

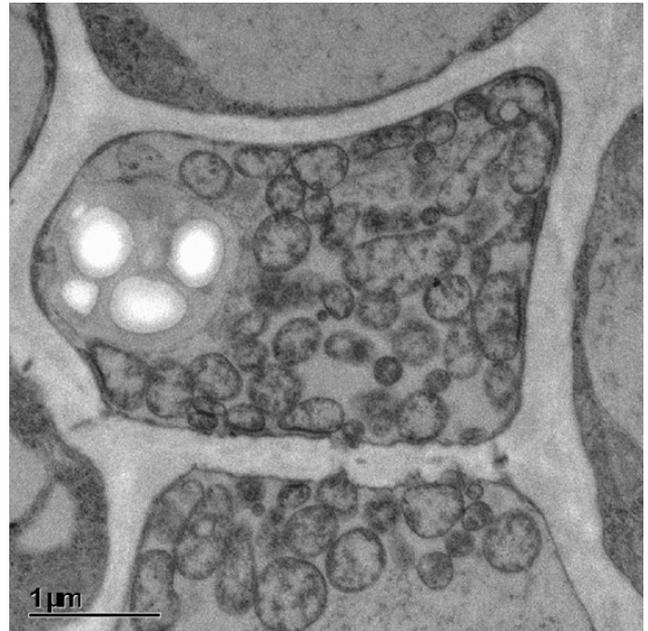


■ PROBLEMA ABORDADO

Ausencia de material de referencia caracterizado y certificado para controles positivos de fitoplasma

El importante sector económico vitivinícola mundial, con una producción de 74 millones de toneladas, está amenazado por varias enfermedades del amarillamiento de la vid (GY) asociadas a la presencia de fitoplasmas. Actualmente existe la necesidad de disponer de material bien caracterizado y certificado, adecuado para su uso como controles positivos de referencia en diferentes sistemas de diagnóstico, pruebas de validación, estudios de rendimiento y test de aptitud; que forman parte de programas de gestión para detección rápida y precisa de fitoplasmas del amarillamiento de la vid.

Se seleccionó como modelo '*Candidatus Phytoplasma solani*' asociado a "bois noir", la enfermedad de la vid más extendida en la cuenca euro-mediterránea. En los últimos 20 años, "bois noir" se ha convertido en el mayor factor limitante para la viticultura en Europa, afectando seriamente a la calidad y cantidad de la producción vitivinícola, con tasas de infección que alcanzan entre un 50% y un 80% en algunas zonas. En Sudáfrica, GY está asociado a la presencia de '*Ca. P. asteris*' mientras que en Chile y otros países está asociado a diversas especies de fitoplasmas. Se necesita recurrir a métodos moleculares para detectar la presencia de '*Ca. P. solani*' o '*Ca. P. asteris*' en bajas concentraciones y en un alto número de muestras, utilizándose comúnmente el método de la PCR cuantitativa, que proporciona un resultado numérico que refleja la concentración del objetivo en la muestra. Sin embargo, estos valores numéricos también dependen de los reactivos específicos, de sus concentraciones y del instrumento empleado. De este modo, los resultados obtenidos en diferentes laboratorios no son directamente comparables. El material de referencia puede ser utilizado como punto de partida en todos los estudios e investigaciones, permitiendo la comparación de resultados entre laboratorios y, lo que es más importante, a lo largo del tiempo. No se dispone de materiales de referencia certificados para patógenos vegetales. Para abordar esta dificultad, hemos elaborado dos tipos de materiales de referencia para fitoplasmas de la vid.



• Imagen de microscopía electrónica en transmisión de sección transversal de la vena principal de *Catharanthus roseus* sintomática infectada con '*Ca. P. solani*' (M. Tušek Žnidarič).

■ PRÁCTICA/INNOVACIÓN PROPUESTA POR TROPICSAFE

Dos nuevos materiales de referencia para fitoplasmas de la vid

Se han preparado dos tipos de material de referencia:

1) secuencias de ADN de la región objetivo utilizadas en PCR cuantitativa, originalmente descrita por Hren *et al.* (2007), junto con datos de nucleótidos disponibles en NCBI, se han empleado para el diseño de ADN sintético (*e.i.* gBlocks, IDT). El diseño de ADN sintético de cadena doble, de tamaño y cantidad conocidos, tiene unos costes



bajos de producción y proporciona altas cantidades de la secuencia específica objetivo apropiadas para su uso en evaluaciones técnicas de tests y como control positivo en pruebas de ensayo;

2) se ha seleccionado ADN previamente recolectado y clasificado de vides naturalmente infectadas por 'Ca. P. solani' y se han diseñado protocolos para su cuantificación mediante PCR digital en gotas, con el fin de asignar valores de referencia a la concentración de secuencias objetivo. Este método permite la cuantificación absoluta sin necesidad de estándares ni de calibración.

■ ¿CÓMO SE ESTÁ IMPLEMENTANDO?

