

Recibido: 01.10.2021 • Aceptado: 03.11.2021

Palabras clave: Diagnóstico rápido, sensores espectrales, seguridad alimentaria.

Espectroscopia Raman: Innovación para el diagnóstico fitosanitario

MOISÉS ROBERTO VALLEJO PÉREZ

moises.vallejo@uaslp.mx

HUGO RICARDO NAVARRO CONTRERAS

hnavarro@uaslp.mx

COORDINACIÓN PARA LA INNOVACIÓN Y LA APLICACIÓN DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA, UASLP

Agricultura de precisión y fitosanidad

La agricultura es una de las actividades más importantes para el sostenimiento de las sociedades y la supervivencia de la especie humana. Es posible predisponer de múltiples comodidades, pero el alimento es insustituible. Además, el crecimiento constante de la población mundial exige mayor disponibilidad de alimentos. Las acciones inmediatas para solucionar dicha problemática consisten en reducir las pérdidas durante la poscosecha e incrementar la producción agrícola. Esta última puede realizarse mediante la ampliación de áreas de cultivo, pero los daños ecológicos que ocasiona son crecientes e insostenibles. Por lo tanto, el desarrollo e implementación de tecnologías que permitan incrementar la eficiencia de los sistemas productivos es la alternativa más viable y sostenible en el largo plazo (FAO, 2017).



La espectroradiometría, la espectroscopia, el procesamiento de datos mediante inteligencia artificial y la compilación de datos mediante interconexión digital (IoT= internet of things), son algunas tecnologías que facilitan la gestión agrícola comúnmente conocida como agricultura de precisión. Diferentes instrumentos con sensores integrados son utilizados para monitorear el crecimiento de los cultivos a diferentes escalas espaciales y calcular los rendimientos potenciales, precisar el manejo del riego y monitoreo del estado del tiempo, entre otros.

La obtención de cultivos altamente productivos requiere del uso de diferentes insumos, tecnología y mano de obra calificada; sin embargo, aun así pueden ocurrir brotes de enfermedades que vulneren la seguridad alimentaria y afectar la salud de las plantas cultivadas. Dichas enfermedades pueden ser causadas por diferentes microorganismos como hongos, bacterias, virus, viroides; ocasionalmente pueden ser transmitidas por insectos vectores, lo cual aumenta el nivel de dificultad para su monitoreo y su control. Las enfermedades con una etapa asintomática son particularmente destructivas, ya que dificultan el seguimiento epidemiológico y control oportuno. El uso e implementación de tecnologías que permiten la detección temprana de dichas enfermedades y la identificación rápida de sus agentes causales son particularmente deseables. La detección rápida y oportuna facilitará la eliminación de plantas enfermas que pudieran contagiar a otras que están sanas; también permitirá aplicar oportunamente los tratamientos preventivos o curativos, los cuales reducirán los efectos dañinos sobre la población total, así se evitarían pérdidas en la productividad.

La espectroscopia Raman (ER) es una tecnología que ha mostrado importantes

avances como técnica para el diagnóstico confirmatorio de enfermedades que afectan a cultivos como la naranja, chile, tomate, granos básicos y plantas ornamentales. Es importante destacar que la ER se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad, es una técnica rápida, portable y no requiere de reactivos ni preparación especial de la muestra, se realiza *in situ* en tiempo real y se considera una técnica no destructiva.

¿Cómo funciona la espectroscopia Raman?

