecular y la incorporación de técnicas rápidas, específicas y sensibles.

Hay que destacar la dificultad en la aplicación práctica de la obligatoria normativa comunitaria. Existen planes de contingencia y planes de acción para cumplir con esa normativa pero, en algunos casos, en los que no se lleve a cabo una detección precoz, considero que serán de dudosa eficacia. A esto hay que añadir las limitaciones económicas actuales, cada vez mayores, para llevar a cabo las compensaciones por eliminación de plantas infectadas e incluso sanas en zonas tampón, que aseguren no se ocultan síntomas para evitar los posibles arranques, y de esta manera, si no erradicar, se pueda, al menos, ralentizar la dispersión de las enfermedades.

¿Qué consejos darías a las nuevas generaciones de fitopatólogos?

Que salgan al campo con sombrero y crema para no quemarse y escuchar lo que "dicen" las plantas.

Bueno, hablando en serio, en realidad no sabría qué decirles… no soy persona proclive a aconsejar en ningún aspecto, pero sí puedo hacer un apunte sobre lo que me ha funcionado, y es establecer unas buenas relaciones laborales y un ambiente agradable que ayude a la realización de un buen trabajo en equipo.

Compartir los recursos gráficos generados, por el alto valor formativo y de divulgación que tienen, y los resultados de los trabajos realizados.

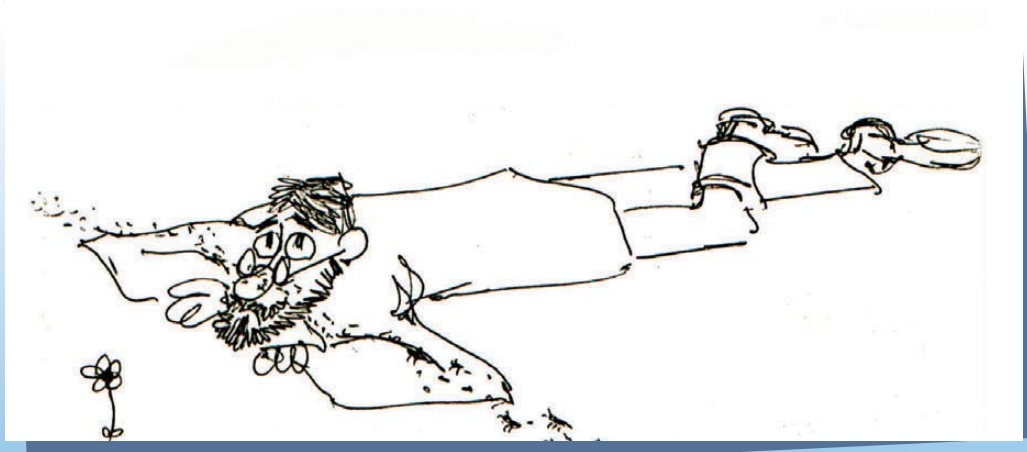
Y, finalmente, aprender a colaborar desinteresadamente proporciona no solo satisfacciones y amigos, sino también resultados.

¿Cuáles son, en tu nueva etapa, tus principales actividades? ¿Mantienes alguna relación con el mundo de la Fitopatología?

Dedicar tiempo a la familia y los amigos allí donde estén, y seguir corriendo, son mis mayores intereses actuales; simplemente eso me hace disfrutar y me mantiene fuerte para esta nueva etapa de la vida. Por supuesto, sin dejar de lado el trabajo de renombrar y ordenar la colección de fotografías para que, mediante el empleo de alguna aplicación para su acceso, puedan ser de utilidad para todos.

Muchas gracias, Miguel, por atender nuestra invitación. Te deseamos todo lo mejor en esta nueva etapa de tu vida profesional y personal.

(Las imágenes provienen del Dr. Cambra, con permiso de uso para la revista SEF)



Un sistema de señalización bacteriana sensible a plantas detecta un derivado de la etanolamina

José Antonio Gutiérrez
Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga

A plant-responsive bacterial-signaling system senses an ethanolamine derivative

Coutinho, B. G., Mevers, E., Schaefer, A. L., Pelletier, D. A., Harwood, C. S., Clardy, J. y Greenberg, E. P.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **115**: 9785-9790
Publicado el 25 de septiembre de 2018

En bacterias, el sistema de comunicación celular más extendido es el denominado *quorum sensing* (QS). El sistema QS más estudiado está presente en bacterias gram negativas y se basa en la síntesis y detección de N-acil homoserina lactonas (AHL) por los productos de los genes luxI-luxR[1]. Un estudio reciente[2], describe la presencia de un gen tipo-*luxR* no asociado al gen *luxI* en la cepa bacteriana endófita de álamo *Pseudomonas sp.* GM79. Este gen se denominó *pipR* y activaba la expresión de dos peptidasas adyacentes (*pip*A y *app*A) y de un sistema de transporte tipo ABC en presencia de extractos de hojas y péptidos, pero no en presencia de AHL. Hasta el momento, la molécula específica capaz de activar este sistema era desconocida. En este punto se centra el trabajo publicado recientemente por Coutinho y colaboradores (2018), donde se pone de manifiesto que un derivado de la etanolamina actúa como coinductor del regulador PipR, activando la expresión del gen *pip*A. Inicialmente, los autores llevaron a cabo una aproximación racional que se basó en el análisis de una librería de 760 "moléculas pequeñas" utilizando un sistema de expresión de proteína verde fluorescente (GFP) para determinar qué compuestos podrían activar la expresión del gen *pip*A. Este experimento reveló cómo la etanolamina era, sin lugar a dudas, el compuesto que activaba de manera más significativa (unas 50 veces más) la expresión del gen *pip*A. Utilizando el análisis de mutantes junto con la expresión de GFP, purificación de proteínas, y el análisis mediante *High Resolution Mass Spectrometry* (HRMS) y *Hydrophilic Interaction Liquid Cromatography* (HILIC), detectaron un compuesto residual en la solución de etanolamina, que era capaz de activar a concentraciones muy bajas (del orden de picomolar) el *gen pip*A. Este compuesto se caracterizó como N-(2-hidroxietil)-2-(2-hidroxietil amino) acetamida (HEHEAA), un derivado que se genera de forma espontánea a partir de la etanolamina. Por lo tanto, en este trabajo se describe por primera vez un compuesto producido por plantas que activa de manera específica la comunicación con bacterias mediante este sistema regulador tipo-LuxR. Además, de la etanolamina se generan docenas de pequeñas moléculas de forma espontánea, que quizás pudieran estar activando reguladores tipo-LuxR en otras bacterias asociadas a plantas. Este trabajo abre nuevas vías para entender cómo las bacterias asociadas a plantas son capaces de percibir los cambios producidos en su ambiente gracias a señales externas y modificar su comportamiento.

REFERENCIAS

[1] Ng, W. L. y Bassler, B. L. (2009). "Bacterial quorum-sensing network architectures". *Annu. Rev. Genet.* **43**: 197-222.

[2] Schaefer, A. L. *et al.* (2016). "A LuxR homolog in a cottonwood tree endophyte that activates gene expression in response to a plant signal or specific peptides". *mBio* **7**: e01101-16.

Selección de un consorcio bacteriano beneficioso para la planta mediante la inducción de la enfermedad

Carmen Vida
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"
Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga

Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium

Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., Jonge, R., Burgman, W.P., Burmolle, M., Herschend, J., Bakker, P.A.H.M. yPieterse, C. M. J.
ISME J. **12**: 1496-1507
Publicado el 8 de marzo de 2018

El estudio de microorganismos beneficiosos para las plantas es un tema que ha sido abordado desde hace décadas con el fin de entender la ecología microbiana de estos y poder diseñar estrategias aplicables en campo. Los trabajos para el estudio de los mismos han evolucionado enormemente con el paso del tiempo y el desarrollo de nuevas tecnologías. Así, en el trabajo realizado por Berendsen *et al.* (2018) se estudia el papel del sistema inmune de la planta *Arabidopsis thaliana* en la selección de una comunidad de microorganismos de la rizosfera con capacidad de protección frente al patógeno foliar *Hyaloperonospora arabidopsidis*, agente causal del "downy mildew". El uso de un *microarray* comercial (PhyloChip) ha permitido identificar los principales grupos de microorganismos presentes en la rizosfera de *A. thaliana* procedentes de un suelo supresivo frente a la enfermedad. Mediante diferentes técnicas de microbiología clásica (aislamiento en medio selectivo, interacción en medio sólido) y biología molecular (extracción de ácidos nucleicos, qRT-PCR, BOX-PCR, secuenciación) se ha conseguido diseñar un consorcio bacteriano artificial formado por los tres tipos de aislados principales de la rizosfera, pertenecientes a los géneros *Xanthomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. y *Microbacterium* sp. Este consorcio bacteriano es capaz de estimular el sistema inmune de la planta y promover el crecimiento vegetal, contribuyendo, por lo tanto, al control de la enfermedad. Los diferentes ensayos llevados a cabo en este trabajo demuestran la interacción sinérgica entre las especies de este consorcio artificial bacteriano beneficioso para la salud de la planta. Además, la infección con *H. arabidopsidis* de plantas de *A. thaliana* precrecidas en un suelo, da como resultado el reclutamiento de microorganismos beneficiosos asociados a la raíz de la planta que confieren el potencial de protección frente al patógeno que originó el reclutamiento a una segunda población de plantas crecidas en el mismo suelo. Este tipo de estudios profundiza en la ecología microbiana de las comunidades de microorganismos de suelos supresivos permitiendo demostrar que la presencia continuada de plantas en un suelo concreto afectadas por una enfermedad promueve la selección de especies bacterianas concretas con capacidad para protegerla frente al patógeno.

