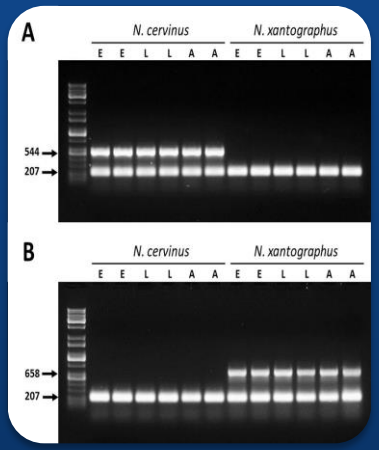
Desarrollo, validación e implementación de un Kit para la identificación de especies del género Naupactus, mediante herramientas moleculares (PCR en tiempo real), para la reducción de rechazos en la industria citrícola exportadora chilena

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.

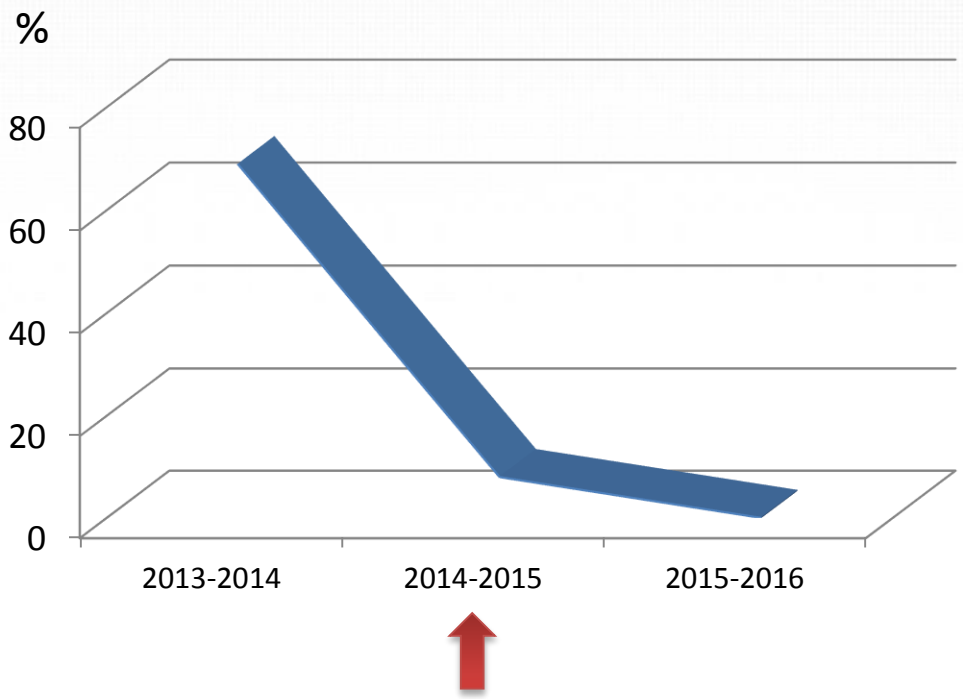
2014

- 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*

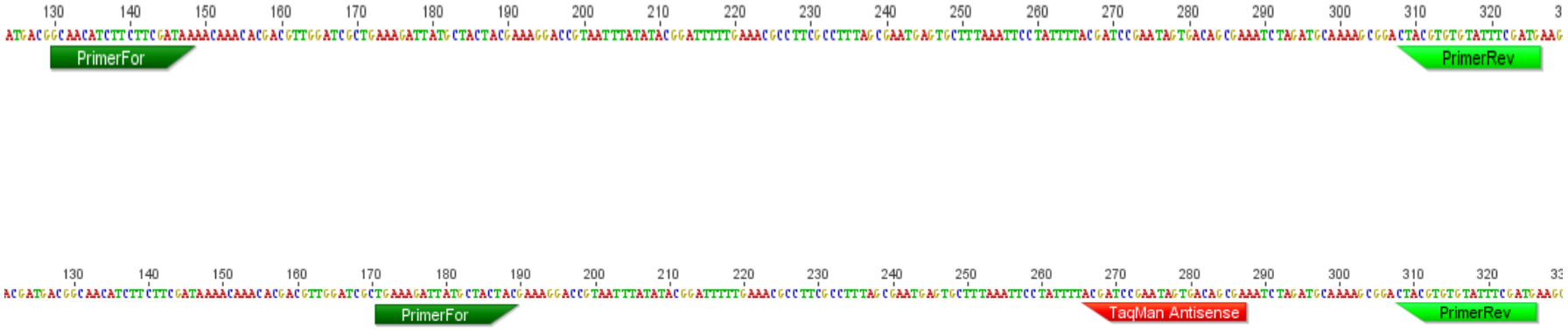
Rechazos USDA por presencia de huevos



Se implementa sistema de detección por PCR

PCR en Tiempo Real

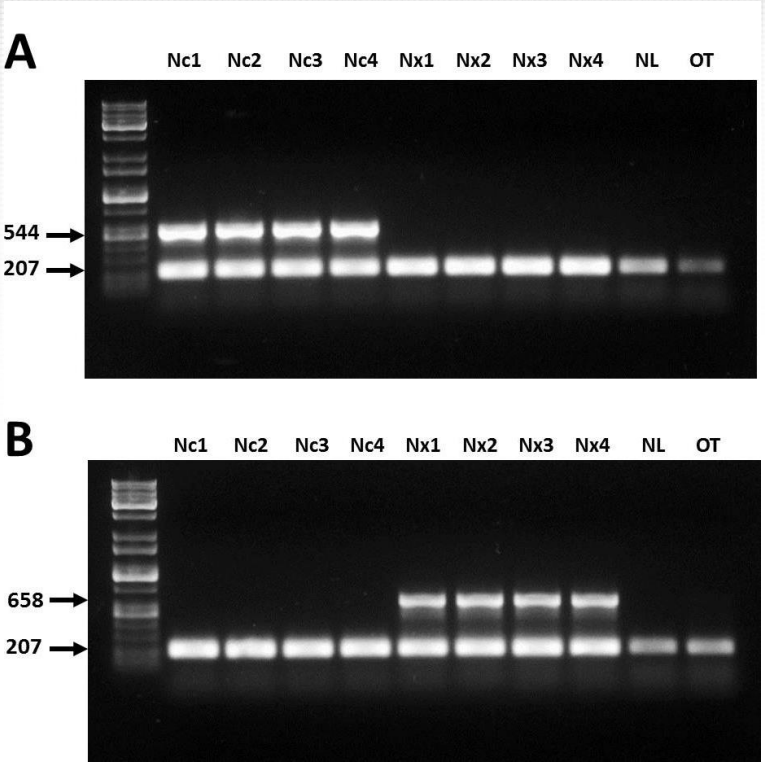
