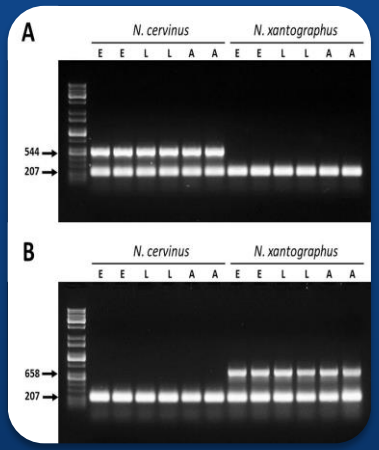
Desarrollo, validación e implementación de un Kit para la identificación de especies del género Naupactus, mediante herramientas moleculares (PCR en tiempo real), para la reducción de rechazos en la industria citrícola exportadora chilena

Dr. Carlos Aguirre D, Laboratorio de Biotecnología INIA la Platina
Dr. Patricio Hinrichsen R, Subdirector I+D INIA La Platina

2012

- JUNIO: Comienza ejecución Proyecto «Identificación molecular de huevos de curculiónidos»
- NOVIEMBRE: Secuencias de ADN disponibles para *N. cervinus* y *N. xanthographus*
- DICIEMBRE: Primeros diseños de partidores de PCR



2013

- MARZO: Sistema de PCR duplex optimizado para discriminar entre ambas especies
- ABRIL-JULIO: Validación de la técnica con muestras ciegas
- JULIO-DICIEMBRE: Preparación de escrito para patente, preparación de escrito científico y transferencia de la técnica al SAG.

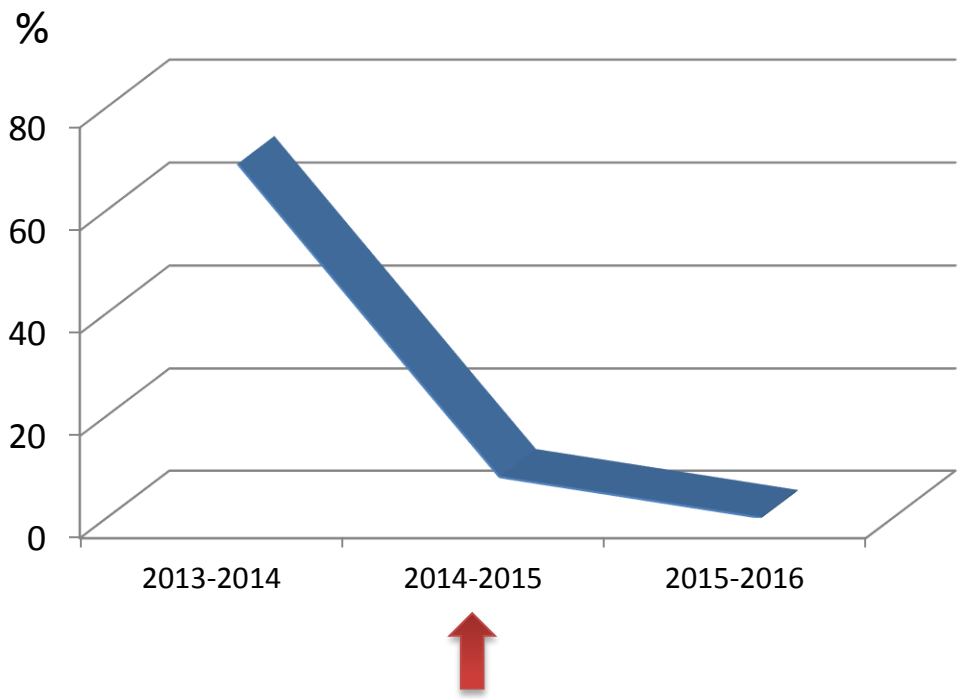
2014

- Solicitud de Patente presentada al INAPI
- Artículo aceptado para publicación en JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY

2015

- USDA aprueba Protocolo de identificación Molecular basado en PCR para la identificación de *N. cervinus* y *N. xantographus*