Diagnóstico de nueva generación con CRISPR

Carmen Hernández
Departamento de Virología Molecular y Evolutiva de Plantas
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV)
Valencia

Next-generation diagnostics with CRISPR

Chertow, D. S.
Science **360**: 381-382
Publicado el 27 de abril de 2018

Los métodos de diagnóstico son una herramienta imprescindible en el campo de la patología tanto animal como vegetal. Esto hace que el desarrollo de técnicas de detección de patógenos cada vez más sensibles, rápidas, sencillas y de bajo coste, sea un objetivo constante para investigadores del área de la micología, bacteriología o virología. En este artículo se atrae la atención sobre tres trabajos publicados simultáneamente en la revista *Science* en los que se ha utilizado la técnica CRISPR/Cas, no para la edición genómica como empezamos a estar acostumbrados, sino para el diagnóstico de virus. Estos trabajos, que han merecido su aparición en la portada del mes de abril de este año de la prestigiosa revista, seguramente van a suponer una nueva vuelta de tuerca en el terreno del diagnóstico de enfermedades infecciosas. Para aquellos que estén menos familiarizados con el sistema CRISPR/Cas, recordemos, de forma muy sucinta, que este sistema consta básicamente de dos elementos: un RNA guía y una endonucleasa Cas. El primero conducirá a la segunda hacia una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA) o de RNA de cadena simple (ssRNA) –dependiendo del tipo de proteína Cas–, de una manera específica de secuencia y, a continuación, la endonucleasa catalizará el corte del ácido nucleico. Los tres trabajos a los que alude este artículo parten de la observación de que determinadas proteínas Cas, cuando cortan un ácido nucleico de forma dirigida (es decir, con la mediación de un RNA guía), inducen, de forma muy eficiente, el corte colateral en *trans* de ácidos nucleicos. Esta propiedad es aprovechada para desarrollar métodos rápidos de detección de dsDNA o ssRNA virales que incluyen un ácido nucleico delator que, al ser escindido, emite una señal fluorescente o, incluso, visual en una simple tira reactiva. Estos métodos son capaces de detectar distintos patógenos en un único ensayo y hasta de diferenciar aislados virales con polimorfismos de un único nucleótido. Estas nuevas aproximaciones necesitarán ser comparadas con métodos ya establecidos, pero, si se confirma su eficacia, su impacto en aplicaciones diagnósticas puede ser enorme. En los trabajos comentados, las pruebas de concepto se han realizado con patógenos de humanos. Su traslado a la patología vegetal es probablemente sólo cuestión de tiempo y, ¿por qué no?, podría empezar a ser liderado por alguno de los lectores de esta reseña.

Identificación de pequeños RNA artificiales altamente eficientes contra distintos aislados del virus del bronceado del tomate

Frederic Aparicio
Laboratorio de Virología Molecular de Plantas
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV). Valencia

Fast-forward Identification of Highly Effective Artificial Small RNAs Against Different Tomato spotted wilt virus Isolates

Carbonell, A., López, C. y Daròs, J.A.
Mol. Plant Microbe Interact.
Publicado en línea el 19 de diciembre de 2018

En este estudio, los autores presentan una estrategia basada en el fenómeno del silenciamiento génico endógeno mediante pequeños RNAs artificiales para generar plantas resistentes al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV). Este virus se transmite por medio de varias especies de *trips* de manera persistente circulativa propagativa y presenta una distribución mundial, infectando a más de mil especies de plantas que incluyen un gran número de especies de interés agronómico, entre las que destacan tomate y pimiento. Aunque la introgresión de los genes de resistencia *Sw-5* y *Tsw* ha permitido el control de la enfermedad en tomate y pimiento, la aparición de nuevos aislados virales capaces de superar dicha resistencia está limitando seriamente su durabilidad. Por ello, el desarrollo de nuevas estrategias de control de este virus es realmente muy necesario con el fin de paliar los graves perjuicios económicos que genera esta enfermedad. En este trabajo, Carbonell y colaboradores presentan una estrategia para, aprovechando la enorme cantidad de información disponible en las bases de datos sobre genomas virales, identificar las mejores regiones diana conservadas en los RNA virales L, M, y S y llevar a cabo un diseño racional de diferentes microRNA artificiales (amiRNA) altamente eficaces contra el virus y que, además, no presenten homología con el genoma del huésped. Tras ensayar en plantas de *Nicotiana benthamina* la funcionalidad y especificidad de los diferentes miRNA contra dos aislados del TSVW, se abordó la construcción de un tasi-RNA artificial (syn-tasiRNA) conteniendo los cuatro amiRNA que mostraron una mayor eficacia antiviral. Al igual que los amiRNA individuales, el syn-tasiRNA demostró ser altamente eficaz bloqueando *in vivo* la infección de los dos aislados de TSWV. Los miRNA son altamente específicos de secuencia, aunque el hecho de ser específicos de una región concreta de 21 nucleótidos del genoma viral facilita que el virus pueda mutar en esa región eliminando su capacidad de bloquear la infección viral. La tecnología syn-tasiRNA, en la que varios miRNA son expresados secuencialmente, evita ese desventaja incrementando la durabilidad de la resistencia, lo que la convierte en una potente estrategia para generar plantas resistentes. Además de demostrar la utilidad de estos pequeños RNA artificiales como herramienta para generar resistencias contra enfermedades virales, este trabajo presenta un protocolo que permite la identificación y diseño de estos RNA y determinar su actividad funcional antes de iniciar el costoso trabajo que supone la transformación de plantas para generar resistencia antiviral.

Un virus de 1000 años recuperado de un antiguo asentamiento de nativos americanos es el virus de plantas más antiguo encontrado hasta la fecha

Vicente Pallás
Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP)
Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (UPV-CSIC)
Valencia

Hace siglos, los nativos americanos que vivían en lo que ahora es el sudoeste de los Estados Unidos cultivaban regularmente el maíz y la calabaza. En la década de 1970, las excavaciones en el asentamiento conocido como Antelope House, situado en las profundidades de un cañón de Arizona, descubrieron mazorcas de maíz, granos y cáscaras. Marilyn Roossinck y sus colaboradores en la University Park de la Universidad Estatal de Pensilvania, han recuperado tres genomas casi completos de un virus de ARN de doble cadena previamente desconocido, a partir de mazorcas que datan de alrededor del año 1000. Llamaron al nuevo virus *Zea mays* chrysovirus 1 porque está relacionado con la familia similar a *Chrysoviridae* de virus que pueden infectar las plantas y se transmiten de generación en generación por las semillas. Los investigadores también encontraron un pariente cercano del nuevo virus en el maíz moderno. Las secuencias de ARN del virus moderno difieren de las secuencias antiguas en solo un 3 %. El récord anterior para el virus de plantas más antiguo, un aislado del virus del mosaico estriado de la cebada que se encuentra en la cebada del norte de África, tenía aproximadamente 750 años.

Más información en el número de *J. Virology* de octubre.