	PCR convencional	PCR en Tiempo Real
Especificidad	Se basa en la especificidad de un par de partidores de PCR, secuencias cortas de ADN que reconocen una región específica en el ADN blanco.	Adicionalmente al par de partidores específicos, utiliza una sonda TaqMan que reconoce una región ubicada entre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



Otras diferencias

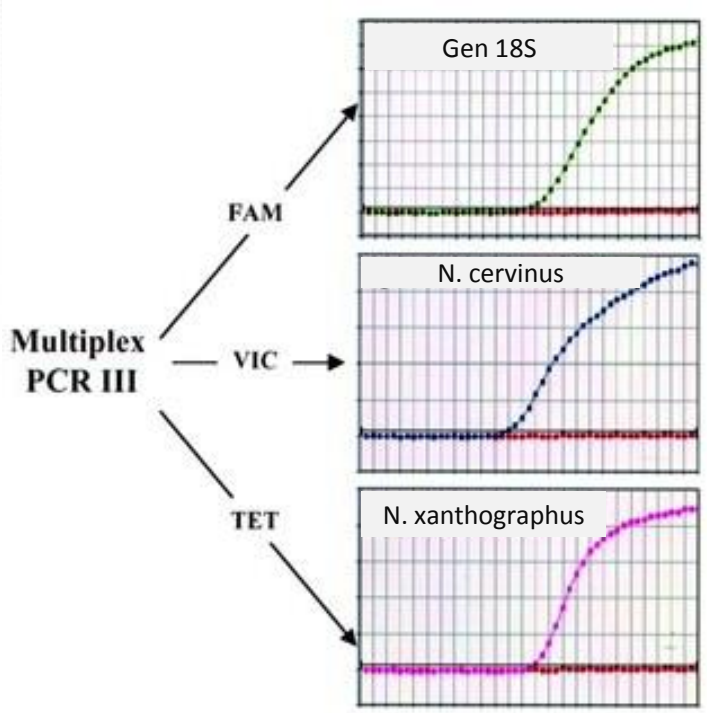
Sensibilidad	**PCR convencional**	**<**	**PCR en Tiempo Real**
Rango dinámico	**PCR convencional**	**<**	**PCR en Tiempo Real**
Tiempos	**PCR convencional**	**>**	**PCR en Tiempo Real**

