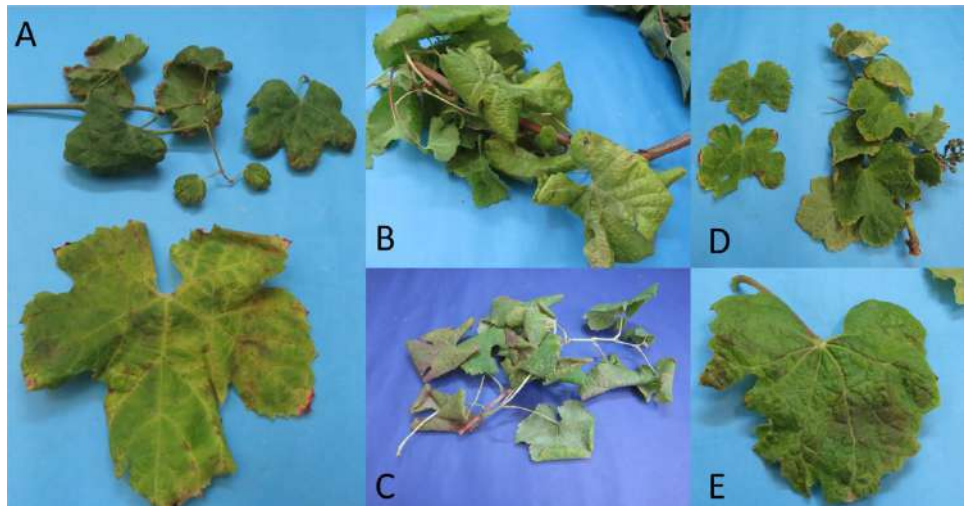




■ PROBLEMA ABORDADO

Actualización sobre la presencia de fitoplasmas en la vid

En diferentes regiones vitivinícolas del mundo, los fitoplasmas causan pérdidas que van del 13 al 100%, dependiendo de la agresividad del patógeno y de la susceptibilidad varietal. El control de fitoplasmas se basa en la prevención de la difusión del mismo. Por lo tanto es importante propagar material vegetal libre de fitoplasmas, controlar los insectos vectores y eliminar las plantas fuentes de inóculo del patógeno, inclusive los hospederos secundarios. Es prioritario identificar los fitoplasmas presentes en los viñedos para optimizar los esfuerzos de gestión de las enfermedades que estos patógenos causan en varios de los países implicados en el proyecto TROPICSAFE. Las informaciones generadas permitirán conocer los insectos vectores a controlar y las plantas huéspedes alternativas que deben eliminarse, con el fin de reducir la presencia del patógeno y de disminuir las aplicaciones de insecticidas.



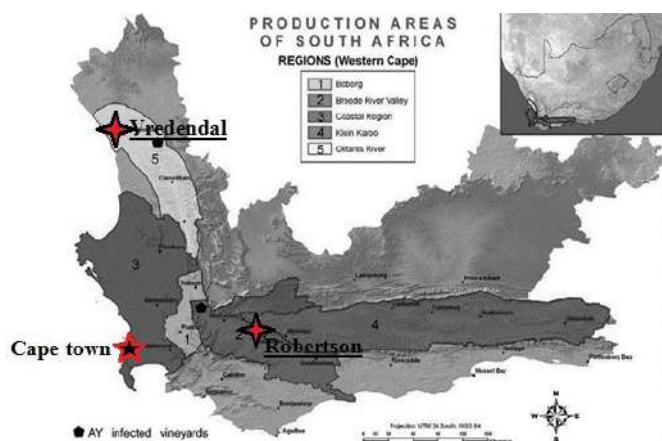
- Síntomas presentes en las hojas de cinco muestras de vid positivas a fitoplasmas en Chile. A) VN17 - variedad Chardonnay con hojas enrolladas hacia el envés y nervaduras amarillas. B) VN12 - variedad País con hojas enrolladas hacia el envés y nervaduras amarillas. C) VN29 - variedad Tintorera con hojas enrolladas hacia el envés y enrojecimientos de las láminas foliares. D) VN69 - variedad Semillón con hojas enrolladas hacia el envés y hojas pequeñas E) VN32 - variedad Sauvignon blanc con hoja deformada y enrollada hacia el envés.

■ RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN MÁS RECIENTES

¿Qué se sabe sobre la identidad de los fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid en Chile, Italia y Sudáfrica?

Los agentes del amarillamiento de la vid generalmente son bastante conocidos en Europa, mientras que hay menos datos e información disponible para otros países, como Chile y Sudáfrica. En Sudáfrica, el fitoplasma presente y su principal insecto vector han sido identificados recientemente (Mapa 1), mientras que en Chile se han identificado diferentes fitoplasmas e insectos vectores (Mapa 2). En la mayoría de los países europeos, los fitoplasmas asociados a la vid son "bois noir" y "flavescence dorée", siendo este último un organismo sujeto a cuarentena (Angelini *et al.*, 2018). Los estudios realizados en Italia han permitido la detección de nuevos fitoplasmas (Mapa 3) y potenciales insectos vectores en algunas de las principales regiones vitícolas (Zambon *et al.*, 2018).