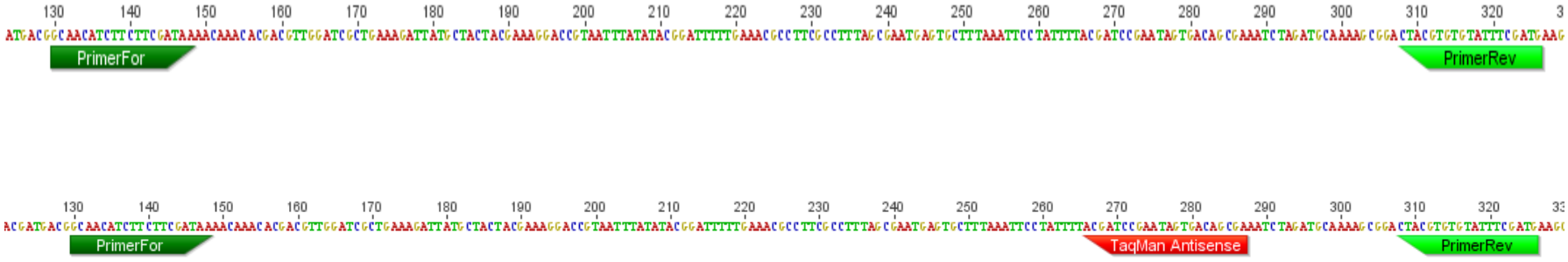
Rechazos USDA por presencia de huevos



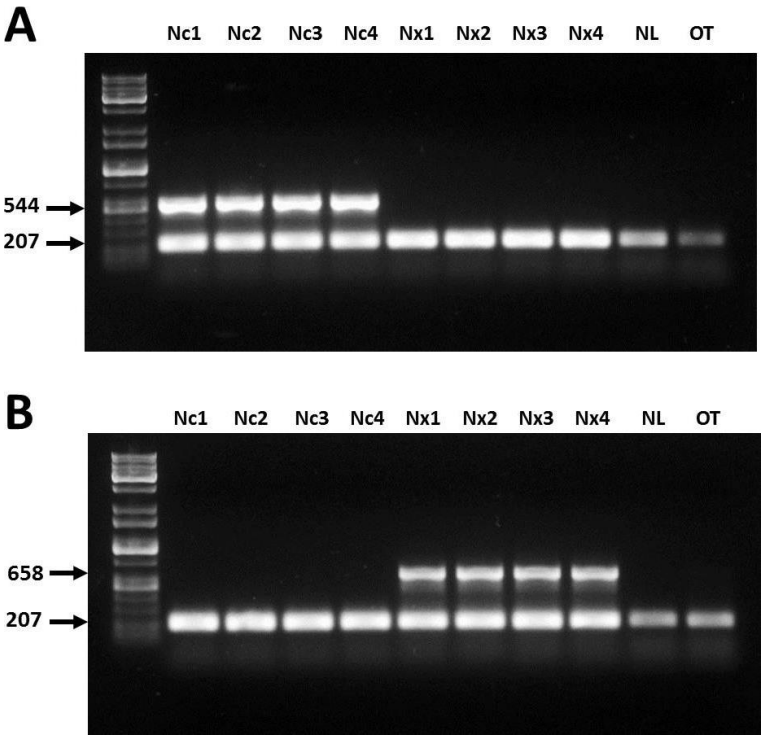
PCR en Tiempo Real

Diferencias técnicas

	PCR convencional	PCR en Tiempo Real
Especificidad	Se basa en la especificidad de un par de partidores de PCR, secuencias cortas de ADN que reconocen una región específica en el ADN blanco.	Adicionalmente al par de partidores específicos, utiliza una sonda TaqMan que reconoce una región ubicada entre el sitio de unión de ambos partidores.