Los científicos europeos se unen para salvaguardar la mejora de precisión para una agricultura sostenible

Científicos líderes que representan a más de 75 centros e institutos europeos de investigación en ciencias de la vida y de las plantas han respaldado un documento que reclama urgentemente a los responsables políticos europeos que salvaguarden la innovación en la mejora genética de plantas y en la agricultura en general. Los científicos están profundamente preocupados por la reciente sentencia del Tribunal de Justicia de la Comunidad Europea sobre las técnicas modernas de edición del genoma que podrían llevar a una prohibición *de facto* de la mejora genética de cultivos. Como resultado, los agricultores europeos podrían verse privados de una nueva generación de variedades de cultivos más resistentes a la temperatura y más nutritivas, variedades que se necesitan con urgencia para responder a los desafíos ecológicos y sociales actuales. Junto con las innumerables declaraciones de los institutos de investigación europeos que han aparecido *online* durante los últimos meses, esta declaración es prueba de un sólido consenso entre la comunidad de investigadores de ciencias de la vida en Europa sobre las consecuencias negativas de esta decisión.

La mejora de los cultivos se ha realizado durante siglos mediante técnicas convencionales de mejora genética, lo que da lugar necesariamente a importantes cambios genéticos en la planta. Hoy en día, las técnicas innovadoras representan un salto cualitativo en la mejora genética dado que permiten realizar los cambios genéticos deseados con gran eficacia y precisión.

Métodos innovadores de mejora vegetal necesarios para afrontar los desafíos del cambio climático

La agricultura alimenta al mundo. En ese sentido, el desmoronamiento del sistema alimentario es uno de los mayores riesgos del cambio climático. Los cultivos que son más tolerantes a los cambios rápidos y los entornos más hostiles, como el reciente período de extrema sequía en algunas partes de Europa, serán cruciales para el éxito en la producción de alimentos del futuro. Uno de los últimos avances en este campo es la mejora de precisión, un método innovador de mejora de cultivos basado en la edición del genoma. La mejora de precisión puede contribuir a adaptar los cultivos a un área específica, considerando los factores ambientales de una determinada región. También puede utilizarse para generar cultivos con una mejor composición nutricional, una mejor digestibilidad, un menor contenido de componentes antinutricionales, una alergenicidad reducida o que requieran menos insumos, lo que tiene un beneficio directo para nuestro medio ambiente.

Los institutos europeos de investigación de plantas convocan conjuntamente a la acción.

Las consecuencias de una regulación muy restrictiva de los métodos innovadores de mejora vegetal pueden ser devastadoras. La innovación agrícola europea resultante de este nuevo método de edición genómica se verá limitada debido a las grandes restricciones que esta legislación de la Unión Europea (UE) plantea. Esto dificultará el progreso en la agricultura sostenible y dará una desventaja competitiva a la industria europea. Los impactos en nuestra sociedad y economía serán enormes. Para salvaguardar la innovación en la agricultura en Europa, los firmantes del documento piden un nuevo marco regulatorio que evalúe nuevas variedades de cultivos basadas en argumentos científicos.

Dirk Inzé, director científico de VIB-UGent Center for Plant Systems Biology (Flandes, Bélgica) y uno de los propulsores de este documento de consenso ha declarado: "El apoyo que hemos recibido por parte de los científicos europeos ha sido abrumador desde el principio. Para mí, ilustra claramente la dicotomía actual en Europa: como líderes europeos en el campo de las ciencias de las plantas estamos comprometidos a brindar soluciones innovadoras y sostenibles a la agricultura, pero nos encontramos obstaculizados por un marco regulatorio obsoleto que no está en línea con la información científica reciente. Con esta declaración, esperamos promover en la UE políticas basadas en la evidencia, que es de crucial importancia para todos nosotros".

TESIS DOCTORALES

Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma-Brassicaceae*

- **Doctorando:** D. Jorge Poveda Arias
- **Directores:** Dr. Enrique Monte Vázquez, Dr. Carlos Nicolás Rodríguez y Dra. Ana Alonso Ramírez
- **Institución:** Universidad de Salamanca (USAL), Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Grupo de Investigación sobre Fitopatología y Control Biológico
- **Fecha:** 6 de julio de 2018

Integrated management of bacterial spot disease of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola pv. pruni*: development of a disease forecasting system

- **Doctorando:** D. Gerard Morales Nicolàs
- **Directores:** Dr. Isidre Llorente Cabratosa, Dra. Concepció Moragrega Garcia
- **Institución:** Universitat de Girona. Institut de Tecnologia Agroalimentària
- **Fecha:** 11 de abril de 2018

Factores climáticos y agronómicos que determinan la incidencia y distribución geográfica de nematodos fitoparásitos en olivar en Andalucía

- **Doctorando: D.** Antonio J. Archidona Yuste
- **Directores:** Dr. Pablo Castillo y Dr. Juan A. Navas Cortés
- **Institución:** Universidad de Córdoba (UCO); Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- **Fecha:** 29 de noviembre de 2018

XIX Congreso Nacional de Fitopatología

Del 8-10 de octubre de 2018
Toledo

Carolina Escobar
Presidenta del Comité Organizador

El XIX Congreso bienal organizado por la Sociedad Española de Fitopatología se celebró en Toledo los días 8 a 10 de octubre de 2018. Fue una ocasión única para reunir a los expertos dedicados al estudio de las enfermedades de las plantas en España. Se escogió como sede el Hotel Beatriz, especializado en convenciones, para promover la interacción entre la comunidad científica. En la presentación del Congreso, realizada en el marco incomparable del Campus de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica de Toledo, además de la presidenta del Comité Organizador y del presidente de la SEF, pudimos contar con el vicerrector de Investigación de la UCLM y un representante de la Consejería de Agricultura. Los objetivos planteados por el Comité Científico fueron, entre otros, promover la interacción e intercambio de conocimiento entre los fitopatólogos y la difusión de este conocimiento a la Sociedad y al sector socioeconómico correspondiente. El congreso ha contado no solo con la participación de ponentes internacionales, invitados de reconocido prestigio, en cuatro *Ponencias Plenarias*, sino con la de grupos emergentes de investigadores jóvenes en seis *Ponencias Invitadas*, que tuvieron ocasión de transmitir su "Fascinación por la Patología Vegetal" a los 310 inscritos, número cercano al número de miembros activos de la SEF. Científicos en formación, emergentes o ya consolidados, así como personal de los servicios de sanidad vegetal, compartieron experiencias también con las empresas que tuvieron ocasión de presentar su trabajo científico-técnico en dos sesiones específicas de empresas y transferencia. Como colofón al Congreso, en lo que esperamos que sea una tradición a partir de ahora, tuvimos ocasión de conocer la trayectoria investigadora de un miembro de la Sociedad distinguido por sus relevantes contribuciones científicas y sus fuertes compromisos con la SEF. En esta ocasión fue la Dra. María Milagros López quien nos transmitió su conocimiento y su ilusión por la Fitopatología en una sesión extraordinaria. Por otra parte, la Asamblea de

la SEF tuvo el placer de reconocer al Dr. Jesús Murillo *socio de honor* por su activa participación en la Sociedad y por sus contribuciones científicas relevantes en el campo de la Fitopatología.

Esta conferencia sigue al *workshop* "Xylella fastidiosa: *knowledge gaps and research priorities for the EU*" que fue organizado en 2015 por la EFSA y las Direcciones Generales de Investigación e Innovación, Agricultura y Desarrollo Rural, y Salud y Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea. Se prevé la organización de conferencias de carácter anual para ayudar a satisfacer la solicitud de la Comisión Europea de obtener actualizaciones científicas periódicas sobre la investigación de *X. fastidiosa* a nivel mundial.

El congreso se estructuró en sesiones que abarcaron los ámbitos fundamentales de la Fitopatología (Control, Resistencia a enfermedades, Manejo integrado, Detección y diagnóstico, Epidemiología, Interacción planta-patógeno, Manejo de enfermedades en la era genómica, Enfermedades emergentes, etc.) desde un punto de vista multidisciplinar, incluyendo abordajes agronómicos, moleculares, celulares y bioquímicos, entre otros. La idea subyacente fue conocer y asegurar la salud de nuestras plantas en un contexto que integre parámetros de globalización económica.

Fomentar el espíritu crítico y la curiosidad investigadora en Patología Vegetal en los jóvenes también es una responsabilidad de la SEF. Puesto que los pósters son una vía ampliamente utilizada por los investigadores jóvenes y en formación, se cambió el formato de la elección del mejor *Premio a Póster SEF* en el que diez finalistas tuvieron que defender sus candidaturas frente a un comité de expertos. A este premio se sumó, como en otras ocasiones, el *Premio a la mejor comunicación oral SEF-PHYTOMA 2018* cuya evaluación fue también exhaustiva. Hay que añadir el broche de color ostentado por el premio de fotografía que, aunque ya tradicional, se convirtió en el premio de reciente creación dedicado a Miguel Cambra, *Premio SEF de Fotografía Científica en Fitopatología Miguel Cambra*. Es de destacar también que, con el objeto de fomentar la divulgación en temas relacionados con la Fitopatología, en este congreso se instauró por primera vez el *Premio de relatos cortos en Fitopatología*, que esperamos tenga una continuidad en los próximos eventos de la Sociedad.

