

LABORATORIS DE FITOPATOLOGIA: CENT ANYS D'HISTÒRIA

Carmina Monton Romans

Laboratori de Sanitat Vegetal. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Generalitat de Catalunya

RESUM

Es coneix des de l'antiguitat que les plantes tenen malalties, però no és fins que s'inventen eines d'observació, com la lupa i el microscopi, que realment es comencen a descobrir i estudiar els organismes causants d'aquestes malalties.

L'increment del comerç entre diferents continents obliga els països a tenir cura de l'estat sanitari del material vegetal que es transporta per tal d'evitar la introducció de noves plagues i malalties. És llavors que es comencen a crear els primers laboratoris de fitopatologia, generalment situats al mateix punt d'entrada, port, frontera...

A Europa, és amb l'entrada en vigor del passaport fitosanitari el 1993 que a Espanya es posen a punt laboratoris de fitopatologia encarregats dels programes de detecció i eradicació de patògens de quarantena amb tècniques que ja es fan servir en medicina i patologia animal, però encara poc desenvolupades en patologia vegetal.

PARAULES CLAU: malaltia, plaga, diagnòstic, patogen.

RESUMEN

Desde muy antiguo se conoce que las plantas sufren enfermedades, pero no es hasta que se inventan herramientas de observación, como la lupa y el microscopio, que realmente se empiezan a descubrir y estudiar los organismos causantes de estas enfermedades.

El incremento del comercio entre diferentes continentes obliga a los países a cuidar el estado sanitario del material vegetal que se transporta para evitar la introducción de nuevas plagas y enfermedades. Es entonces cuando se empiezan a crear los primeros laboratorios de fitopatología, generalmente situados en el mismo punto de entrada, puerto, frontera...

Es con la entrada en vigor en Europa del pasaporte fitosanitario en 1993, que en España se ponen a punto los laboratorios de fitopatología con el objeto de llevar a cabo los programas de detección y erradicación de patógenos de cuarentena, con

Correspondència: Carmina Monton Romans. A/e: cmonton@gencat.cat.

técnicas que ya eran muy usadas en medicina y en patología animal, pero aún estaban poco desarrolladas en patología vegetal.

PALABRAS CLAVE: enfermedad, plaga, diagnóstico, patógeno.

L'home té consciència de les malalties de les plantes des de molt antic. Ja a l'antic testament es parla de *míldius* i *carbons* com a calamitats tan importants com podien ser les guerres. Gràcies als fòssils sabem que les malalties de les plantes eren presents al món abans de l'aparició dels humans, i que totes les espècies de plantes cultivades i salvatges són susceptibles de tenir malalties o plagues.

Naturalistes com Teofrast (antiga Grècia) van ser els primers d'observar les malalties en arbres, cereals i lleguminoses. No obstant això, no és fins al segle XVII que Anton van Leeuwenhoeck inventa el microscopi, i pot observar per primera vegada organismes com *Giardia intestinalis* flagel·lada (protozou paràsit intestinal). És així com comença una nova era en les ciències de la vida.

Gràcies a l'ús del microscopi s'estudia l'anatomia de les plantes, es descobreixen els fongs, les bacteris i altres microorganismes. Michelli, el 1729, observa que les partícules de pols d'un fong dipositades sobre una rodanxa de meló recent tallat reproduïen sovint el mateix fong. És a partir d'aquí que es comença a parlar d'espores. Mayer, el 1886, va ser qui es va adonar que la malaltia anomenada *mosaic del tabac* es transmetia a través del suc de les plantes malaltes aplicat sobre plantes sanes, però no va veure cap fong al microscopi i es va pensar que es podia tractar d'una bacteris. Ivanowsky, el 1892, va comprovar que l'agent causal del mosaic del tabac era capaç de travessar els filtres bacteriològics i el va anomenar *fluid viu contagiós* o virus.

No obstant això, no és fins al 1900 que Brefeld desenvolupa tècniques per al cultiu *in vitro* de microorganismes i que més tard Kock i Petri les perfeccionen. Amb el cultiu de fongs i bacteris en medis artificials i els avenços en la microscòpia, s'inicia una fase important de la fitopatologia, l'observació morfològica i la taxonomia.

Sense tots aquests coneixements tan valuosos, és impensable l'existència dels actuals laboratoris de fitopatologia. Durant el segle XIX, el que fins llavors havia estat l'estudi de la naturalesa per «homes de ciència», o de vegades, només per curiositat, esdevé una eina indispensable per a tots els països amb línies comercials internacionals. Com a conseqüència de l'increment del transport, de material vegetal per a l'alimentació i el conreu entre continents, i de la necessitat de crear recintes de quarantenes, destinats a la detecció de possibles noves plagues i malalties que acompanyen el material vegetal procedent d'altres països, es creen els primers laboratoris de fitopatologia.

És també durant el segle XIX que s'adonen que un diagnòstic a temps pot evitar importants pèrdues econòmiques que poden arribar a ser crítiques en la vida dels habitants d'un país.

De mica en mica va anar creixent el ventall d'organismes que podien malmetre els diferents conreus posant de manifest que una lupa binocular i un microscopi no eren suficients per obtenir un diagnòstic rigorós i ràpid. No era possible detectar virus ni classificar bacteris amb fiabilitat si no es disposava d'un utilitatge especialitzat i que en molts casos ja es feia servir rutinàriament en el món de la sanitat animal i la medicina.