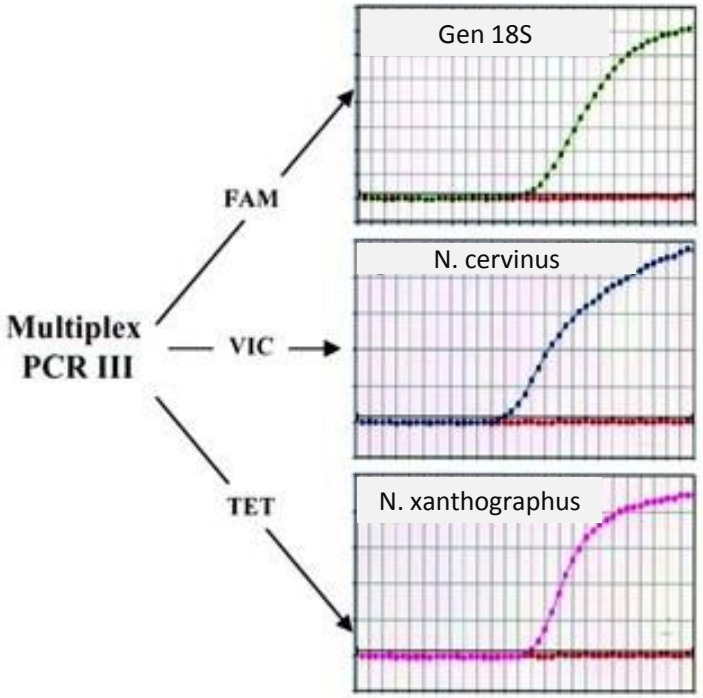


PCR convencional



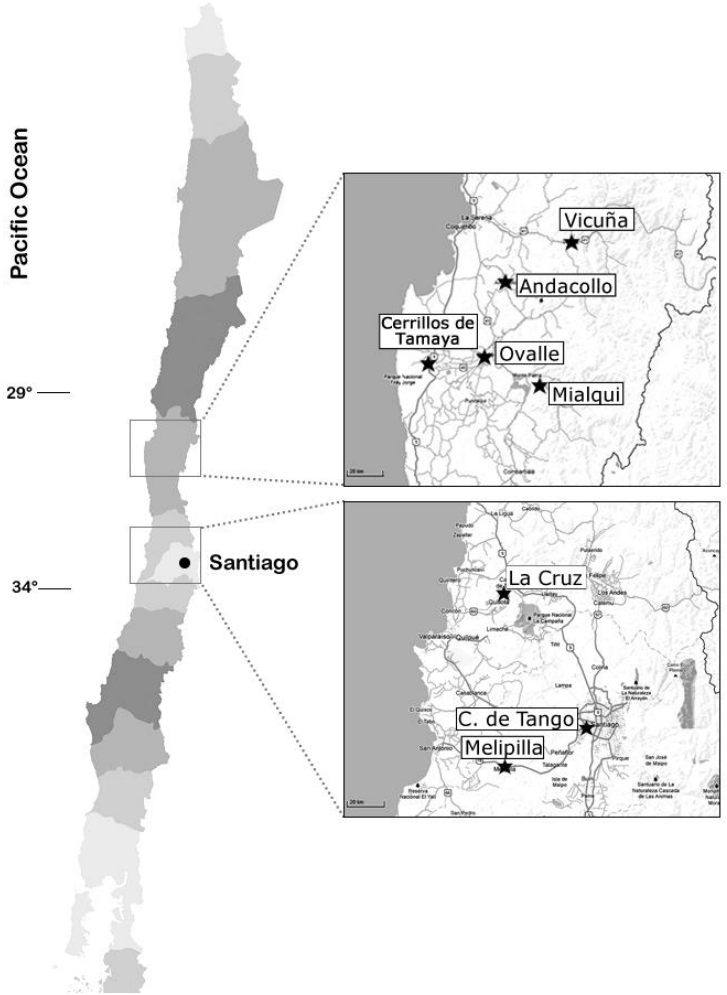
- **Requiere ver los productos de amplificación en geles de agarosa, una vez finalizada la reacción (2 hr aprox)**
- **Requiere el uso de material adicional (cámara de electroforesis y tinción)**