Así, en este contexto histórico-cultural de la ciudad de Toledo, declarada por la UNESCO Patrimonio de la Humanidad, compartimos e interactuamos con inquietud científica 310 participantes, de los cuales 180 eran socios de la SEF y 78 estudiantes, así como varios miembros permanentes de la SEF a los que se les dio un trato "especial", todo ello con un resultado excelente y motivador. Os esperamos en 2020 en la próxima edición XX del Congreso de Fitopatología en otra extraordinaria ciudad: Valencia.

Participantes en el XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Toledo, 8 al 10 de octubre de 2018 (*Foto* suministrada por Javier Cabrera Chaves).

Reunión anual de los proyectos europeos POnTE y XF-ACTORS

Del 23 al 26 de octubre de 2018
Moncada, Valencia.

Más información:

Martina Cendoya y Elena Lázaro
Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA)
Moncada (Valencia)

El Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), con sede en Moncada (Valencia), acogió del 23 al 26 de octubre la segunda reunión anual conjunta de los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy) del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea (UE).

El evento organizado por el IVIA, junto con el Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP-CNR, Italia) y la Universidad de Belgrado (Serbia), contó con más de 100 investigadores de las distintas instituciones europeas que participan en los proyectos y se convirtió en un foro de discusión y difusión de los avances científicos alcanzados en el marco de estos dos proyectos.

Durante la reunión se abordaron tres temas principales: patógenos forestales emergentes en Europa (*Hymenoscyphus fraxineus* y *Phytophthora* spp.) y las bacterias *Candidatus* Liberibacter solanacearum (CaLsol) y *Xylella fastidiosa*. Este último patógeno fue el que ocupó la mayor parte del programa, donde se presentó la situación actual en los distintos países afectados, así como las últimas investigaciones relacionadas con esta bacteria y sus vectores, su epidemiología, estrategias de vigilancia y control, modelización y evaluación de riesgos. Dada la relevancia actual de *X. fastidiosa*, el 22 de octubre se organizó una jornada previa de transferencia dirigida al sector, donde se presentaron los principales resultados sobre las enfermedades causadas por esta bacteria.

Asistentes a la reunión anual conjunta de los proyectos POnTE y XF-ACTORS en el IVIA, octubre 2018 (Proyecto XF-ACTORS, Annual Meeting Valencia-photo group, 2018)

Con el objetivo de fomentar la interacción con actores externos al mundo de la investigación, la reunión anual de los proyectos POnTE y XF-ACTORS incorporó dos talleres específicos: uno sobre modelización y gestión de riesgos de *X. fastidiosa* en la UE; y otro sobre el "Voluntary System for Preventing Pests" para la certificación de material vegetal de plantación. En estos talleres participaron técnicos de los servicios oficiales de sanidad vegetal, organizaciones nacionales de protección fitosanitaria, asociaciones de productores, viveristas y demás partes implicadas en la problemática de *X. fastidiosa*.

Como cierre, y ya en el último día, se organizaron de forma paralela dos visitas de campo: una a parcelas afectadas por CaLsol y otra a la zona demarcada por *X. fastidiosa* en Alicante. Estas dos visitas permitieron a los asistentes visualizar de primera mano la situación actual de estos patógenos en la Comunitat Valenciana y las medidas de gestión que se están llevando a cabo. La reunión conjunta de los proyectos cumplió con todas las expectativas y desde la organización se quiere agradecer a todos los asistentes su contribución al éxito de la misma.

Congreso Internacional de Patología Vegetal

Del 29 de julio al 3 de agosto de 2018
Boston, Massachusetts, EE. UU.

ANTONIO VICENT
Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA). Moncada (Valencia)

JAIME CUBERO
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid

Del 29 de julio al 3 de agosto se celebró en Boston el 11º Congreso Internacional de Patología Vegetal (ICPP), coincidiendo con el 50 aniversario de la Sociedad Internacional de Patología Vegetal (ISPP). El congreso fue un gran éxito de público, con más de 2400 asistentes, entre ellos varios socios de la SEF procedentes de distintos organismos y universidades. La organización de las sesiones científicas, pósters y actividades satélites, fue muy similar a la de los congresos de la Sociedad Norteamericana de Fitopatología (APS), al ser esta la anfitriona y hacer coincidir su congreso anual con el evento. Cada día se estructuró en una sesión plenaria de temática generalista y otras sesiones más específicas, con hasta ocho transcurriendo en paralelo.

Muchas de las ponencias plenarias abordaron el papel de la fitopatología en el ámbito de la seguridad alimentaria, en un contexto de incremento en la demanda de alimentos a escala mundial. Se presentaron los últimos avances en el control de enfermedades transmitidas por vectores así como también en la identificación y caracterización de patógenos. En el ámbito de la epidemiología, se organizaron sesiones específicas sobre aerobiología, modelización aplicada a la vigilancia fitosanitaria y sistemas de ayuda en la toma de decisiones. Como es habitual, además hubo numerosos trabajos sobre mecanismos que median en la interacción de los patógenos con su huésped y los factores de virulencia implicados en la misma.

El congreso contó con una amplia oferta de cursos y talleres, muchos de ellos sobre las aplicaciones del programa estadístico R en

Sesión inaugural del ICPP 2018 (*Imagen* aportada por A. Vicent; *Meeting photos* ICPP, 2018).

el análisis de poblaciones de patógenos y epidemiología. Como es habitual en la APS, las sesiones de pósters se dinamizaron con varias actividades como los "idea café", organizadas alrededor de temáticas concretas. En el "Councilor's Meeting" de la ISPP, la SEF estuvo representada por Jaime Cubero (vicepresidente) y Antonio Vicent (vocal). Se trataron algunos aspectos organizativos del próximo ICPP en Lyon, Francia, en 2023, así como también temas editoriales y gestión de derechos de la revista de la ISPP *Food Security*, actualmente dentro del catálogo Springer. Se discutió también la posible elaboración de un código ético por parte de la ISPP en relación a emergencias fitosanitarias que surjan.

Se destacó que 2020 será declarado por la FAO como el Año Internacional de la Sanidad Vegetal y se habló sobre las actuaciones de la ISPP en este contexto, que serán discutidas antes de fin de año por parte de la Junta Directiva. Como organización asociada a la ISPP, la SEF podrá plantear actividades. Finalmente, la ISPP nombró a varios *fellows* de la Sociedad y concedió el premio Jakob Eriksson a Pierre JGM de Wit, del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Wageningen (Holanda), por sus trabajos sobre interacción planta-patógeno, genes de avirulencia y efectores.

De izquierda a derecha: Brenda Wingfield (secretaria de la ISPP), Jaime Cubero (vicepresidente de la SEF), Greg I. Johnson (presidente saliente de la ISPP) y Antonio Vicent (vocal de la SEF; quien aporta la *fotografía*).

International Epidemiology Workshop (IEW12)

Del 10 al 14 de junio
Lillehammer, Noruega

Antonio Vicent
Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA). Moncada (Valencia)

Elisa González-Domínguez
Horta srl
Piacenza, Italia

Los *abstracts* del IEW12 pueden descargarse pinchando en el libro

La primera reunión internacional dedicada a la epidemiología de enfermedades vegetales se celebró en 1963 en Pau (Francia), coincidiendo con la publicación del libro ***Plant Diseases: Epidemics and Control*** de J. E. Vanderplank. La concurrencia de estos dos eventos en un mismo año determinó en gran medida la formalización de la epidemiología como subdisciplina dentro de la fitopatología. Esta primera reunión en Pau contó con tan solo 40 asistentes de 14 países y no llegó a publicarse ningún libro de resúmenes. La segunda reunión se celebró en 1971 en Wageningen (Holanda), ya con 74 asistentes de 24 países. Le siguieron Pensilvania (EE. UU.) en 1979, Carolina del Norte (EE. UU.) en 1986, Jerusalén (Israel) en 1986, Giessen (Alemania) en 1990, Papendal (Holanda) en 1994, Ouro Preto (Brasil) en 2001, Landerneau (Francia) en 2005, Nueva York (EE. UU.) en 2009 y Pekín (China) en 2013. Estas reuniones no suelen superar el centenar de asistentes y transcurren en un ambiente relativamente informal. Además de las ponencias, una parte importante de las sesiones se dedica a discusiones conceptuales y metodológicas. Desde 1994, el Comité de Epidemiología de la Sociedad Internacional de Patología Vegetal está al cargo de la organización de las reuniones, decidiendo sobre las próximas sedes y fechas.

