

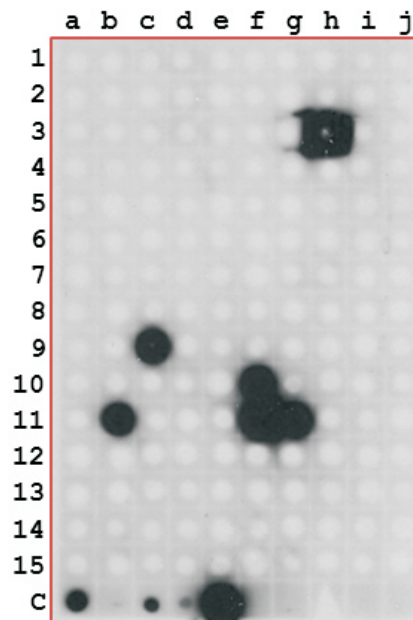
## Nuevas tendencias en la detección de virus de plantas: detección simultánea de todos los patógenos de un cultivo por la hibridación molecular

**Jesús Ángel Sánchez-Navarro**, Científico Titular CSIC Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 46019, Valencia, España. Correspondencia: [Jesanche@ibmcp.upv.es](mailto:Jesanche@ibmcp.upv.es)

Las líneas de investigación en las que estamos trabajando dentro de la Virología de Plantas abarcan tres campos bien diferenciados: 1) estudio del transporte viral, 2) desarrollo de vectores virales y 3) puesta a punto de nuevos métodos de detección viral. En el estudio del transporte viral estamos interesados tanto entender cómo funcionan las proteínas virales responsables del transporte o proteínas de movimiento (MP), con especial atención en las MPs incluídas en la familia 30K (Melcher, 2000), como en caracterizar factores del huésped implicados en su función. El desarrollo de nuevos vectores virales tiene un doble interés: biotecnológico y/o disponer de herramientas moleculares para el estudio del ciclo viral (Sánchez-Navarro *et al.*, 2001). Finalmente, en el desarrollo de nuevas técnicas de detección viral nos hemos centrado en la puesta a punto de métodos moleculares, con especial interés en la hibridación molecular, por sus ventajas y como clara alternativa a los métodos serológicos (Pallás *et al.*, 2011).

A diferencia de lo que ocurre con bacterias y hongos, no existe un tratamiento efectivo de control para enfermedades de etiología viral y/o viroidal, siendo el diagnóstico precoz el principal método de control para estos patógenos. Tradicionalmente, los ensayos de infección viral se han basado en el bioensayo o la técnica serológica ELISA. Sin embargo, ambas técnicas presentan claros inconvenientes relacionados con el espacio/tiempo requerido, la incapacidad de identificar el patógeno (bioensayos) o la ausencia de anticuerpos contra importantes patógenos así como la imposibilidad de detectar agentes viroidales (ELISA). En los últimos años se han puesto a punto técnicas de detección basadas en el componente molecular de patógeno (RT-PCR, PCR a tiempo real -TaqMan-, etc) que han permitido incrementar significativamente el límite de detección a costa de encarecer el precio final del análisis. Por tal motivo, las tendencias en las técnicas de detección se han centrado en reducir costes/tiempo mediante la detección simultánea de varios patógenos. En nuestro laboratorio nos hemos centrado en la técnica basada en la Hibridación Molecular (Owens and Diener, 1981; Garger *et al.*, 1983; Maule *et al.*, 1983), en donde la utilización de marcadores no radioactivos (digoxigenina, biotina, etc) ha permitido incorporarla al análisis rutinario de patógenos virales y/o viroidales, mostrándose como clara alternativa a las técnicas serológicas, más si cabe cuando permite el análisis simultáneo de múltiples patógenos mediante la mezcla de sondas (Saldarelli *et al.*, 1996; Sánchez-Navarro *et al.*,

1999). La observación de que la detección simultánea de virus puede realizarse mediante una única sonda o Polisonda (Herranz *et al.*, 2005) que contiene, fusionadas en tandem, las diferentes secuencias virales y permite la detección de patógenos con genoma RNA o DNA, abre expectativas muy interesantes que permitirían diseñar incluso Polisondas de cultivo, con capacidad para detectar todos los patógenos involucrados (virus, viroides, hongos, bacteria, etc.). En la actualidad esta tecnología se ha puesto a punto para la detección de los principales virus que afectan al cultivo del clavel (7 virus) y gerbera (6 virus) así como los principales virus y viroides que afectan a frutales de hueso (8 virus y 2 viroides) (Peiró *et al.*, 2012), vid (13 virus y 5 viroides) y tomate (15 virus y 4 viroides), siendo ya utilizada en empresas españolas en detrimento del test serológico ELISA. La observación de que, además de la detección simultánea de hasta 20 patógenos diferentes, esta tecnología permite realizar prospecciones a gran escala, con un



Análisis de 150 muestras de clavel mediante hibridación molecular y una polisonda para 7 virus. Muestras 3h, 9c, 10f, 11b, 11f y 11g positivas. Línea C, controles. Resto de muestras negativas para los 7 virus.

procesado muy simple del tejido, en un tiempo reducido (1-2 días), con una sensibilidad similar al test ELISA y con un bajo coste, hace que se presente como una clara alternativa al test serológico. En la actualidad estamos analizando la capacidad de esta tecnología para detectar, junto con virus y viroides, hongos y/o bacterias fitopatógenas.

#### Referencias Bibliográficas

- Garger, S., Turpen, T., Carrington, J., Morris, T.J., Jordan, R., Dodds, J.A., and Grill, L. 1983. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:21-25.
- Pallás, V., 2011. Molecular Hybridization Techniques for Detecting and Studying Fruit Tree Viruses and Viroids. In *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. (Hadidi, A., Barba, M., Candresse and T., Jelkmann, W. Eds), Chapter 59, pp. 333-339. APS Press/American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Herranz, M.C., Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., and Pallas, V. 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods* 124:49-55.
- Maule, A.J., Hull, R., and Donson, J. 1983. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *Journal of Virological Methods* 6:215-224.
- Melcher, U. 2000. The '30K' superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology* 81:257-266.
- Owens, R.A., and Diener, T.O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic Acid hybridization. *Science* 213:670-672.
- Peiró, A., Pallás, V., and Sánchez-Navarro, J. 2012. Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology* 132:469-475.
- Saldarelli, P., Barbarossa, L., Grieco, F., and Gallitelli, D. 1996. Digoxigenin-labeled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease* 80:1343-1346.
- Sanchez-Navarro, J., Miglino, R., Ragozzino, A., and Bol, J.F. 2001. Engineering of alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector. *Archives of Virology* 146:923-939.
- Sanchez-Navarro, J.A., Canizares, M.C., Cano, E.A., and Pallas, V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *Journal of Virological Methods* 82:167-175.