Real Time PCR



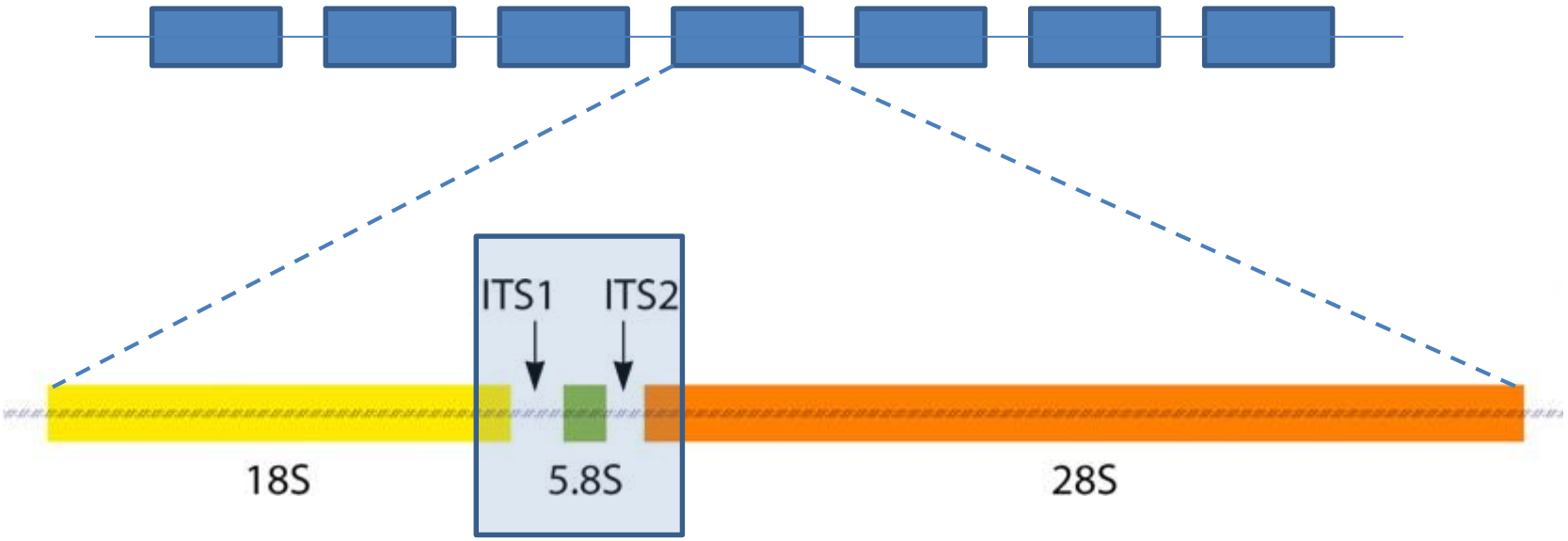
- **La aparición de producto se monitorea en tiempo real y la reacción tarda 40 min (equipo Fast).**
- **Implementar una reacción de tipo multiplex sólo requiere el equipo adecuado (el SAG cuenta con ellos)**

Metodología empleada



- Recolección de muestras
- Identificación morfológica
- Obtención de líneas puras en laboratorio
- Secuenciación de ADN de muestras seleccionadas
- Diseño de partidores de PCR especie-específicos