Participantes del IEW12 (*Foto*: Erling Fløistad, NIBIO)

La última reunión se celebró del 10 al 14 de junio de 2018 en Lillehammer (Noruega). Durante cuatro días se desarrollaron distintas sesiones donde se abordaron diferentes áreas de la epidemiología como: el desarrollo y evaluación de modelos y sistemas de ayuda a la toma de decisiones, la gestión de enfermedades y resistencia a fungicidas, la relación entre micotoxinas y enfermedad, y el uso del software R en el análisis de datos epidemiológicos. Como es habitual, el grupo que participó en la reunión fue relativamente reducido, pero contó con algunos de los investigadores que han impulsado el estudio de la epidemiología en las últimas décadas (como Laurence Madden o Jonathan Yuen). Desde nuestro punto de vista, es una reunión muy interesante por diversas razones. Por una parte se fomenta la participación y el debate, haciendo que todos los asistentes se animen a preguntar y comentar, y no solo aquellos más reconocidos. Las sesiones son cortas, de forma que, aunque el contenido pueda ser algo denso, no se hacen pesadas. Esto hace que haya tiempo para que los asistentes se conozcan e interaccionen entre ellos, facilitando la colaboración y la creación de nuevas redes de trabajo. Además, se aborda la epidemiología de una forma global, no solo focalizada en el desarrollo de determinados análisis estadísticos o ecuaciones matemáticas. De esta forma, las sesiones son comprensibles para todos aquellos fitopatólogos que se plantean de alguna forma qué factores determinan el desarrollo de las enfermedades. Por todo ello, os animamos a que participéis en la próxima convocatoria, que previsiblemente será en Brasil en 2022, organizada por Emerson del Ponte de la Universidad de Viçosa.

Los *abstracts* del IEW12 se pueden descargar en este enlace.

Nuevas descripciones de Patógenos en España 2018

Juan A. Navas-Cortés

NOTA INFORMATIVA:

Os recordamos la obligación de comunicar a la administración pública competente "... la aparición de organismos nocivos de los vegetales o de síntomas de enfermedad para los vegetales y sus productos, cuando no sean conocidos en la zona...", tal y como establece la Ley de Sanidad Vegetal (Ley 43/2002).

En consecuencia, y con anterioridad a la publicación de los resultados, los investigadores tienen la obligación de ponerse en contacto con el Servicio de Sanidad Vegetal de la comunidad autónoma correspondiente para informar de la detección de nuevos patógenos, si se trata de primeras citas en España.

Igualmente, se debe contactar con dichos servicios ante cualquier nueva detección de un organismo de cuarentena (aunque no sea primera cita en España); ante la duda, se recomienda consultar con estos servicios el posible estatus de organismo de cuarentena para el patógeno identificado.

HONGOS Y OOMICETOS

MAYO

First report of cobweb disease caused by *Cladobotryum dendroides* on shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) in Spain
F. J. Gea, M. J. Navarro y L. M. Suz.
Plant Disease **102** (5): 1030.

First report of *Gnomoniopsis castaneae* causing canker on hybrid plants of *Castanea sativa* × *C. crenata* in Spain
E. Trapiello, I. Feito y A. J. González.
Plant Disease **102** (5): 1040.

JUNIO

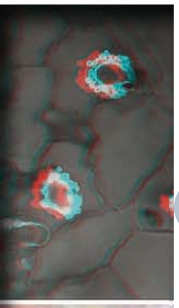
First report of *Pestalotiopsis clavispora (Neopestalotiopsis clavispora)* causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain
C. Borrero, R. Castaño y M. Avilés.
Plant Disease **102** (6): 1178.

***Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe**
V. Guarnaccia, J.Z. Groenewald, J. Woodhall, J. Armengol, T. Cinelli, A. Eichmeier, D. Ezra, F. Fontaine, D. Gramaje, A. Gutierrez-Aguirregabiria, J. Kaliterna, L. Kiss, P. Larignon, J. Luque, L. Mugnai, V. Naor, R. Raposo, E. Sándor, K.Z. Váczy y P.W. Crous.
Persoonia **40**: 135–153.

AGOSTO

First report of *Fusarium petroliphilum* causing fruit rot of butternut squash in Spain
V. González, J. Armengol y A. Garcés-Claver.
Plant Disease **102** (8): 1662.

First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on hemp (*Cannabis sativa*) varieties cultivated in Southern Spain
S. Casano, A. Hernández Cotan, M. Marín Delgado, I. F. García-Tejero, O. Gómez Saavedra, A. Aguado Puig y B. de los Santos.
Plant Disease **102** (8): 1665.



First report of *Fusarium pseudograminearum* causing crown rot of wheat in Europe
C. Agustí-Brisach, M. C. Raya-Ortega, C. Trapero, L. F. Roca, F. Luque, A. López-Moral, M. Fuentes y A. Trapero.
Plant Disease **102** (8): 1670.

OCTUBRE

First report of *Phytophthora capsici* causing wilting and crown and root rot on eggplant (*Solanum melongena*) in Southeastern Spain
M. de Cara, A. Ayala-Doñas, A. Aguilera-Lirola, E. Badillo-López y J. Gómez-Vázquez.
Plant Disease **102** (10): 2044.

NOV.

Survey, identification, and characterization of Cylindrocarpon-like asexual morphs in Spanish forest nurseries
B. Mora-Sala, A. Cabral, M. León, C. Agustí-Brisach, J. Armengol P. y Abad-Campos.
Plant Disease **102** (11): 2083-2100.

First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight in *Pistacia terebinthus* in Spain
A. López-Moral, C. Agustí-Brisach, M. C. Raya-Ortega, L. F. Roca, M. Lovera, O. Arquero y A. Trapero. *Plant Disease* **102** (11): 2374.

First report of *Ilyonectria robusta* causing black foot disease of grapevine in Spain
M. P. Martínez-Diz, E. Díaz-Losada, J. Armengol, M. León, C. Berlanas, M. Andrés-Sodupe y D. Gramaje. *Plant Disease* **102** (11): 2381.

DIC.

First report of *Rosellinia necatrix* causing white root rot in mango trees in Spain
I. Arjona-Girona y C. J. López-Herrera.
Plant Disease **102** (12): 2639.

First report of *Diplodia fraxini* causing dieback of *Fraxinus angustifolia* in Spain
G. Elena, M. León, P. Abad-Campos, J. Armengol, I. Mateu-Andrés y J. Güemes-Heras.
Plant Disease **102** (12): 2645.

FIRST LOOK

First report of root rot on strawberry caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-K in Spain
C. Borrero, I. Avilés-García, N. López y M. Avilés.
Plant Disease, publicado *online* el 19 de septiembre de 2018.

First report of vascular wilt caused by *Fusarium proliferatum* on strawberry in Spain
C. Borrero, N. Capote, M. A. Gallardo y M. Avilés.
Plant Disease, publicado *online* el 20 de septiembre de 2018.

First report of *Penicillium ulaiense* causing postharvest whisker mold of oranges (*Citrus sinensis*) in Spain
L. Palou y V. Taberner. *Plant Disease*, publicado *online* el 29 de octubre de 2018.

BACTERIAS

JULIO

First report of *Streptomyces bottropensis* causing potato common scab in Galicia, Spain

A. Sarwar, Z. Latif y C. Cabaleiro.
Plant Disease **102** (7): 1445.

VIRUS Y VIROIDES

ENERO

First Report of *Onion yellow dwarf virus* in Leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) in Spain

E. Fernández-Tabanera, A. Fraile, P. Lunello, F. García-Arenal y M. A. Ayllón.
Plant Disease **102** (1): 256.

DIC.

First report of Apple Hammerhead Viroid in the United States, Japan, Italy, Spain, and New Zealand

S. A. Szostek, A. A. Wright y S. J. Harper.
Plant Disease **102** (12): 2671.

NEMATODOS

ABRIL

Morphological and molecular characterisation of two new *Hemicycliophora* species (Tylenchida: Hemicycliophoridae) with a revision of the taxonomic status of some known species and a phylogeny of the genus

E. Van den Berg, L. R. Tiedt, G. Liébanas, J. J. Chitambar, J. D. Stanley, R. N. Inserra, P. Castillo y S. A. Subbotin.
Nematology **20** (4): 319-354.