Ante esta situación, es evidente que sólo un control constante permitirá la detección inmediata de fitoplasmas o nuevos fitoplasmas que podrían infectar a la vid. Es necesario, por lo tanto, realizar un seguimiento para determinar si los fitoplasmas considerados como agentes endémicos se están diseminando y en base a esta información, definir y aplicar las medidas de control más adecuadas. Además, el conocimiento de las variantes genéticas de los fitoplasmas responsables del amarillamiento de la vid en los tres países, constituye la base para la mejora de las técnicas de detección.



• Mapa 1. Zonas de Sudáfrica donde se ha identificado la presencia del 'Candidatus Phytoplasma asteris' asociado con el amarillamiento de la vid.



• Mapa 3. Áreas en Italia donde se han detectado nuevos fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid.



• Mapa 2. Regiones de Chile visitadas durante el desarrollo del proyecto TROPICSAFE y ubicaciones de viñedos infectados por fitoplasmas.

■ ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TROPICSAFE

Técnicas de identificación molecular de los fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid

Durante el verano/otoño de 2017 y 2018 se recogieron muestras en viñedos situados en las zonas afectadas de los tres países y se almacenaron a -80°C. La presencia de fitoplasmas se detectó tras la extracción de ácidos nucleicos totales (ANT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación. Los cebadores utilizados para la amplificación de PCR se detallan en la Tabla 1 para los tres países, en la Tabla 2 para Chile y en la Tabla 3 para Italia y Sudáfrica.

En Chile, el estudio se realizó en las regiones de Maule y Valparaíso. Noventa muestras fueron recogidas y analizadas mediante PCR anidado utilizando cebadores diseñados para los genes correspondientes a las subunidades ribosomales *SSU12p* y *LSU36p*, diseñados por el Laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile (Tabla 2). Los amplicones de las cuatro muestras fueron secuenciados. Los resultados se confirmaron utilizando PCR anidada con los cebadores P1/P7, seguidos de R16F2n/2 (Tabla 1). En Italia, los ANT fueron extraídos a través del método de fenol-cloroformo. Se analizaron 103 muestras de vid sintomáticas recogidas en diferentes zonas. Se realizó el PCR con los cebadores P1/P7, y en PCR anidado con los cebadores R16F2n/R2. Se realizaron ensayos PCR anidado adicionales utilizando cebadores R16(I)F1/R1 (Tabla 3). Los fitoplasmas



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.



se identificaron a través de RFLP. También se secuenciaron algunas muestras para confirmar la identidad de los fitoplasmas detectados mediante RFLP virtual y filogenia. En Sudáfrica, el muestreo fue realizado en la variedad blanco Colombard. Se recogieron muestras de plantas asintomáticas (41) y sintomáticas (39), se extrajo ADN desde floema mediante el protocolo CTAB. El ADN extraído fue cuantificado en nanodrop, mostrando los siguientes parámetros cualitativos: 1,73-2,02 (A260/230) y 0,80-1,86 (A260/230). Mientras que las concentraciones oscilaron entre 69 y 352 ng/ μ L. La calidad del ADN fue nuevamente evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa. La identificación del fitoplasma del amarillamiento del áster se realizó mediante ensayo PCR (Tabla 3).

Tabla 1. Iniciadores generales utilizados en la detección de fitoplasmas en viñedos de Chile, Italia y Sudáfrica

Ensayo	Cebadores	Tamaño de amplicón (bp)	Bibliografía
PCR	P1 / P7	1.792	Deng y Hiruki, 1991; Schneider <i>et al.</i> , 1995
PCR anidado 1	R16F2n / R16R2	1.244	Gundersen y Lee 1996
PCR anidado 2	U5/U3	800	Lorenz <i>et al.</i> , 1995

Tabla 2. Iniciadores generales utilizados en la detección de fitoplasmas en viñedos de Chile

Ensayo	Cebadores	Tamaño de amplicón (bp)	Bibliografía
PCR	LSu2pF / LSu2pR	1.700	Zamorano y Fiore, no publicado
PCR anidado	LSu2pFn/LSu2pn	1.280	

Tabla 3. Iniciadores generales utilizados en la detección de fitoplasmas en viñedos de Sudáfrica

Ensayo	Cebadores	Tamaño de amplicón (bp)	Bibliografía
PCR	P1 / P7	1.792	Deng y Hiruki, 1991; Schneider <i>et al.</i> , 1995
PCR anidado 1	R16F2n / R16R2	1.244	Gundersen y Lee 1996
PCR anidado 2	R16(I)F1 / R16(I)R1	1.100	Lee <i>et al.</i> , 1994