1. Selección de secuencias blanco

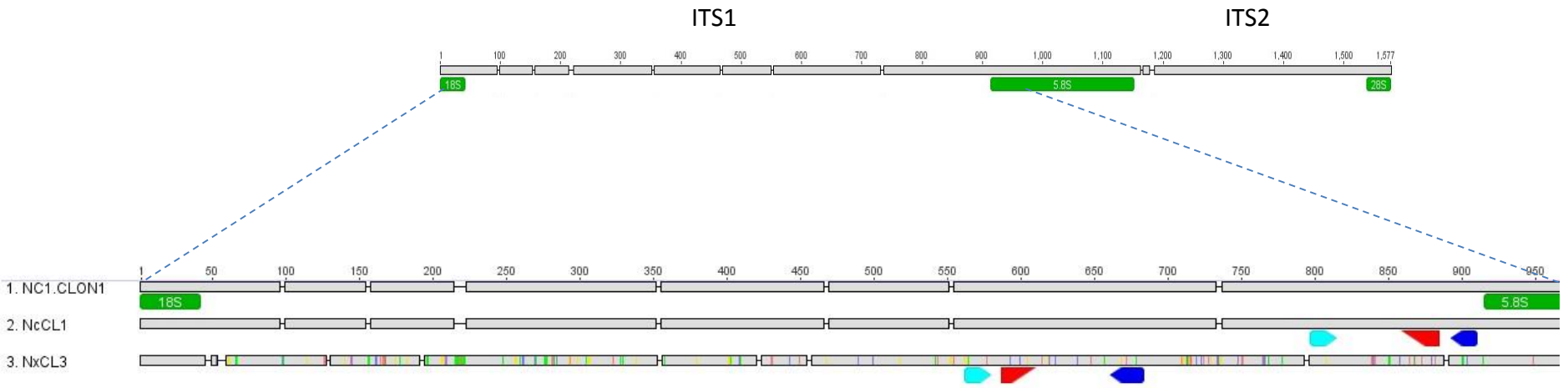


N. cervinus

N. xanthographus

```
GA-AAAATAACCTACACGTTAGACCGCTAAAAGATTATAAGCGACTACGAAAAGCTCGTAA-------ACGGA
GA-AAAATAACCTACACGTTAGACCGCTAAAAGATTATAAGCGACTACGAAAAGCTCGTAA-------ACGGA
GA-AAAATAACCTACACGTTAGACCGCTAAAAGATTATAAGCGACTACGAAAAGCTCGTAA-------ACGGA
GATAAAACAAACACGACGTTGGATCGCTGAAAGATTAT--GCTACTACGAAAGGACCGTAATTTATATACGGA
GAAAAAACAAACACGACGTTGGATCGCTGAAAGATTAT--GCTACTACGAAAGGACCGTAATTTATATACGGA
GATAAAACAAACACGACGTTGGATCGCTGAAAGATTAT--GCTACTACGAAAGGACCGTAATTTATATACGGA
```

2. Diseño de partidores de PCR y sondas especie-específicas



Resultados

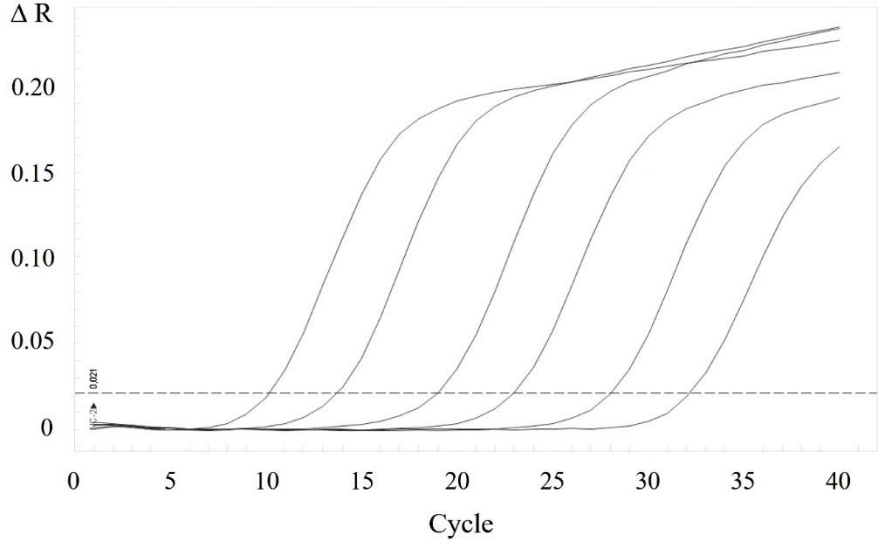
Diferencias técnicas

PCR convencional	PCR en Tiempo Real
• Dos reacciones de tipo duplex • 4 partidores por reacción	• Una reacción de tipo múltiplex • 6 partidores y 3 sondas por reacción