JUNIO

Diversity of root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* Göeldi, 1892 (Nematoda: Meloidogynidae) associated with olive plants and environmental cues regarding their distribution in southern Spain.

A. Archidona-Yuste, C. Cantalapiedra-Navarrete, G. Liébanas, H. F. Rapoport, P. Castillo y J. E. Palomares-Rius.
Plos One **13** (6): e0198236.

150 ANIVERSARIO DEL ORIGEN DEL IVIA

Antonio Vicent y Ester Marco-Noales
Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA)
Moncada (Valencia)

Este año 2018 se celebra el 150 aniversario del origen del Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA), que se remonta al Jardín Provincial de Aclimatación y Campo de Experiencias fundado en 1868 en los Jardines del Real de Valencia. Desde su origen físico en lo que actualmente es el centro de la ciudad de Valencia, la institución fue encadenando cambios de ubicación, nombre y adscripción corporativa hasta llegar a lo que hoy es el IVIA en Moncada. Los antecedentes institucionales del IVIA más destacables en el ámbito de la fitopatología se concretan en la Estación de Patología Vegetal de Valencia, fundada en 1924 en Burjassot, Valencia. Esta institución continuó bajo la denominación de Estación de Fitopatología Agrícola hasta 1970, cuando se integró en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIA) como Centro Regional de Investigaciones Agronómicas de Levante (CRIA), posteriormente Centro Regional de Investigación y Desarrollo Agrario de Levante (CRIDA 07). Dentro de este marco institucional, el Gobierno de España y el Banco Mundial firmaron en 1971 un convenio de colaboración para el desarrollo de la investigación agraria en nuestro país. Este convenio incluía un programa de becas de formación de investigadores en el extranjero, para la obtención del título de Máster y del Doctorado (becas BIRF). Muchos de los investigadores del CRIDA 07 beneficiarios de este programa son, en la actualidad, destacados fitopatólogos y varios de ellos han sido presidentes de la SEF.

Fachada principal del edificio de la Estación de Fitopatología (placa ***derecha***) y la Estación Naranjera (placa *izquierda*) en Burjassot, Valencia, hacia 1934 (Archivo IVIA).

El origen del Institut Valencià d'Investigacions Agràries se remonta al Jardín Provincial de Aclimatación y Campo de Experiencias fundado en 1868 en los Jardines del Real de Valencia

Inauguración de la exposición "Pasado, presente y futuro de la investigación en el IVIA" en el Museo de Ciencias Naturales de Valencia, con presencia del Director del IVIA y la Directora General de Desarrollo Rural y Política Agraria común (Foto del IVIA).

Visitando la exposición (*Foto* del IVIA).

El programa de actividades en torno al 150 aniversario del IVIA se inició el 16 de octubre con un acto conmemorativo, que contó con la intervención del President de la Generalitat Valenciana. El 5 de noviembre se inauguró la exposición "Pasado, presente y futuro de la investigación en el IVIA" en el Museo de Ciencias Naturales de Valencia, que, curiosamente coincide con la ubicación original del Jardín Provincial de Aclimatación. Esta exposición recoge, de forma sintética y con espíritu divulgativo, algunos de los hechos más relevantes de los 150 años de historia del IVIA, con paneles, objetos y publicaciones, así como también la proyección actual y de futuro del instituto. La exposición se complementa con un ciclo de conferencias en la Sociedad Valenciana de Agricultura y la Sociedad de Amigos del País, entidades ilustradas artífices de la creación del Jardín Provincial de Aclimatación a finales del siglo XIX. Hay programadas también varias actividades lúdicas, tanto en la propia exposición del Museo de Ciencias Naturales como en una jornada de puertas abiertas en el IVIA, donde el público tendrá oportunidad de familiarizarse, entre otras cosas, con el diagnóstico de enfermedades de plantas. Ya en el próximo año, el 17 y 18 de enero tendrá lugar un debate científico-técnico en el IVIA sobre el futuro de la producción de alimentos y los nuevos retos para la investigación y la innovación agrarias, donde participarán diferentes centros de investigación agroalimentaria y universidades de la Comunitat Valenciana.

MÁS INFORMACIÓN:

- Zaragoza-Adriaensens, S. (2011). *Origen y actividades del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias 1868-2000*. **241** pp.
- Catalá, J. I. y Guillem X. (2006). *Control de plagas y desarrollo institucional de la Estación de Patología Vegetal de Burjassot (Valencia). Asclepio* **58**: 249-280.

RELATO GANADOR

Una de las novedades del XIX Congreso de la SEF (Toledo) fue la convocatoria de un concurso de relatos breves relacionados con la Fitopatología, en la que pudieron participar todos los socios de la SEF. El jurado, compuesto por los miembros de la Junta Directiva de la SEF, eligió el relato ganador y el finalista, que se publican en este número de la revista. El relato ganador obtuvo un premio de 300 euros.

La única superviviente

Nos hacinábamos en pequeñas cámaras, muy juntas y en silencio, como temiendo que lo peor pudiera ocurrir. Solo unos débiles muros de cristal, algo ennegrecidos por el paso del tiempo nos separaban del ansiado exterior. Habíamos perdido la cuenta del tiempo que llevábamos allí dentro. Meses, quizá años. Los días se habían vuelto monótonos. Siempre las mismas, siempre en el mismo sitio, siempre en silencio.

Recuerdo con claridad el día en que todo comenzó. Una mañana, una como otra cualquiera, alguien abrió la puerta y una brisa de aire húmedo entró haciendo que todas nos agitásemos de emoción. Observábamos algo recelosas cómo se paseaba por la sala, sin prisa, mirándonos fijamente y anotando en una libreta mugrienta. Poco después, como si de Moisés abriendo las aguas del mar Muerto se tratase, comenzó a separarnos en dos, y lo que empezó siendo un simple pasillo terminó pareciéndonos un largo abismo. Ese día no habíamos comido nada. Ni una sola gota de agua había llegado hasta nosotras. Quizá fue por eso por lo que ninguna sospechó cuando el desconocido comenzó a repartir entre nosotras pequeñas cantidades de alimento. El extraño se fue poco después cerrando con llave nuestra pequeña cárcel y ese día de terror quedó relegado al olvido. La vida continuó sin cambios. Veíamos el sol a través del techo de cristal, las nubes, la lluvia y la oscuridad de la noche. Habíamos vuelto a la monotonía.

La primera en sentirse mal pasó desapercibida. Parecía triste, algo melancólica. Al principio no le dimos la mayor importancia ya que no era de extrañar que, en un ambiente tan gris como el que nos rodeaba, alguna de nosotras se sintiera alicaída. Pero esa tristeza pronto se contagió. Poco a poco, una tras otra, fueron perdiendo esa belleza que las había caracterizado.

Algunas palidecían como si el mismo diablo se hubiese acercado y les hubiera susurrado algún secreto. Más tarde un tono amarillento las invadía, envejeciendo cien años en solo unos días. Finalmente, todas eran invadidas por una sequedad devastadora que acababa con ellas sin apenas tiempo para despedirse. Morían, todas morían. Cada día perdíamos a alguna a este lado del abismo, mientras que en el otro nada cambiaba. Nos observaban pavorosas, pero con la tranquilidad que les daba aquella separación, como quien mira detrás de la ventana la tormenta que se ha desatado fuera. Todos los días me preguntaba cuándo llegaría mi hora. El más mínimo malestar hacía que en mi interior, una vocecilla me dijera que este era el fin. Sin embargo, un amanecer al despertar vi con desesperación que era la única que quedaba con vida. A este lado, el paisaje que me rodeaba era desolador. Mirara donde mirara solo veía muerte.

Mi vida continuó allí sola, y volví a perder la noción del tiempo. Creí volverme loca en muchas ocasiones. Pronto empecé a asociar aquella visita inesperada tiempo atrás a lo que había ocurrido. No, no podía ser una simple coincidencia. Por ello miraba la puerta con temor de que volviera a abrirse, hasta que un día finalmente lo hizo.