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)**

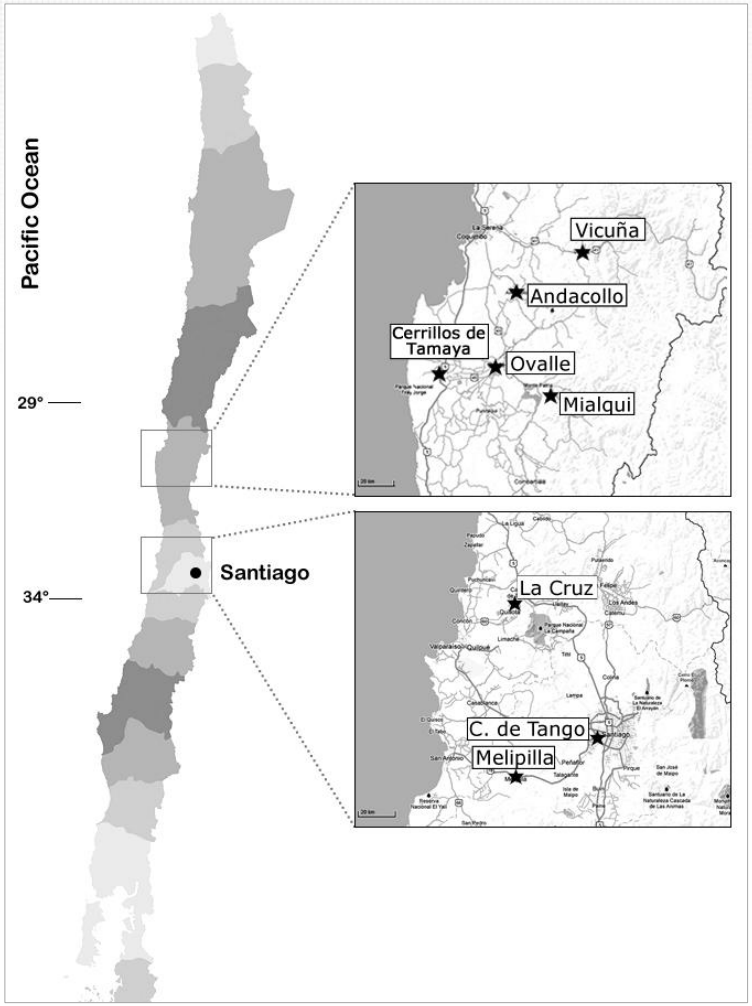
Real Time PCR



- **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

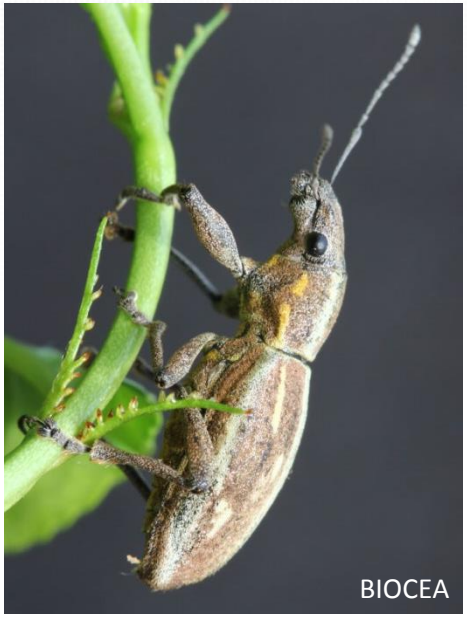
1. Muestras biológicas

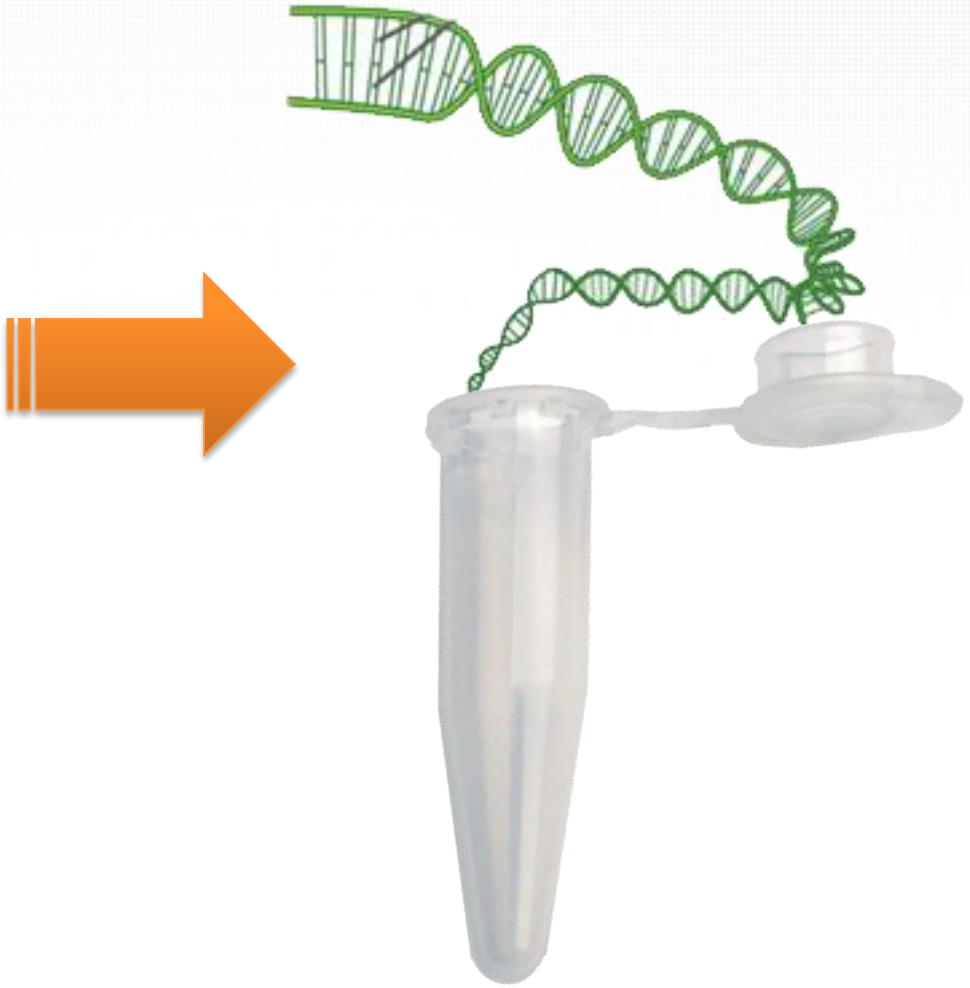


- Recolección de muestras
- Identificación morfológica
- Obtención de líneas puras en laboratorio