El efecto Raman fue descrito por vez primera por el físico hindú Chandrasekhara Venkata Raman en 1928, quien posteriormente fue merecedor del premio Nobel de Física en 1930. La invención del láser y los dispositivos de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés) altamente estables fueron innovaciones tecnológicas que permitieron la miniaturización de los espectrómetros Raman. La espectroscopia Raman (ER) pertenece a la categoría de espectroscopia vibracional, ya que la determinación e identificación de la estructura molecular se realiza mediante la interacción de luz monocromática emitida por el láser (radiación electromagnética) y las vibraciones moleculares. La luz incidente puede dispersarse y no manifestar cambios (dispersión Rayleigh), pero un pequeño porcentaje de los fotones emitidos (10⁻⁶ fotones) pierden algo de energía (dispersión inelástica), ya que la vibración molecular causa un cambio en la energía de los fotones (o equivalentemente de su frecuencia). Por lo tanto, el efecto Raman es descrito como una colisión inelástica entre los fotones y las moléculas, lo cual ocasiona que la molécula adquiera diferente energía vibracional y el fotón disperso ahora tenga diferente energía (o frecuencia), que se analiza con un espectrógrafo; así se obtiene el espectro Raman resultante de la muestra analizada (Figura 1).

La aplicación de la espectroscopia Raman en la fitosanidad

Diagnóstico fitosanitario

La posibilidad de utilizar la ER para el diagnóstico de enfermedades en plantas, tiene su fundamento en una serie de reacciones bioquímicas que se generan durante la interacción planta-patógeno, las cuales por lo general son específicas, ya que están mediadas genéticamente por ambos participantes. El agente patógeno evolucionó para superar las barreras físicas y bioquímicas desarrolladas por la planta hospedante; esta última también ha generado mecanismos de defensa constitutivos (pasivos) y sistemas de reconocimiento temprano que activan sus sistemas de defensa. Este fenómeno se ha perfeccionado durante millones de años de evolución y se describe como la fisiología de la interacción planta-patógeno. Por lo tanto, los espectrómetros Raman permiten analizar el estado bioquímico de las células y, mediante marcadores bioquímicos previamente identificados, es posible determinar la ocurrencia de un factor estresante biótico (microorganismo) o abiótico en el hospedante analizado. Cabe destacar que es indispensable contar con

información preliminar del fenómeno que se estudia, como estudios histológicos, de regulación génica (activación y supresión de genes), producción de metabolitos específicos y proteínas, actividad enzimática, anomalías en rutas bioquímicas, por mencionar algunos. Dicha información es indispensable para la adecuada interpretación de los espectros Raman.

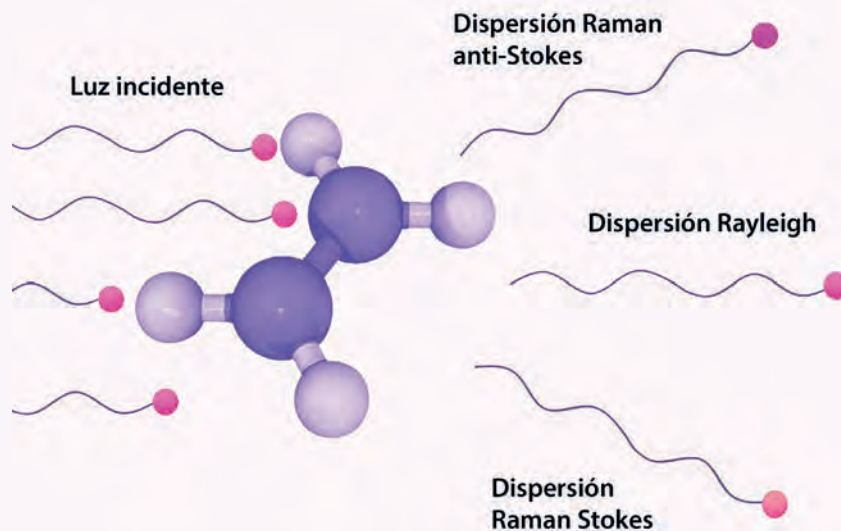
Identificación microbiana

Para la identificación rápida de un microorganismo patógeno asistida por ER, es necesario caracterizarlo espectralmente con antelación. Dicho microorganismo debe estar identificado previamente por al menos dos técnicas, según los procedimientos aprobados vigentes; posteriormente, la información espectral sirve de insumo para diferenciarlo de otros microorganismos. Por lo tanto, las muestras vegetales de interés son procesadas, los microorganismos son aislados y purificados, éstos se colocan de forma individual sobre sustratos en los cuales se hace incidir la luz láser sobre la muestra microbiana, lo que resulta en la obtención de su espectro Raman característico. Cada espectro Raman representa a los diferentes