Hablaban entre sí, y miraban las anotaciones de sus libretas. El más joven vestía una bata blanca. Parecía nervioso, quizá algo excitado. No dejaba de mirarme mientras hablaba rápido, atropellándose a sí mismo. El mayor, más serio, solo asentía. Un escalofrío me recorrió cuando reconocí en el joven a aquel extraño que nos había hecho aquella visita fugaz que lo cambió todo. Él y solo él tenía que ser el culpable de todas nuestras desdichas. Quise gritarle para pedirle explicaciones. Quise reclamarle todo el daño que nos había hecho. ¿Qué clase de ser destruye tantas vidas? ¿Qué significado tenía tanta desolación? Sin embargo, fui incapaz, algo me lo impedía. El miedo, quizá. En un momento determinado se acercó sonriente, y cogiéndome entre sus manos me dijo: "Enhorabuena BG10-01, eres la única superviviente. Pasas a multiplicación *in vitro* para la segunda fase. Tengo todas mis esperanzas puestas en ti. No me falles".

Por David Ruano Rosa

Unidad de Cultivos Leñosos y Hortícolas
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Valladolid

Las últimas visiones

Estrasburgo (Francia), 19 de enero de 1888

— Puccinia graminis, Puccinia graminis…

Los presentes se miran, perplejos ante las palabras que balbucea el hombre. Uno de sus cuatro hijos le toma la mano y la aprieta con ternura; bajo la piel advierte latente ese helor seco y cerúleo que antecede a la muerte. No puede evitar que por sus mejillas resbale alguna lágrima furtiva. El joven observa a su madre, que parece no querer ver cómo a su marido se le escapa la vida con cada exhalación, el aire resonando pedregoso bajo el pecho del enfermo.

— George Fresenius... —vuelve a balbucir el enfermo.

A Antonie Einert, casada con Anton desde 1861, se le eriza la piel al escuchar de manera tan nítida, y de labios del marido que agoniza, el nombre del que fuera experto en talofitas y profesor de Botánica en el Instituto Senckerbert de la localidad alemana de Fráncfort del Meno, donde Anton vino al mundo en el año 1802. No es sino a tan recordado profesor a quien debe Anton –precursor de la Micología como una Ciencia– su inclinación indómita por estudiar las algas, y los hongos.

La mujer abre los postigos del balcón para ventilar la estancia, dominada por los aromas eméticos que empercuden la atmósfera del hospital. Siente en su rostro una bocanada del intenso frío que, como una epidemia imparable, impera en toda la región del Bajo Rin desde hace semanas. Observa el cielo que abriga a la gran urbe, centro histórico y cultural, y a la sazón capital *de facto* de Alsacia, que aún continúa bajo dominio alemán. Desde las ventanas de la habitación pueden verse las techumbres de los edificios cercanos cubiertos por una mortaja de nieve que el véspero tiñe con un lacónico brillo cobrizo. El hombre agoniza en el lecho. Parece tranquilo, aunque su rostro está asaeteado por un rictus de sufrimiento. Hace horas que fue sedado con morfina, para paliarle los intensos y hondos dolores que le causa el cáncer de mandíbula que padece. Los familiares y amigos cercanos que lo velan saben que no llegará con vida a la operación que está programada para intentar erradicarle el mal. En sus caras puede leerse su temor a un desenlace fatal inminente, que la Parca hará acto de presencia en apenas unas horas. Los médicos tampoco son optimistas; sienten impotencia por no poder hacer nada para salvar la vida a tan insigne científico, a un hombre que ha

consagrado su existencia al estudio de la Microbiología y la Botánica, y que, con tesón y esfuerzo, incluso robándole horas de dedicación a la familia que tanto ama, acabó convirtiéndose en una de las eminencias científicas más importantes del siglo XIX, ignorante él de hasta dónde habrían de alcanzar sus descubrimientos y estudios, de cuán necesarios serían en el futuro inmediato las más de cien publicaciones que sacó a la luz de su puño y letra.

Sus hijos, Wilhelm, August, Marie y Herman rebosan de orgullo por la consideración y respeto que recibe su padre desde sitios tan lejanos como Estados Unidos, Rusia o Japón. Sus discípulos, conocedores del mal momento que vive, inundan la sala con mensajes enviados desde un endiablado telégrafo, en los que ensalzan su buen humor, su encanto, y también su rigor y su crítica científica. Para Marshall Ward, es su profesor inspirador, cuya seriedad y honestidad de sus enseñanzas le confirieron su carácter emprendedor en la patología vegetal. Sparrow, un estudiante aventajado de su laboratorio, desea su pronta recuperación y le solicita su presencia para una velada-coloquio sobre parásitos y saprófitos, en realidad un homenaje que los alumnos están organizando desde hace tiempo. Desde la revista *Botanische Zeitung* sienten el cariño y los ánimos para su mejoría y recuerdan la enorme huella que dejó como editor.

Quizá impelido por esa dosis de energía con que la muerte nutre a quienes ha señalado como bastiones por asaltar, Anton abre los ojos y se incorpora en la cama, como empujado por un resorte. Todos le miran atónitos. Él clava la mirada en la pared. Aunque blanca, el moribundo experimenta unas extrañas visiones que hacen que la perciba saturada de manchas semejantes a las que esboza la humedad. Mientras observa las extrañas formas parecidas a micelios, esporas y esporangios, que él solo ve, hace el gesto de escribir sobre la sábana, como si estuviese en su laboratorio de la Universidad de Friburgo de Brisgovia, tomando notas mientras miraba a través del microscopio. Por un momento, echa un vistazo a la zona donde se encuentra una butaca. Cree ver sentada en ella a Emilie von Meyer, su madre, y de pie, a su lado, a Heinrich, su padre, con el que solía hacer excursiones por la campiña para recolectar especímenes botánicos junto a un grupo de naturalistas. Extiende los brazos, como invitándolos a un afable achuchón. Pero súbito, vuelve a fijar la vista en el crisol de manchas de la pared. Señala con el dedo y grita, esta vez con la suficiente claridad como para que se le entienda de manera clara:

-¡¡*Phytophthora infestans, Puccinia graminis*!!

Se refiere Anton al protoctista "fungoide" de la clase Oomicetes, antes llamado *Peronospora infestans*, cuyas esporas biflageladas parece ver con sus propios ojos emergiendo de las hojas de la papa. Rodeado de campesinos, asiente con la cabeza y les reconoce sus conocimientos prácticos sobre el origen de las excrecencias anaranjadas en el trigo. Nadie les había hecho caso, salvo ese curioso profesor que los visitaba indagando con extrañas preguntas interminables. Esta inquietud investigadora y naturaleza inconformista de este "grande" en los avances de la Ciencia le llevó a desterrar aquella insostenible teoría de la *generación espontánea*, demostrando inequívocamente que los microorganismos constituyen la causa y no la consecuencia de las enfermedades de las plantas. La roya del trigo y su nombre quedarían asociados para siempre.

Quienes se encuentran en la habitación no dan crédito a ver cómo un hombre que se halla ante las puertas de la muerte esté repasando nombres de especies invisibles y escurridizas, y que tantas cavilaciones le causaron, como el asunto de desenmascarar los cinco "disfraces" de *Puccinia graminis*, a los que otorgó un nombre ajustado, o la intriga de localizar sus sufridos anfitriones.

Anton de Bary, cansado, se deja caer en la cama. Observa también las manchas de la piel de sus manos, como si ansiase estudiarlas a fondo. Algunas de ellas le resultan parecidas a los líquenes, a cuyos simbiontes saluda y les agradece formar parte de su asociación. Esboza una sonrisa. Respira hondo. Cierra los ojos…