Metodología

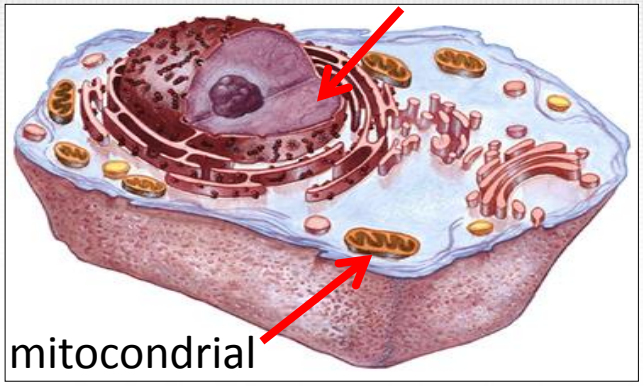
2. Extracción de ADN

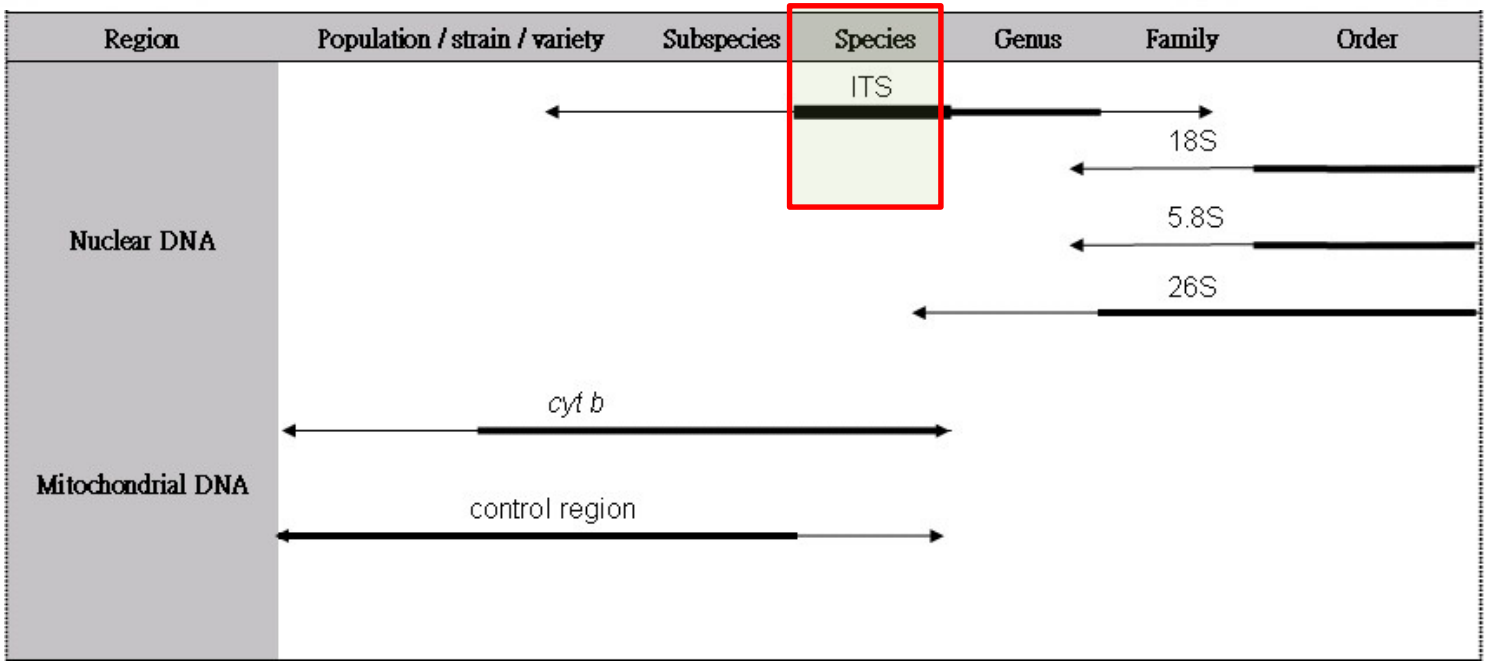




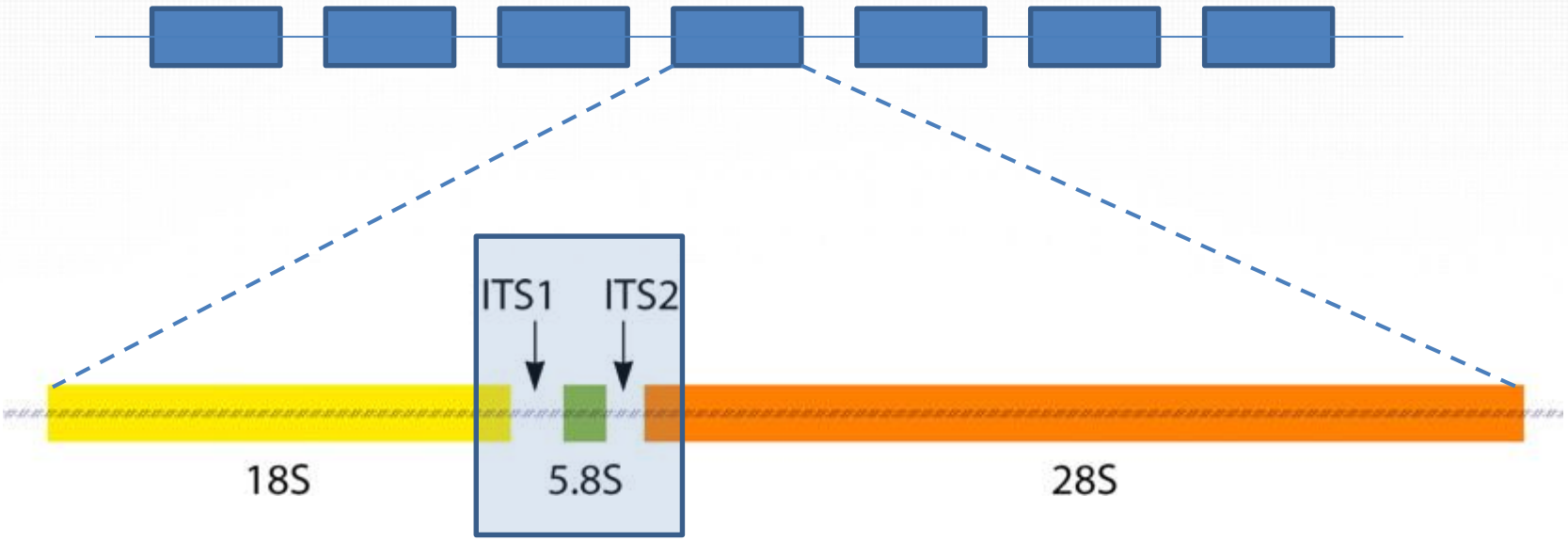
Metodología