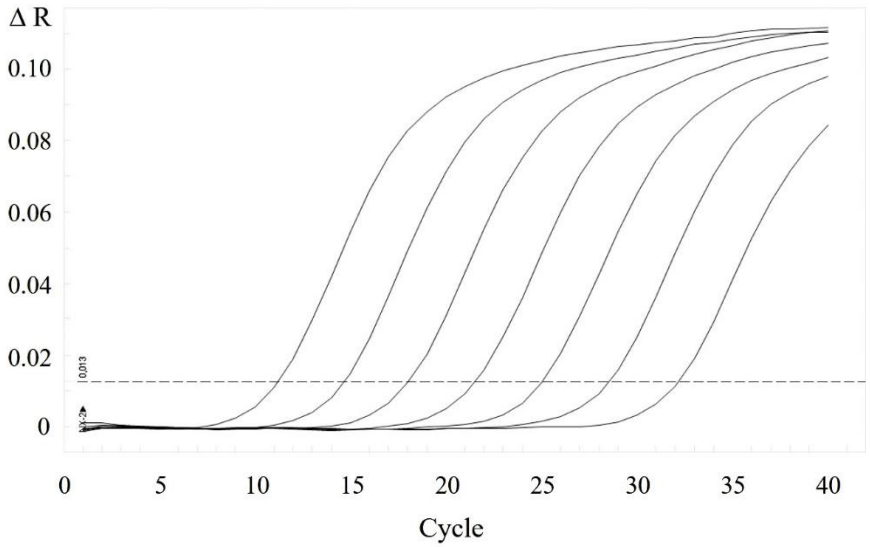
1. Sensibilidad de la técnica

Se ensayaron 7 diluciones seriadas 1/10 de las secuencias blanco purificadas

$2x10^{-2}$ pg to $2x10^{-2}$ fg



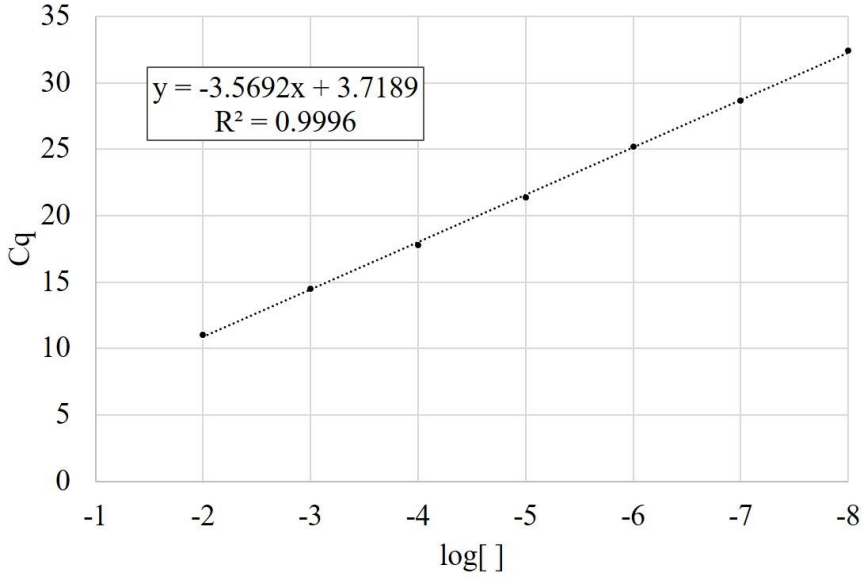
N. cervinus



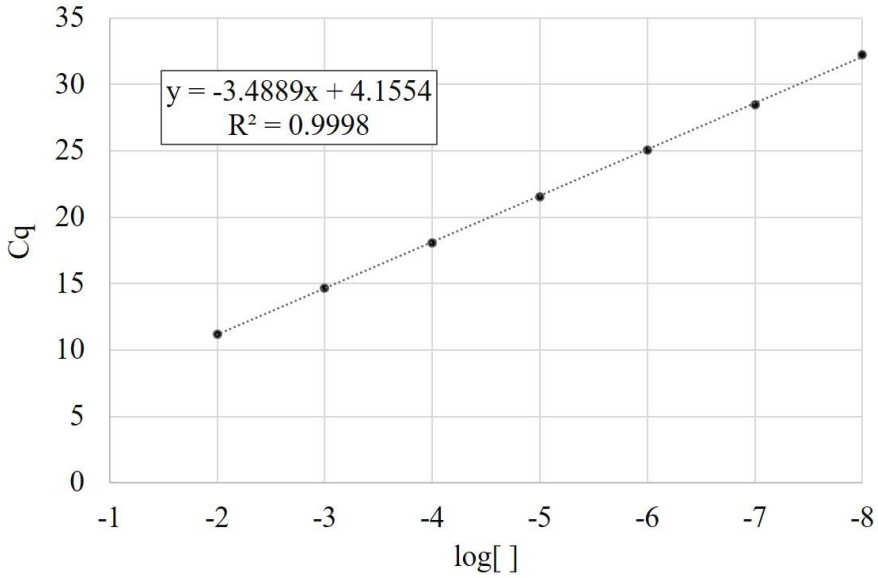
N. xanthographus

2. Eficiencia de la técnica

Se graficó el ciclo correspondiente al Cq vs Log []