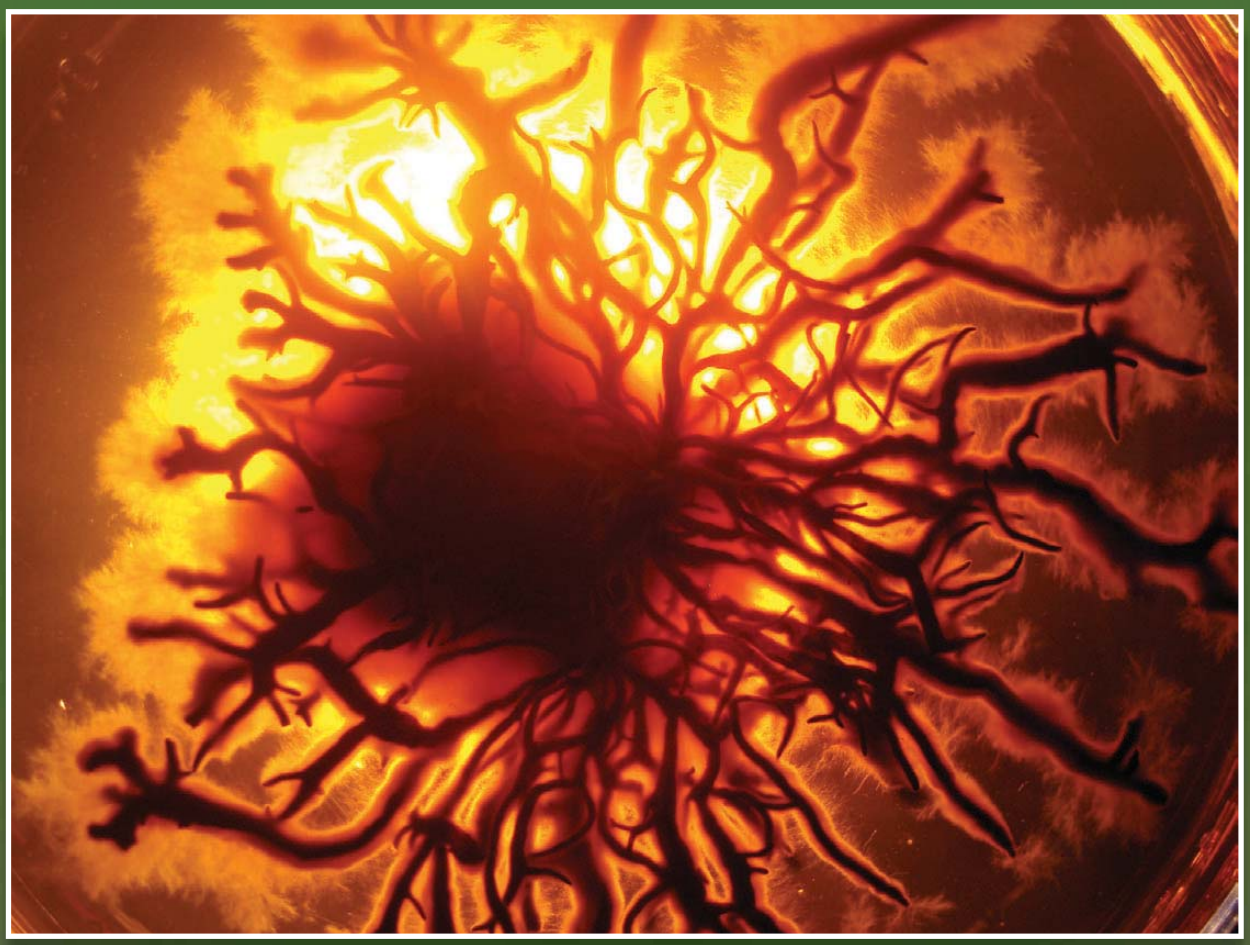
Por Francisco T. Arroyo Cordero

Área de Protección Vegetal Sostenible
IFAPA Las Torres
Alcalá del Río, Sevilla.

Premio SEF de Fotografía Científica en Fitopatología "MIGUEL CAMBRA"

Como es tradicional en los Congresos SEF, en el marco del XIX Congreso SEF celebrado el pasado mes de octubre en Toledo, tuvo lugar el concurso de Fotografía Científica, que este año recibió el nombre de «Premio SEF en Fotografía Científica en Fitopatología "Miguel Cambra"». El jurado estuvo compuesto por los miembros de la Junta Directiva de la SEF.

La fotografía ganadora, que puede verse a continuación, y que fue premiada con 200 euros, la presentó **JORGE POVEDA ARIAS**, investigador predoctoral del Grupo de Fitopatología y Control Biológico del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), laboratorio 2, de la Universidad de Salamanca. Se titula "Amanecer".



Vista de una placa de Petri con medio de cultivo MEA (extracto de malta y agar), en la cual el hongo fitopatógeno *Armillaria mellea* está en plena expansión de su micelio. Este micelio presenta una clara forma radicular (rizomorfo), formando cuerdas compuestas por hifas alineadas en paralelo unas a otras. Causa en las plantas (como las encinas) la podredumbre de su sistema radicular, con lo que acaba produciendo la muerte por inanición, al no poder absorber el agua y los nutrientes del suelo. Es una imagen sobrecogedora que nos permite adentrarnos en el mundo subterráneo y mortal de este hongo (*Fotografía* realizada en el Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia –Salamanca- de la Junta de Castilla y León, a partir de su colección de hongos fitopatógenos).

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (SEF)

Dpto. de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).
Ctra. de La Coruña Km 7,5, Madrid-28040.

Teléfono: 913 364 532 / 918 373 112
sef@sef.es // www.sef.es

ISSN (digital): 2659-2975

Socios protectores de la SEF:

Coordinadores de la revista:

JUAN A. NAVAS-CORTÉS / NIEVES CAPOTE MAÍNEZ

Colaboradores de este número:

AITOR ÁLVAREZ-GILA
FREDERIC APARICIO
FRANCISCO T. ARROYO
MATILDE BARÓN AYALA
EDUARDO R. BEJARANO
MARIANO C. ÁLVAREZ
NIEVES CAPOTE
MARTINA CENDOYA
JAIME CUBERO
ANTONIO DE VICENTE
ANA DÍEZ NAVAJAS
JONE ECHAZARRA
CAROLINA ESCOBAR
CARMEN G.-LAMA CABANÁS
ELISA GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ
JOSÉ ANTONIO GUTIÉRREZ
CARMEN HERNÁNDEZ
ALEXANDER JOHANNES
ELENA LÁZARO
DIEGO LÓPEZ MÁRQUEZ
ANA P. LUNA
ESTER MARCO-NOALES
JESÚS MERCADO-BLANCO
JUAN A. NAVAS-CORTÉS
AMAIA ORTIZ-BARREDO
VICENTE PALLÁS
MªLUISA PÉREZ-BUENO
ARTZAI PICÓN
MÓNICA PINEDA DORADO
JORGE POVEDA ARIAS
CAYO RAMOS
SERGIO RODRÍGUEZ-VAAMONDE
DAVID RUANO ROSA
MAXIMILIAM SEITZ
ANTONIO VICENT
CARMEN VIDA

Miembros de la Junta directiva de la SEF:

Presidente: VICENTE PALLÁS
Vicepresidente: CAROLINA ESCOBAR
Secretaria: ARÁNZAZU MORENO
Tesorero: FRANCISCO CAZORLA

Vocales: NIEVES CAPOTE
CARMEN HERNÁNDEZ
DIEGO OLMO
SOLEDAD SACRISTÁN
ANTONIO VICENT

Edición y coordinación:
ALICIA IRURZUN
(Editorial Hélice)
Tlf: 91 548 11 90

Diseño y maquetación:
ANTONIO V. ROBLES
Tlf: 675 651 107

Página web:
ANTONIO VICENT y
DIEGO OLMO

La responsabilidad del contenido de las colaboraciones aquí publicadas corresponderá a sus autores, quienes autorizan la reproducción de sus artículos e imágenes a la SEF exclusivamente para esta revista. La SEF no hace necesariamente suyas las opiniones o los criterios expresados por sus colaboradores.

***© Sociedad Española de Fitopatología, 2018**. Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.*

FOTOGRAFÍA DE PORTADA: Composición de imágenes extraídas de las cuatro revisiones que pueden encontrarse en este número 3 de la revista SEF dedicado a las *Nuevas tecnologías en Fitopatologia*. El crédito de cada imagen (cortesía de sus autores) puede verse dentro de su respectiva revisión (*orden*, de izda. a derecha, arriba y abajo: II, I, III y IV). TIRAS DE FOTOS en páginas 74, 75 y 76, procedentes de los socios de la SEF:

- Pimiento infectado por el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) [C. Muñoz, 3/10/2012]
- Sección de pseudoteca de *Didymella rabiei* [J. Navas, 4/10/2012]
- Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en *Pyracantha coccinea* [Jesús Murillo, 12/9/2012]
- Esporangios de *Phytophthora palmivora* [Cristina R. Padrón, 22/1/2013]
- Como hormigas al hormiguero. SEF-Phytoma 2012 [Marta Sena, 22/1/2013]
- *Aspergillus* en naranja [Paloma Sánchez Torres, 28/9/2012]
- Interacción patógeno-planta en 3D. SEF-Phytoma 2012 [Jesús Martínez, 22/1/2013]
- *Polymyxa betae* en remolacha [P. García-Benavides e I. Ortega, 11/9/2012]
- Mildiu del girasol causada por el oomiceto *Plasmopara halstedii* [M. Leira Molinero, 22/1/2013]
- *Phytophthora capsici* [Juana Páez, 11/9/2012]
- Moteado en hoja de níspero (*Fusicladium eriobotryae*) [SEF, 3/10/2012]

Los créditos de las imágenes del índice pueden verse en sus respectivos apartados.