■ DATOS CIENTÍFICOS Y PRIMEROS RESULTADOS

Identificación de fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid

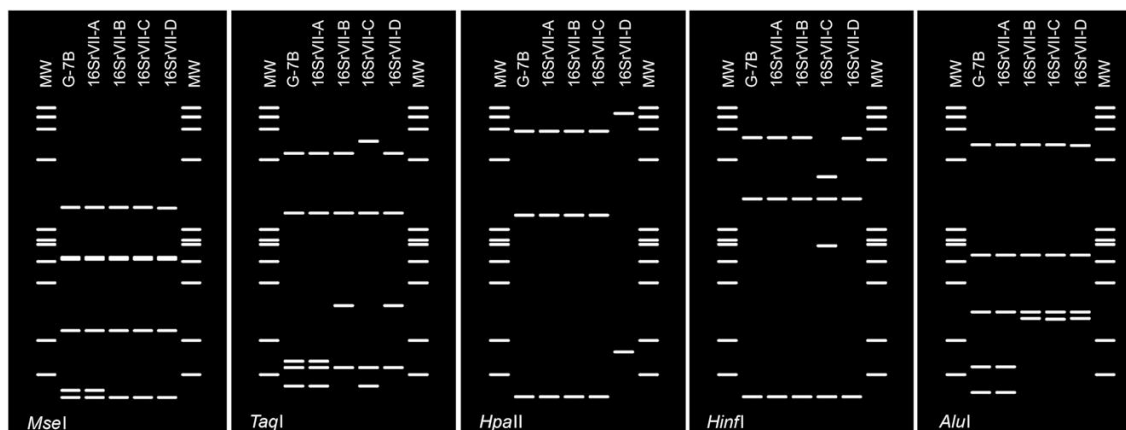
Los estudios realizados en los tres países han confirmado la presencia de varios fitoplasmas. En Chile, las muestras analizadas resultaron infectadas por '*Candidatus Phytoplasma pruni*' – cepa relacionada, clasificada en el subgrupo 16SrIII-J; con '*Ca. P. ulmi*' – cepa relacionada (16SrV-A); '*Ca. P. fraxini*' – cepa relacionada (16SrVII-A); y '*Ca. P. solani*' – cepa relacionada (16SrXII-A). La presencia continua de estos fitoplasmas en los viñedos analizados, muestra que en Chile la situación no experimenta cambios. En Italia, los principales fitoplasmas detectados fueron '*Ca. P. solani*' y '*Ca. P. asteris*' (16SrI-B). Además, se detectaron otros fitoplasmas: '*Ca. P. fraxini*' (16SrVII-A); "flavescence dorée" (16SrV-C y -D); '*Ca. P. trifolii*' (16SrVI); '*Ca. P. phoenicium*' (16SrIX); '*Ca. P. pruni*' (16SrIII) y '*Ca. P. prunorum*' (16SrX-B). También han sido registradas muestras con infección mixta por dos de estos fitoplasmas. La creciente presencia de '*Ca. P. asteris*' requiere de un seguimiento mediante herramientas de detección específicas para reducir su diseminación. En Sudáfrica, la presencia de '*Ca. P. asteris*' - cepas relacionadas (16SrI-B y 16SrI-C) fue confirmada en zonas donde la enfermedad se había detectado por primera vez hace varios años, lo que reafirma la importancia en término de daños de estos fitoplasmas en la vid.



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.



- Análisis RFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción) virtuales de un amplicón obtenido con R16F2n/R2 en *vid* (número de acceso GenBank KY454858) y cepas de referencia, mediante la herramienta online *iPhyClassifier* (Zambon *et al.*, 2018).

PALABRAS CLAVE

PCR anidado, identificación de fitoplasmas, control de fitoplasmas

MÁS INFORMACIÓN

Angelini E., Constable F., Duduk B., Fiore N., Quaglino F., Bertaccini A. 2018. Grapevine phytoplasmas. In: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I. Characterization and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*. Eds. G.P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore, L. Liefting. Capítulo 5. Pag. 123-151. Springer, Singapore.

Smyth N., van der Vyver A., Zambon Y., Contaldo N., Bertaccini A., Burger J. 2015. The genetic variability of AY in South African vineyards and its spatial and temporal distribution in individual vines. *18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*. September 7-11, Ankara, Turkey: 128-129.

Zambon Y., Canel A., Bertaccini A., Contaldo N. 2018. Molecular diversity of phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in North-Eastern Italy. *Phytopathology* 108, 206-214.

CRÉDITOS

Nicola Fiore Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal, Santiago, Chile
nfiore@uchile.cl

Assunta Bertaccini *Alma Mater Studiorum* – Universidad de Bolonia, Departamento de Ciencias Agrícolas y Alimentarias, Bolonia, Italia
assunta.bertaccini@unibo.it

Kerstin Krüger Universidad de Pretoria, Departamento de Zoología y Entomología, Pretoria, Sudáfrica
kkruiger@zoology.up.ac.za

Febrero, 2019