

PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA DETECTAR LOS FITOPLASMAS DEL AMARILLAMIENTO DE LA VID

Establecer métodos de detección para la identificación de los fitoplasmas seleccionados asociados con el amarillamiento de la vid



■ PROBLEMA ABORDADO

Herramientas mejoradas para monitorear el amarillamiento de la vid

El amarillamiento de la vid es una enfermedad grave causada por varios fitoplasmas, y que involucra a insectos vectores y plantas hospedadoras secundarias. El amarillamiento de la vid está muy extendido en diferentes áreas del mundo en las que se cultiva la vid. Dentro del amarillamiento de la vid, se reconocen algunas enfermedades específicas como la flavescencia dorada (FD), el "bois noir" (BN) y el "aster yellows" (AY), cada una considerada como modelo de enfermedad compleja basada en múltiples variables (insectos vectores, planta hospedante de fitoplasmas de interés agronómico, plantas hospedantes secundarias), cada una de las cuales se comporta a menudo de manera diferente en ecosistemas distintos. Hasta la fecha, la detección de fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid se ha basado en un conjunto de técnicas moleculares que se dirigen al genoma del patógeno. Aunque estas técnicas son sólidas y confiables, el esquema de diagnóstico es relativamente costoso y carece de idoneidad para métodos de monitoreo a gran escala. Por lo tanto, en el marco de las actividades de TROPICSAFE se evaluaron las pruebas serológicas con el fin de superar la escasez de la proteína antigénica, evaluar la sensibilidad de la prueba cuando el patógeno está presente en un título bajo y comparar su especificidad con los resultados obtenidos con la identificación molecular del patógeno.



• Plantas infectadas con el amarillamiento de la vid.

■ PRÁCTICA/INNOVACIÓN PROPUESTA POR TROPICSAFE

Generando anticuerpos específicos para detección de fitoplasmas

Para superar la escasez de proteínas antigénicas de los fitoplasmas, TROPICSAFE centró sus actividades en el cultivo de fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid en medio artificial y en el desarrollo de la síntesis de proteínas antigénicas de fitoplasmas asociados a la FD mediante un sistema de expresión bacteriana. Ambas tecnologías permitieron la producción de preparaciones antigénicas adecuadas para producir anticuerpos específicos contra los fitoplasmas. Estos anticuerpos ya están disponibles para diseñar nuevas pruebas serológicas que complementen la detección molecular de fitoplasmas.

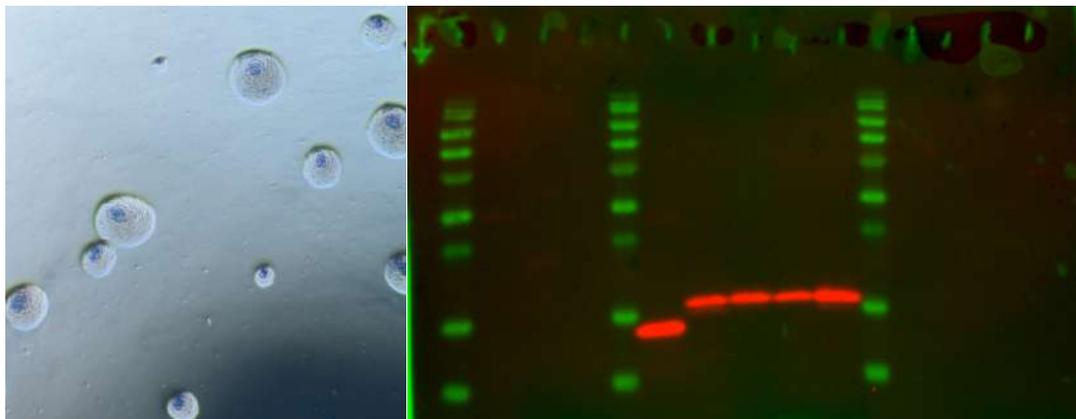
■ ¿CÓMO SE ESTÁ IMPLEMENTANDO?

Desarrollo de pruebas serológicas

Los anticuerpos se evaluaron para aplicaciones serológicas, dando prioridad a las técnicas de bajo coste que se aplican de forma rutinaria en los laboratorios que actualmente realizan análisis para otros tipos de patógenos en muestras de vid.



Los anticuerpos contra el AY de la vid se utilizaron en el ensayo de inmunofluorescencia (IFAS), una técnica que se utiliza para detectar bacterias epífitas con pared celular. También se ha realizado en un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA) para los fitoplasmas asociados a FD. El protocolo fue desafiado por sus resultados de diagnóstico en comparación con la prueba de PCR cuantitativa. Además, la prueba FD-ELISA se evaluó analizando una amplia gama de muestras, incluidas hojas de vid, insectos vectores y especies de plantas hospedadoras secundarias. La evaluación de los resultados de diagnóstico (especificidad y sensibilidad) se abordó mediante una doble verificación basada en muestras identificadas molecularmente.