Uso de datos de acceso público de secuencias disponibles y caracterización de material mediante PCR digital en gotas

La preparación de materiales de referencia es un proceso desafiante que requiere de una gran precisión y que es particularmente difícil, exigente y laborioso, ya que el cultivo de fitoplasmas en medio artificial todavía no es un método rutinario. Los dos tipos de materiales de referencia preparados durante el proyecto TROPICSAFE son los requisitos previos para estudios adicionales sobre viñedos infectados, bien por 'Ca. P. solani', bien por 'Ca. P. asteris', que requieran controles positivos de referencia validados. Ambos métodos de preparación de materiales de referencia son fácilmente transferibles a otros fitoplasmas y ADN objetivo. Por otra parte, han sido empleados para asignar valores a materiales de referencia utilizados en tests de aptitud internacionales para diferentes plagas, organizados por el Instituto Nacional de Biología.

El primer material de referencia descrito está basado en secuencias sintéticas de ADN de doble hebra, para el que se han utilizado datos de secuencias de acceso público. Conocer el tamaño y la cantidad de las secuencias permite la preparación de material con una concentración objetivo bastante precisa, sin necesidad de estudios adicionales.

El segundo material de referencia descrito, más similar a las muestras de diagnóstico, está basado en muestras de ADN extraídas de venas foliares de hojas de vid infectadas por 'Ca. P. solani'. Los valores de referencia de las concentraciones de secuencia objetivo han sido asignados tras la caracterización del material mediante PCR digital en gotas, una metodología de referencia para la obtención de cuantificación absoluta.

```
> gBlock control on KT281865.1 Candidatus Phytoplasma solani isolate STOL3 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene, partial cds
ACGTAAAACAGCTTTAAGTTTAATAAAGGCAATTCAAAAGTAAAAGCAGGTTTAGCGATG
GTTGTTTTTCCTGAAGGTGGTATTAAGATCGAATGATGAAGCAACGGTACCACTTTTAG
AGGGGTCTTTTAAAATTGCTTTTAAAACGCAAGCCGA
```

- Secuencia de ADN sintético de control propuesto por el amplicón objetivo de 'Ca. P. solani' por cPCR. Las áreas sombreadas corresponden a las zonas de hibridación de los cebadores y la sonda, reconocidas por los reactivos empleados en la detección del patógeno.



■ ¿CÓMO ESTÁ FUNCIONANDO?

Potencial de los ensayos con controles positivos de referencia y su transferencia a otros fitoplasmas y ADN objetivo

En un material de referencia de ADN sintético, el potencial inconveniente es que se trata de un objetivo específico, por lo que se realiza un test para una secuencia específica. Sin embargo, el disponer de tamaño y cantidad conocidos permiten la preparación de material con una concentración bastante precisa sin necesidad de realizar ensayos adicionales. Una importante ventaja de este material de referencia es que se pueden realizar pedidos comerciales de la secuencia objetivo seleccionada.

Materiales de plantas infectadas de forma natural por 'Ca. P. solani' han sido caracterizados mediante PCR digital en gotas (dgPCR) como un método de mejor calidad en los campos metrológico y clínico, para la cuantificación absoluta de concentraciones objetivo sin necesidad de calibración. Para la preparación del material de referencia, se ha transferido con éxito al formato dgPCR un protocolo de cPCR actual, y se utilizó para determinar la concentración absoluta de las copias de ADN objetivo en las muestras. El protocolo puede utilizarse para asignar valores a muestras infectadas naturalmente o a mezclas producidas artificialmente.

Cualquiera de los dos tipos de material de referencia aquí descritos es válido para este fin. Un material de referencia con una concentración objetivo conocida permite la comparación entre estudios y, lo que es más importante, a lo largo del tiempo, ya que puede prepararse repetidamente con las mismas características. El método descrito es transferible a otros fitoplasmas y ADN objetivo.

	dsADN sintético (gBlock)	Muestras infectadas naturalmente
PROS	<ul style="list-style-type: none"> · Altas cantidades de secuencia de ADN objeto · Concentración objeto bien definida · Comercialmente disponible · Comparable entre estudios 	<ul style="list-style-type: none"> · Similar a las muestras diagnósticas · Más versátil · Puede ser usado en varias pruebas moleculares · Proporciona información sobre la influencia de extracción de ADN
CONTRAS	<ul style="list-style-type: none"> · Secuencia específica · Extracción de ADN no necesaria 	<ul style="list-style-type: none"> · Cantidades y disponibilidad limitadas · Extracción de ADN necesaria

- Características de los dos tipos de material de referencia preparado para 'Ca. P. solani', agente de la enfermedad "bois noir".

PALABRAS CLAVE

Material de referencia, detección, patógeno de plantas, PCR digital en gotas

MÁS INFORMACIÓN

Dreo T., Alič Š., Mehle N., Dermastia M. 2018. Preparation of defined reference material for molecular testing of "bois noir" phytoplasma. Proceedings of the 5th European Bois noir workshop, Ljubljana 2018. <https://www2.cd-cc.si/Skripte/boisn/BOISNOIR2018/papers/a29.pdf>

Dreo T., Pirc M. 2019. Final report on the "NIB Proficiency Test Round 2018-01": proficiency test for the molecular detection of *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). Ljubljana: National Institute of Biology. 20 pp.

Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Realtime PCR detection systems for "flavescence dorée" and "bois noir" phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56, 785-796.

CRÉDITOS

Tanja Dreo tanja.dreo@nib.si Špela Alič spela.alic@nib.si Marina Dermastia marina.dermastia@nib.si

Instituto Nacional de Biología, Departamento de Biotecnología y Biología de Sistemas, Liubliana, Eslovenia

Marzo, 2019



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.