constituyentes de la célula analizada, incluyendo su pared celular, membrana y contenido del citoplasma. Los microorganismos poseen componentes homólogos; sin embargo, también cuentan con componentes específicos como el tipo de ácidos grasos, proteínas y pigmentos. Estos elementos permiten su efectiva diferenciación de otros microorganismos. Para amplificar la señal del tipo de moléculas constituyentes, puede utilizarse una variación de la ER conocida como dispersión Raman para mejorar la superficie (SERS, por sus siglas en inglés), la cual incluye el uso de nanopartículas metálicas que realzan la señal Raman y posibilitan incluso el estudio de partículas virales (Weng *et al.*, 2021).

El espectro Raman conlleva entonces una huella espectral fiel de los diferentes modos vibracionales de los enlaces covalentes o iónicos de los átomos constituyentes que integran a las moléculas. La correcta interpretación de los espectros Raman requiere la consulta de librerías espectrales de referencia y conocer preferentemente de antemano las características químicas del fenómeno o microorganismo que se estudia.

Figura 1.
Efecto Raman, el cual describe la dispersión inelástica de un fotón al colisionar con una molécula.



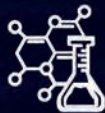
Espectroscopia Raman



El efecto Raman es descrito como una colisión inelástica entre los fotones y las moléculas, lo cual ocasiona que la molécula adquiera diferente energía vibracional.



Mediante la interacción de luz monocromática emitida por un láser y las vibraciones moleculares es posible determinar e identificar la estructura de las moléculas, técnica conocida como espectroscopia Raman (ER).



Durante la interacción planta-patógeno se generan una serie de reacciones bioquímicas generalmente específicas, lo cual permite a la ER censar el estado bioquímico de las células.



La ER ha mostrado ser una técnica sensible y precisa para el diagnóstico confirmatorio de enfermedades de los cultivos.



La ER incrementa la eficiencia en la detección temprana de enfermedades bióticas y abióticas en cultivos agrícolas, lo anterior permite el incremento de los rendimientos y la reducción de la contaminación ambiental.

La espectroscopia Raman y el diagnóstico del cáncer bacteriano del tomate

El uso de la espectroscopia Raman como método de diagnóstico confirmatorio de enfermedades de los cultivos son innovaciones que se desarrollan en la Coordinación para la Innovación y la Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT). Actualmente se ha estudiado a la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del tomate (CBTo) que afecta al mismo cultivo (*Lycopersicon esculentum* L.), es ocasionada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). El patosistema estudiado es particularmente complejo e involucró el desarrollo de dos investigaciones; la primera resume el procedimiento para la identificación preliminar de la bacteria en condiciones de laboratorio durante un proceso de contagio activo en campo, lo que permitió la reducción de tiempos y disponer rápidamente de un diagnóstico preliminar (Vallejo, Navarro, Sosa, Lara, Ramírez, Díaz Barriga, 2018). La segunda investigación se enfocó en la caracterización de la planta enferma e identificar los marcadores bioquímicos y anomalías espectrales en plantas asintomáticas infectadas, para identificarlas de forma oportuna (Vallejo, Sosa, Navarro, Álvarez, Rodríguez y Lara, 2021). Ambas investigaciones son complementarias y son desarrollos pioneros a nivel nacional, resultado del trabajo interdisciplinario e interinstitucional (CentroGeo) que involucró las áreas de la física, agronomía y matemáticas.

