

EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE PROTOCOLOS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE '*Candidatus Liberibacter*' spp. EN CÍTRICOS.

Morán, F.; Navarro, I.; Peñalver, J.; Barbé, S.; López, M. M.; Marco-Noales, E.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

'*Candidatus Liberibacter*' spp. agrupa bacterias limitadas al floema de la planta y a la hemolinfa de sus vectores, e incluye patógenos asociados a enfermedades que afectan a cultivos de gran importancia económica, como son los cítricos o plantas hortícolas de las familias solanáceas y apiáceas. Estos patógenos producen diversos síntomas en sus huéspedes, todos ellos relacionados con la reducción en el suministro de nutrientes. La enfermedad conocida como *huanglongbing* (HLB o *greening*) de los cítricos, asociada a '*Ca. Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' y '*Ca. Liberibacter americanus*', supone un grave problema para la citricultura de aquellos países donde está presente y constituye una seria amenaza para toda la cuenca mediterránea, libre hasta el momento de estas bacterias. Estas especies aún no se han podido cultivar, lo que supone una gran dificultad para su estudio. Aunque hay varios protocolos específicos para la detección por PCR en tiempo real de las tres especies causantes de HLB, hay pocos diseñados para la detección universal de '*Ca. Liberibacter*' spp., entre ellos el de Bertolini *et al.* (2014), que figura en el protocolo EPPO (2014). Los protocolos universales tienen la ventaja de que permiten realizar un cribado rápido de las muestras a analizar y las positivas posteriormente deben ser analizadas con protocolos específicos como el descrito por Li *et al.*, (2006), según EPPO (2014).

Entre los años 2014 y 2017 en el Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas (LNR) se analizaron 128 muestras de cítricos mediante la PCR en tiempo real de Bertolini *et al.* (2014). Los análisis dieron resultado negativo en la mayoría de las muestras (122), mientras que solo 6 mostraron una curva de amplificación en ciclos tardíos (Ct: 38-45). El análisis bioinformático de las secuencias amplificadas mostró que ninguna de ellas tenía homología con secuencias de especies de '*Ca. Liberibacter*' depositadas en la base de datos del NCBI. Sin embargo, sí que se encontró homología con secuencias de especies de los géneros *Sphingomonas* y *Rhizobium* y con una bacteria no cultivable (no clasificada). Además de ello, una muestra también amplificó para una PCR de una especie asociada a HLB (Li *et al.*, 2006), tratándose de *Sphingomonas* ssp. Un análisis detallado de las secuencias demostró que existían regiones con una alta afinidad tanto por el cebador directo (CalsppF) como por la sonda (sonda HLBr) diseñados por Bertolini *et al.* (2014) y por Li *et al.* (2006), respectivamente. Aunque se ha encontrado un porcentaje de amplificaciones no deseadas inferior al 1% con la PCR universal (Bertolini *et al.*, 2014), sigue siendo válida para un cribado rápido de muestras para la detección de HLB. Sin embargo, es necesario optimizar la PCR específica para '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (Li *et al.*, 2006) para evitar amplificaciones no deseadas.