

V REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN



HUELVA
17 a 19 octubre 2023

Centro Cultural JOSÉ LUIS GARCÍA PALACIOS
Salón de Actos de Fundación Caja Rural del Sur.
C\ Alcalde de Mora Claros, 6-8.

UTILIZACIÓN DE GENÓMICA COMPARATIVA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS PROTOCOLOS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE TRES PATOVARES IMPORTANTES DE LA ESPECIE *Xanthomonas arboricola*

Palacio-Bielsa, A.¹; Berruete, I.M.¹; Palomo, J.L.²; Iribarren, J.²; Sastre, S.³; Cuesta-Morrondo, S.^{3,4}; Martín, L.³; Cubero, J.³

¹Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón-Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza) (apalaciob@aragon.es).

²Centro Regional de Diagnóstico (Junta de Castilla y León).

³Centro Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (INIA/CSIC).

⁴Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid.

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (Xap), *X. arboricola* pv. *juglandis* (Xaj) y *X. arboricola* pv. *corylina* (Xaj) son bacterias que ocasionan graves daños en *Prunus* spp., nogal y avellano, respectivamente.

En este trabajo, y mediante análisis de genómica comparativa, se han diseñado protocolos de PCR en tiempo real (qPCR), para Xap, Xac y Xaj, basados en elementos de los genomas identificados como específicos dentro de los tres patovares. Se seleccionaron los genes *virB6* y *htpG*, correspondientes a una proteína de virulencia y una chaperona de respuesta a estrés, respectivamente, en Xap; el efector de virulencia *avrXacE1* y un receptor de quimiotaxis tipo MCP de Xac; y un gen codificante de una enzima celulolítica y un transportador tipo TonB en Xaj. La especificidad de los protocolos se evaluó frente a suspensiones de concentración 10^8 ufc/ml de 76 cepas de 20 especies de *Xanthomonas* patógenas y no patógenas, procedentes de diversos huéspedes y orígenes geográficos, así como frente a extractos de ADN de 13 cepas de la microbiota de los tres huéspedes y a extractos de material vegetal sano de estos. Los niveles de sensibilidad de los protocolos de qPCR se determinaron mediante análisis de extractos de ADN de muestras vegetales cebadas con suspensiones (10^7 - 10^8 ufc/ml) de cepas tipo de Xap, Xaj y Xac aisladas en España.

Para validar los protocolos de qPCR se realizó un ejercicio colaborativo entre distintos laboratorios analizando tres réplicas de cada cepa y valorándose la sensibilidad, inclusividad, exclusividad, especificidad analítica, repetitividad y reproducibilidad, marcados por la EPPO.

Las qPCRs son específicas para Xap con cebadores de *htpG* y *virB6*, para Xac con el efector de virulencia *avrXacE1*, y para Xaj con cebadores basados en el transportador tipo TonB. Los protocolos ofrecen un nivel de sensibilidad de 10^3 - 10^8 ufc/ml, adecuado para su uso rutinario en la detección de estos tres patógenos. Estas metodologías contribuyen a mejorar el diagnóstico de las tres enfermedades referidas con el empleo de estrategias de amplificación que o bien pueden sustituir o complementar a las actuales.

Este trabajo forma parte de los proyectos RTI2018-96018-R-C31 y PID2021-123600OR, financiados por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por "FEDER Una manera de hacer Europa".