Los procedimientos para la identificación de microorganismos en condiciones de laboratorio, involucra el uso de técnicas de tipo inmunológicas, el aislamiento, purificación y cultivo en medios específicos, caracterización metabólica, extracción de ácidos nucleicos (ADN y RNA) y la subsecuente amplificación y secuenciación de

regiones específicas de genoma. La sensibilidad y especificidad de cada técnica es variable, pero en todos los casos es necesario esperar un periodo que varía entre 1 y 2 semanas para generar un resultado. Sin embargo, durante el desarrollo de una epidemia, dicho periodo puede conllevar a la muerte del cultivo. Los productores generalmente aplican tratamientos bajo prueba y error, hasta menguar la velocidad de contagio, pero en ocasiones ninguno es efectivo y las pérdidas son totales. La identificación de la bacteria Cmm en plantas de tomate durante un proceso de contagio activo (Vallejo, Navarro, Sosa, Lara, Ramírez, Díaz Barriga, 2018) demostró valores aceptables de sensibilidad y especificidad para diferenciarla de otras bacterias endófitas y saprofitas que crecen en medios generales, por lo tanto, el perfil espectral Raman de la bacteria Cmm permitió su rápida diferenciación y así disponer de un diagnóstico preliminar, lo cual posibilita la aplicación inmediata de medidas efectivas de control y saneamiento fitosanitario.

La búsqueda de plantas enfermas es una labor que requiere la experiencia del trabajador, ya que por lo general se realiza visualmente; sin embargo, las enfermedades con periodos de incubación prolongados conllevan a que las poblaciones del cultivo se conformen por plantas sanas, sintomáticas enfermas y asintomáticas infectadas. El cáncer bacteriano del tomate presenta estas características particulares y cuando se detecta una planta enferma, generalmente también existen otras infectadas, pero en condición asintomática, subestimándose la incidencia real de la enfermedad. La detección oportuna de las plantas asintomáticas enfermas, cobra gran importancia para reducir los procesos de contagio (Figura 2). La espectroscopia Raman presentó valores de sensibilidad y especificidad mayores al 95 por ciento para detectar estas plantas asintomáticas (Vallejo, Sosa, Navarro, Álvarez, Rodríguez y Lara, 2021), lo cual supera definitivamente a los procedimientos de búsqueda visual (figura 3).



Figura 2. Población de plantas de tomate (*L. esculentum*) bajo un sistema de producción intensiva en condiciones de invernadero.

Es doctor en Ciencias por el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. En la actualidad es investigador en la Coordinación para la Innovación y la Aplicación de la Ciencia y Tecnología de la UASLP, en donde lleva a cabo el proyecto "Diagnóstico temprano de enfermedades en plantas durante su etapa asintomática mediante el monitoreo bioquímico asistido por sensores espectrales y su volatiloma".