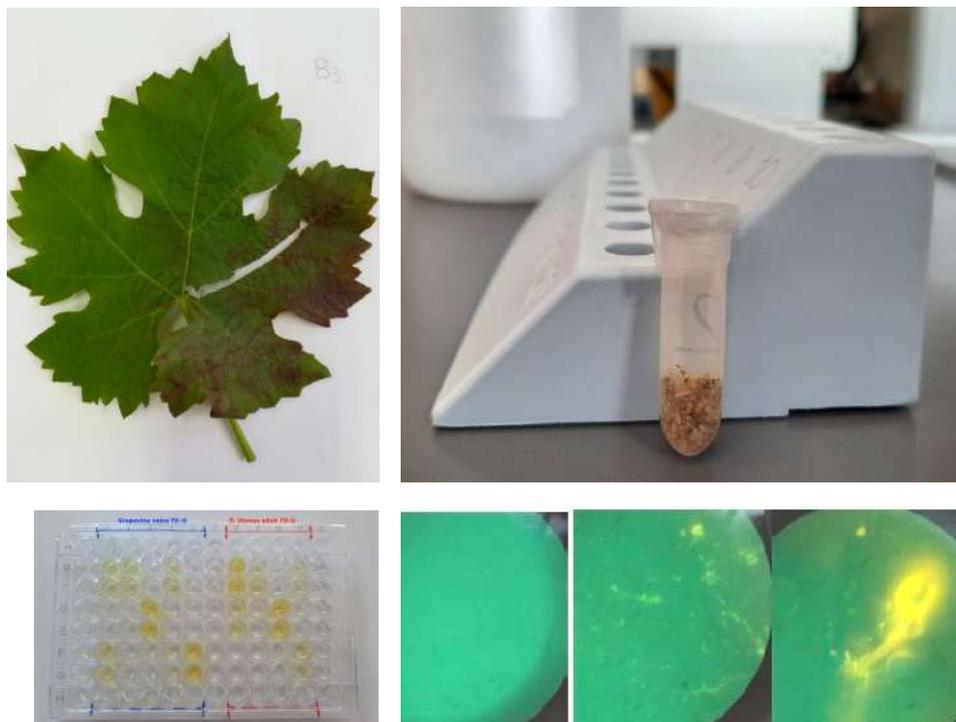


• A la izquierda: colonias de células de AY de vid que crecen en medio sólido, fotografiadas bajo microscopía bifocal a 40X y utilizadas como preparación antigénica. A la derecha: análisis de "Western blotting" de la proteína recombinante IgG anti flavescencia dorada cepa 16SrV-D (Trivellone *et al.*, 2019).

■ ¿CÓMO ESTÁ FUNCIONANDO?

Pruebas de anticuerpos de fitoplasmas asociados al amarillamiento de la vid

La prueba ELISA demostró ser una herramienta fiable para detectar específicamente la presencia de FD en plantas de vid sintomáticas. También funciona para la detección en el vector principal de los fitoplasmas, *Scaphoideus titanus* y en las plantas hospedadoras alternativas *Alnus glutinosa* y *Clematis vitalba*. A lo largo de tres años de muestreo en campo, dos ensayos ELISA en flavescencia dorada, dirigidos a dos cepas distintas, demostraron ser 100% específicos para cada cepa confirmando los resultados a través de qPCR. La exclusión de reacciones cruzadas entre cepas conocidas hace que la prueba sea adecuada para la identificación de cepas en un solo paso. Los valores de especificidad oscilaron entre 80% y 100%, dependiendo de la muestra (planta o insecto), mientras que la evaluación preliminar reveló una sensibilidad diagnóstica que oscilaba entre 58% y 64%. Aunque los valores de sensibilidad parecen ser críticos, esta prueba ELISA podría usarse en los programas de monitoreo como una selección preliminar de grandes poblaciones, para luego corroborar los resultados con métodos moleculares más sensibles como qPCR. La aplicación de este protocolo producirá una reducción de aproximadamente el 50% de los costes en los grandes programas de detección. Además, los anticuerpos contra el AY de la vid se probaron mediante métodos ELISA e IFAS para evaluar su idoneidad para la detección de fitoplasmas en muestras de plantas. Los dos métodos serológicos empleados mostraron una buena especificidad para las colonias de fitoplasmas de AY, mientras que el ensayo IFAS dio resultados prometedores también con tejidos vegetales infectados.



- En la parte superior, de izquierda a derecha: muestras de vid y muestra de *Scaphoideus titanus* adulto para la prueba ELISA de FD. En la parte de abajo, de izquierda a derecha: resultados de ELISA para FD y detección de AY de vid con IFAS en insecto sano, fitoplasma AY de colonia, tejido de insecto infectado con AY (Contaldo *et al.*, 2019).

PALABRAS CLAVE

Producción de antisuero, flavescencia dorada , "aster yellows", detección serológica

MÁS INFORMACIÓN

Regulation (EU) 2019/2072 of 28 November 2019. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj

Filippin L., Trivellone V., Galetto L., Marzachí C., Elicio V., Angelini E. 2019. Development of an anti-Imp serological assay for the detection of "flavescence dorée" phytoplasmas in grapevine, insect vectors and host plants. *Phytopathogenic Mollicutes* 9(1), 75-76.

Contaldo N., Freo I., Elicio V., Lucchese C., Formica L., Bertaccini A. 2019. Preliminary evaluation of the use of an antiserum obtained from phytoplasma culture. *Phytopathogenic Mollicutes* 9(1), 201-202.

Trivellone V., Ripamonti M., Angelini E., Filippin L., Rossi M., Marzachí C., Galetto L. 2019. Evidence suggesting interactions between immunodominant membrane protein Imp of "flavescence dorée" phytoplasma and protein extracts from distantly related insect species. *Journal of Applied Microbiology* 127, 1801-1813.

CRÉDITOS

Lilia Formica Agritest, Valenzano, Italia l.formica@agritest.it

Elisa Angelini CREA Centro de Viticultura y Enología, Conegliano (Treviso), Italia elisa.angelini@crea.gov.it

Nicoletta Contaldo *Alma Mater Studiorum* - Universidad de Bolonia, Departamento de Ciencias Agrícolas y Alimentarias, Bolonia, Italia nicoletta.contaldo2@unibo.it

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

Marzo, 2021