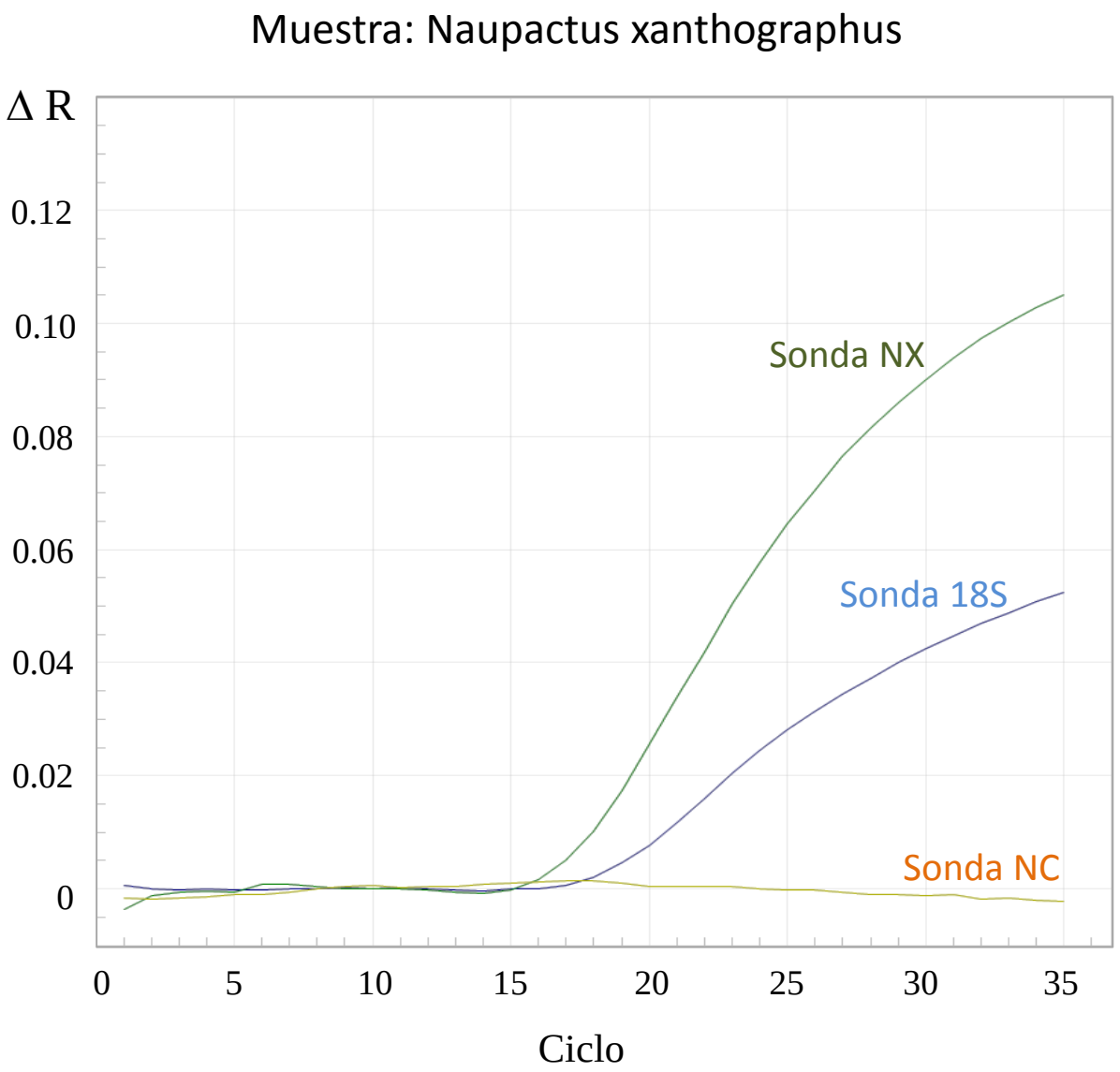
N. cervinus



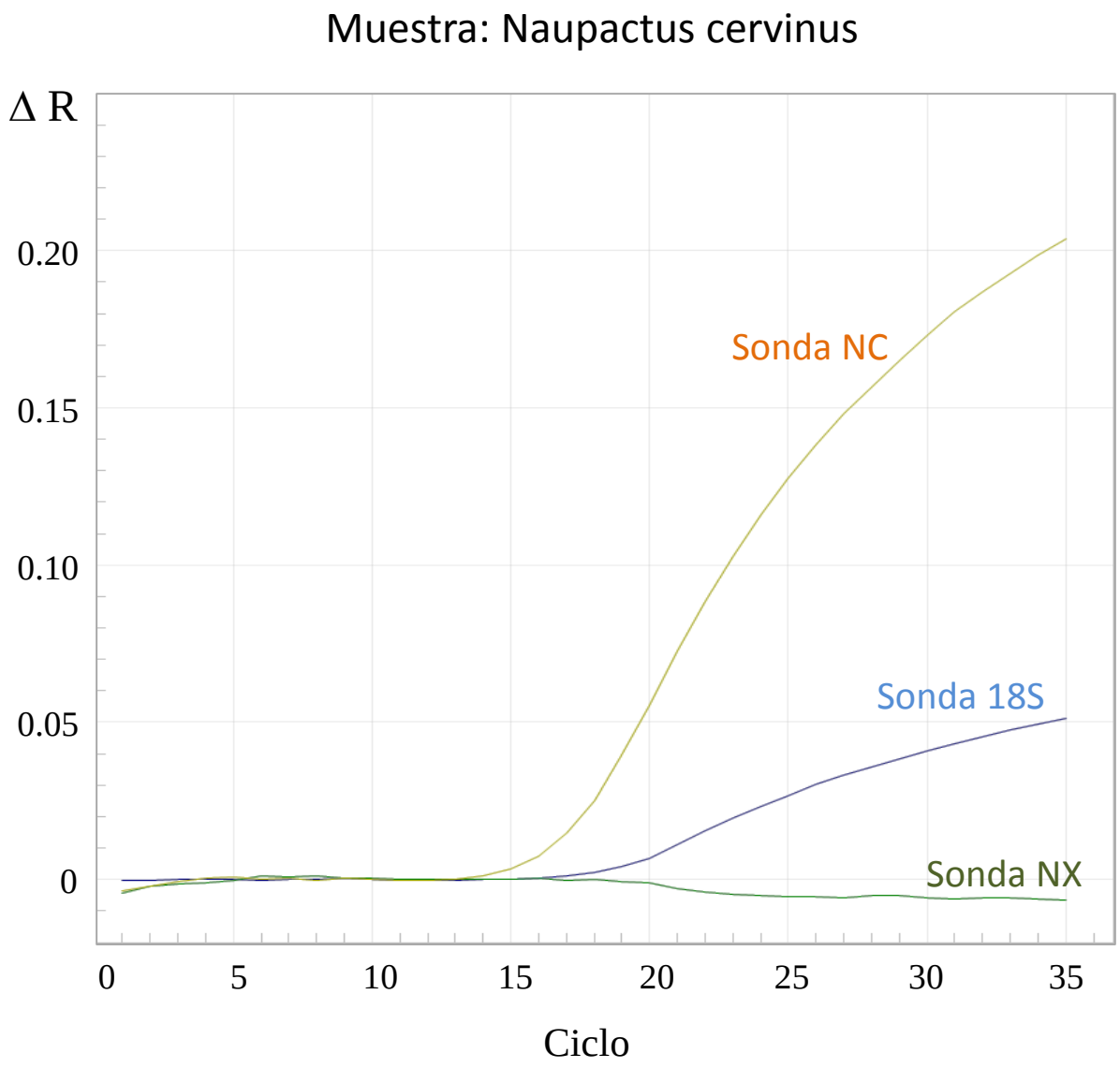
N. xanthographus

Eficiencia: > 90%
Correlación (r^2) 0,9996 y 0,9998
Rango dinámico: 160 – 160x10^6 moléculas blanco

3. Ensayo de especificidad



3. Ensayo de especificidad



4. Validación con muestras de campo y crianza

Muestra	N° de muestras	N. cervinus	N. xanthographus	Otra especie (*)
Huevos	291	128	163	0
Larvas	135	89	38	8
Adultos	2	1	1	0
Total	428	218	202	8

(*): *Aegorhinus superciliosus* y *Othiorhynchus sulcatus*

Se observó un 100% de coincidencia entre el análisis morfológico y la técnica molecular, sin falsos positivos ni falsos negativos.

5. Transferencia de la técnica

- Se visitaron los sitios de inspección del SAG de Teno y Aeropuerto, además del laboratorio de Lo Aguirre.
- Se verificó en terreno los equipos existentes para Real Time PCR y se realizaron ensayos del kit en cada uno de estos lugares.

6. Publicación de resultados

El borrador del escrito se encuentra en revisión para ser enviado a la revista **Journal of Applied Entomology**

Comité de Cítricos Chile

ASOEX
ASOCIACIÓN DE EXPORTADORES DE FRUTAS DE CHILE A.G.

INIA

Muchas gracias