3. Selección de región del ADN





4. Amplificación del ADN y secuenciación



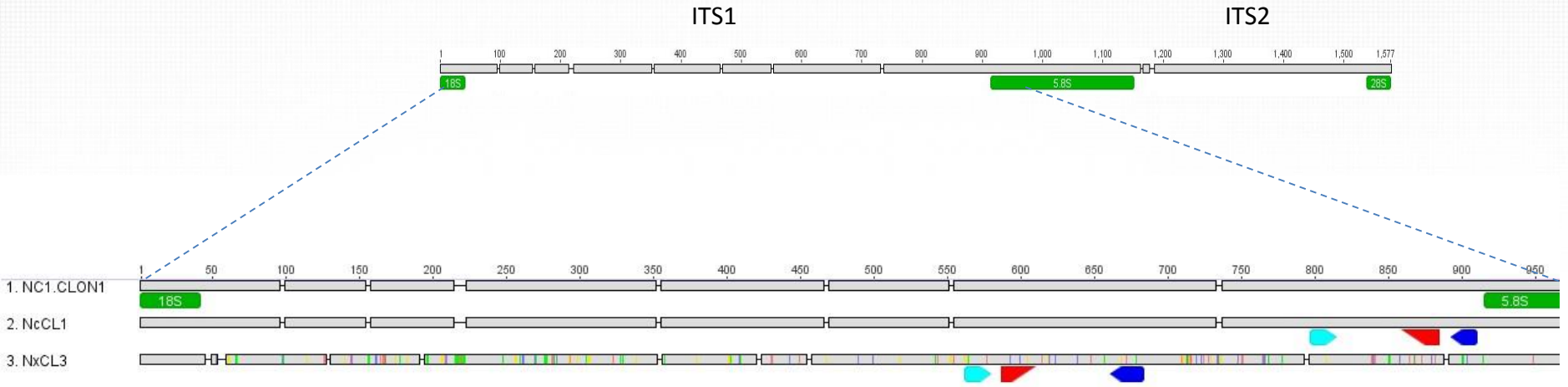
N. cervinus

N. xanthographus

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