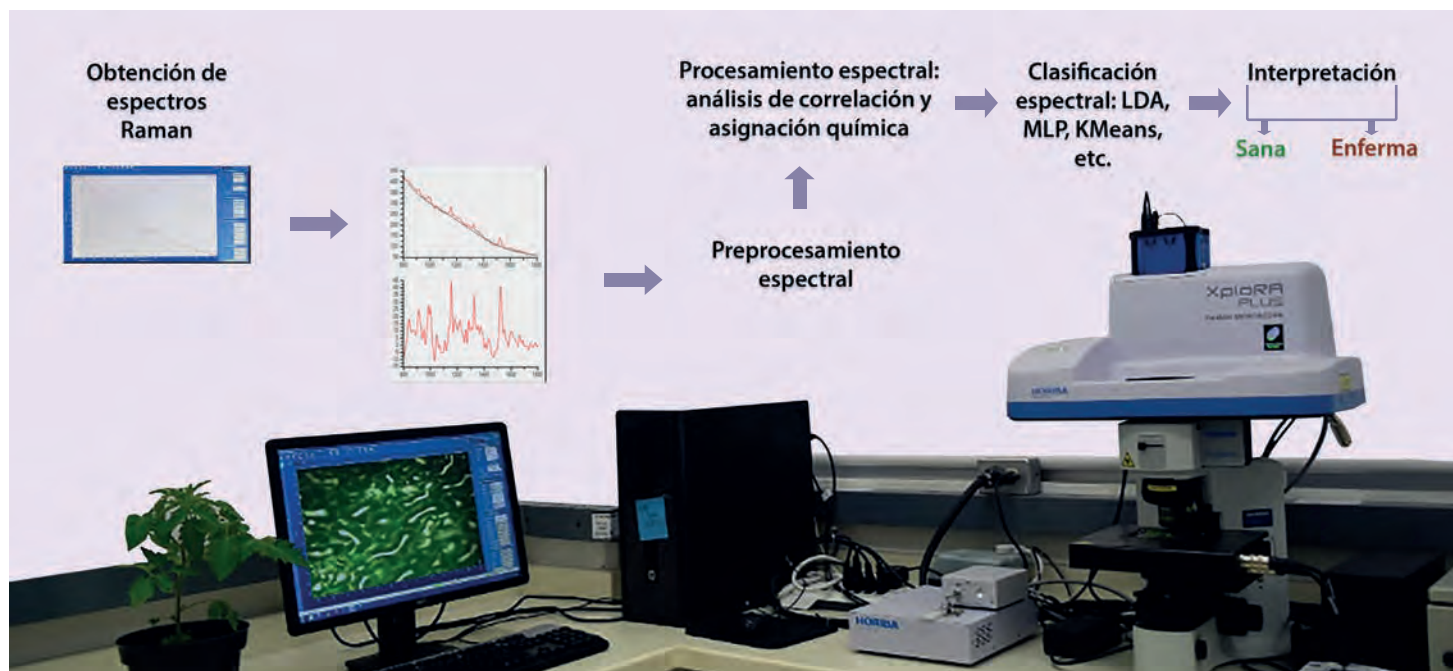


Figura 3. Preparación de muestras vegetales y procesamiento espectros Raman

Es importante mencionar que la ER no sustituye de ninguna forma los procedimientos convencionales para el diagnóstico fitosanitario, pero sí permite reducir los tiempos para la detección temprana e identificación preliminar de microorganismos. Además, la detección temprana de plantas asintomáticas enfermas es una innovación que revolucionará los procedimientos de vigilancia epidemiológica fitosanitaria. Actualmente, los procedimientos de obtención y análisis espectral se han perfeccionado al permitir realizar diagnósticos durante la etapa asintomática de múltiples enfermedades

y en diferentes cultivos, la ER también permite discriminar otros síntomas que son ocasionados por deficiencias nutricionales, salinidad, toxicidad por elementos, entre otros (Payne y Kurouski, 2021). La ER es una tecnología que incrementa la eficiencia en la detección de factores estresantes bióticos y abióticos, permite la aplicación de tratamientos efectivos para incrementar los rendimientos potenciales, además de que reduce los costos de producción y contaminación ambiental. **UP**

Referencias bibliográficas:

- FAO (2017). The Future of Food and Agriculture-Trends and Challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Payne W. Z. y Kurouski D. (2021). Raman-based diagnostics of biotic and abiotic stresses in plants. A review. *Frontiers in Plant Science* 11:616672.
- Vallejo Pérez, M. R., Navarro C. H. R., Sosa Herrera, J. A., Lara Ávila, J. A., Ramírez Tobías, H. M., Díaz-Barriga Martínez, F. et al. (2018). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* assisted by Micro-Raman spectroscopy under laboratory conditions. *The Plant Pathology Journal* 34(5), pp.381-392.
- Vallejo Pérez, M. R., Sosa Herrera, J. A., Navarro Contreras, H. R., Álvarez Preciado, L. G., Rodríguez Vázquez, A. G y Lara Ávila, J. A. (2021). Raman spectroscopy and machine-learning for early detection of bacterial canker of tomato: the asymptomatic disease condition. *Plants* 10, p. 1542
- Weng, S., Hu, X., Wang, J., Tang, L., Li, P., Zheng S. et al. (2021). Advanced application of Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy in plant disease diagnostics: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, pp. 2950-2964.