Els anys seixanta, la tècnica serològica ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) es començà a fer servir per a la detecció de virus animals i s'adaptà a la detecció del virus de la patata (*Potatoleafroll virus*) (Clark i Adams, 1977). L'any següent es posà a punt per al virus de l'anomenada «tristeza de los cítricos» i altres conreus ja que es va veure que podia ser utilitzada com a tècnica rutinària en laboratoris de fitopatologia i en la certificació de material sa.

A partir d'aquest moment es van deixar de banda tècniques de transmissió per empelt i transmissió mecànica en indicadors herbacis i es van imposar tècniques serològiques. Gràcies a l'aposta que van fer diversos laboratoris químics internacionals, actualment es disposa d'anticossos comercials per a la detecció de la major part de virus i bacteris patògens per als vegetals.

En veure com creixia el nombre de mostres provinents de prospecció en vivers de material vegetal de reproducció, es va posar a punt la tècnica de la immunoimpresió. Es tracta d'una tècnica comercial de detecció ràpida, dissenyada per a mostres molt nombroses, que té una tècnica amb una alta especificitat per detectar virus, si es fan servir anticossos monoclonals específics, i no requereix cap preparació de l'extracte vegetal, ja que s'exprimeix directament sobre una membrana de nitrocel·lulosa. És un mètode ràpid i barat si es compara amb altres tècniques serològiques o moleculars i actualment és encara molt utilitzat.

Als anys vuitanta es va posar a punt l'anàlisi quantitativa i qualitativa dels àcids greixosos de les parets de les bactèries, mitjançant la cromatografia de gasos, coneguda comercialment com a Microbial Identification System (MIS), una eina molt útil i innovadora per a la detecció de bacteris fitoparàsits. Aquesta tècnica es fa servir per primera vegada a l'Estat espanyol al Laboratori de Sanitat Vegetal de Barcelona i esdevé una eina de gran ajuda i col·laboració per als altres laboratoris del país. Un requisit indispensable en l'ús d'aquesta tècnica és treballar amb cultius bacterians purs, cosa no sempre fàcil d'aconseguir si partim de material vegetal malalt i, per tant, moltes vegades excessivament deteriorat.

Per a la detecció d'organismes patògens (fongs i bacteris), rutinàriament es continuaven fent servir mètodes microbiològics, més o menys sofisticats

(cultius en medis artificials) i molt lents, que no sempre permetien aconseguir els resultats esperats, ja que a mesura que disminuïa el nombre d'unitats formadores de colònies en l'hoste, es feia més difícil el cultiu en medis artificials.

És amb l'entrada en vigor del Reial decret 2071/1993, relatiu a les mesures de protecció contra la introducció i difusió en el territori nacional i la CEE d'organismes nocius i la creació del passaport fitosanitari, que es posen a punt als laboratoris de diagnòstic (1994) encarregats dels programes de detecció i eradicació de patògens de quarantena tècniques com la immuno-fluorescència (IF), que permeten una detecció ràpida i fiable d'alguns patògens de control obligat.

El químic Kary Mullis, el 1986, va desenvolupar la tècnica PCR (*Polimerasa chainreaction*), que té com a objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA particular, partint d'un mínim que pot ser una sola còpia d'aquest fragment o motlle. Aquesta tècnica no va trigar gaire a ser una eina indispensable en laboratoris de fitopatologia, atès que permet de manera ràpida i acurada la identificació d'un patògen, altrament difícil o impossible de cultivar *in vitro*. El Laboratori de Sanitat Vegetal de Barcelona, mitjançant aquesta tècnica, és pioner en la detecció de la flavescència daurada, una nova malaltia en el país causada per un fitoplasma.

Algunes variacions en tècniques moleculars són la PCR Cooperativa, que permet l'acció simultània de quatre iniciadors (Olmos, 2002), i que està especialment dissenyada per a virus d'RNA. Altres variants són la PCR múltiple, que permet detectar simultàniament dianes de DNA i RNA en una sola reacció, cosa que en simplifica molt el procés.

La hibridació molecular permet l'anàlisi rutinària d'un gran nombre de mostres per un mateix patògen. En aquest cas es treballa amb l'extracte de mostres vegetals sobre una membrana de niló carregada positivament i amb sondes de seqüències homòlogues a la del patògen que es vol detectar (Gerhardt, 1981).

Actualment, la tècnica PCR a temps real és l'eina de qualsevol laboratori de fitopatologia per a una detecció immediata sensible, específica i sense risc, de contaminacions de manipulació del material genètic amplificat.

No hem d'oblidar que una acurada observació i el reconeixement de símptomes han estat, i seran, el pas previ de la utilització de qualsevol tècnica, i aquesta seguirà sent la feina del fitopatòleg en un laboratori de diagnòstic.

BIBLIOGRAFIA

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. (1977). «Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses». *Journal of General Virology*, núm. 34, p. 475-483.

Laboratoris de fitopatologia: cent anys d'història

- GERHARDT, P. (1981). *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, núm. 51, p. 263-273.
- OLMOS, A.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. (2002). «Simultaneous and Co-perational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses». *Journal of Virological Methods*, núm. 106, p. 51-59.