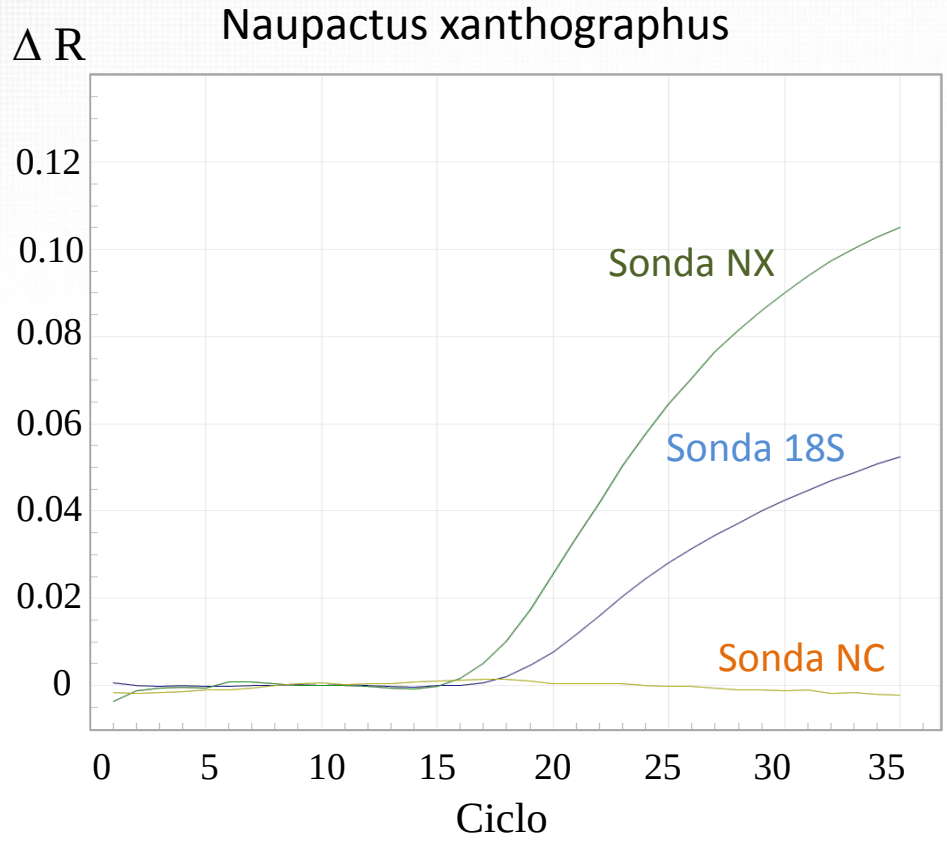
Metodología

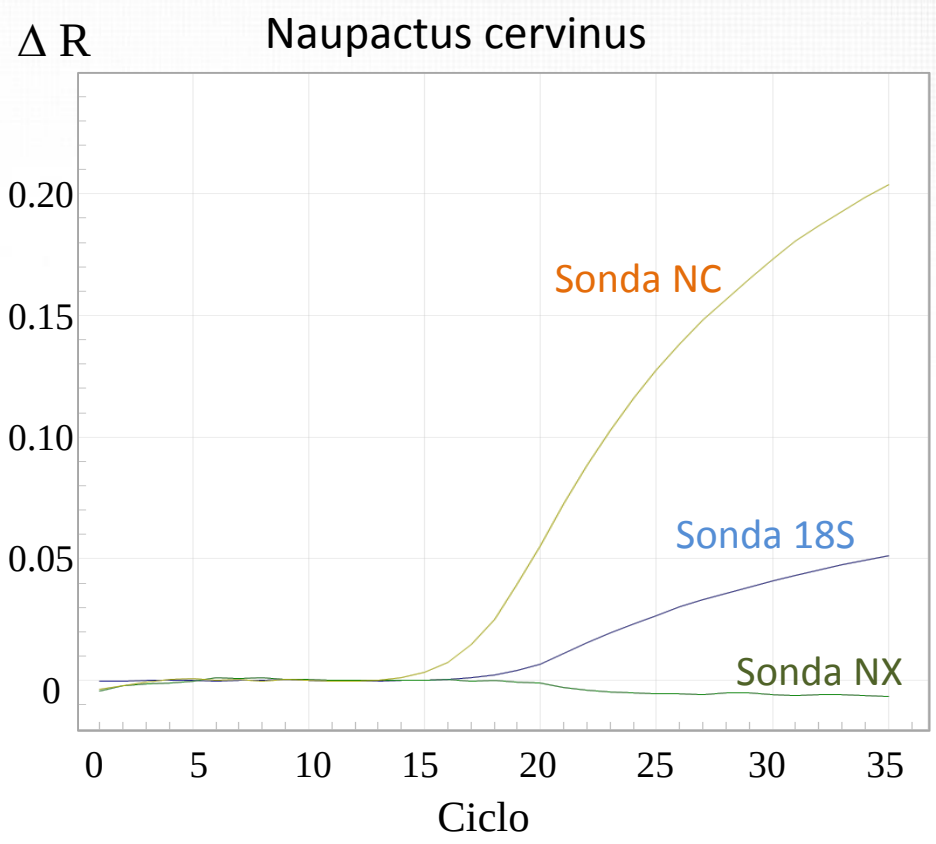
5. Diseño de partidores y sondas especie-específicos



Resultados

1. Ensayo de especificidad

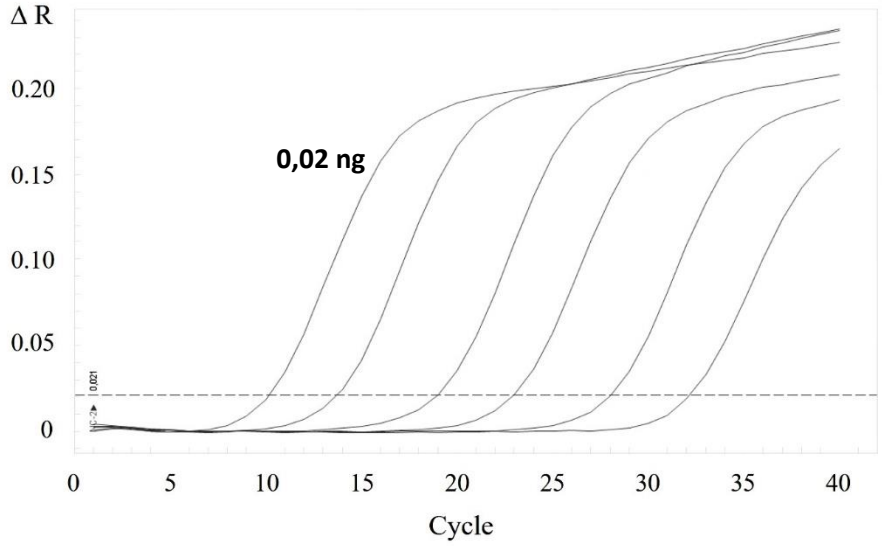




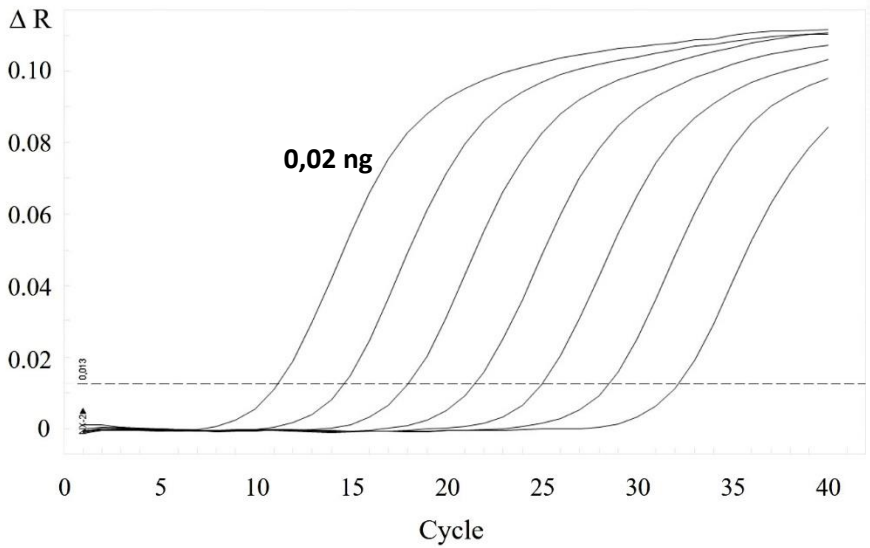
Resultados

2. Ensayo de sensibilidad y eficiencia

Se ensayaron 7 diluciones seriadas 1/10 de las secuencias blanco purificadas, a partir de 0,02 ng



N. cervinus

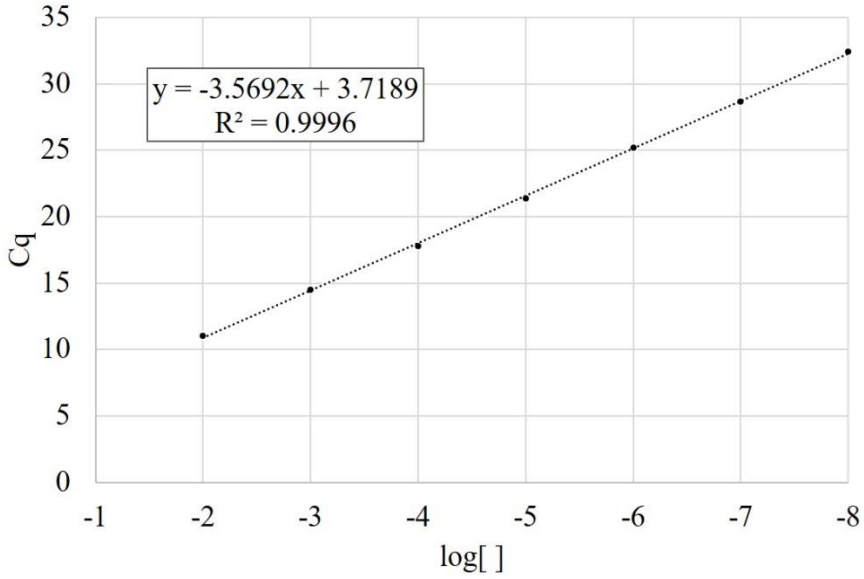


N. xanthographus

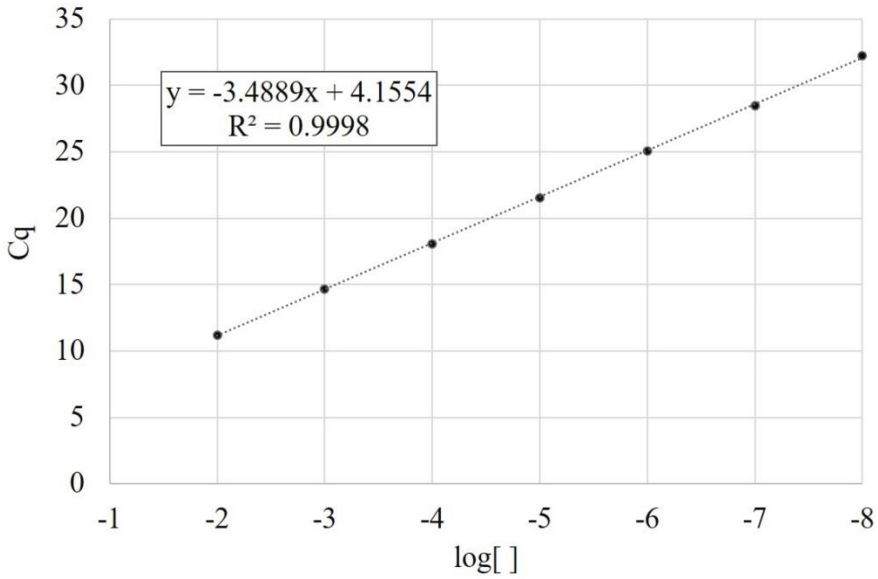
Resultados

2. Ensayo de sensibilidad y eficiencia

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

Resultados

3. Validación con ‘muestras ciegas’

Tipo de muestra	N° de muestras	N. cervinus	N. xanthographus
Huevos	209	70	139
Larvas	127	89	38
Adultos	1	0	1
Total	337	159	178

4. Visitas a sitios de inspección SAG

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

Comité de Cítricos Chile

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

Ministerio de Agricultura
Gobierno de Chile

FIA
Fundación para la Innovación Agraria

INIA

Muchas gracias