# Sistemas de identificación de plagas cuarentenarias importantes para la industria chilena de cítricos

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

## Situación en el año 2012

*Naupactus cervinus* -> Plaga cuarentenaria para Corea

*Naupactus xanthographus* -> Plaga cuarentenaria para USA y Japón

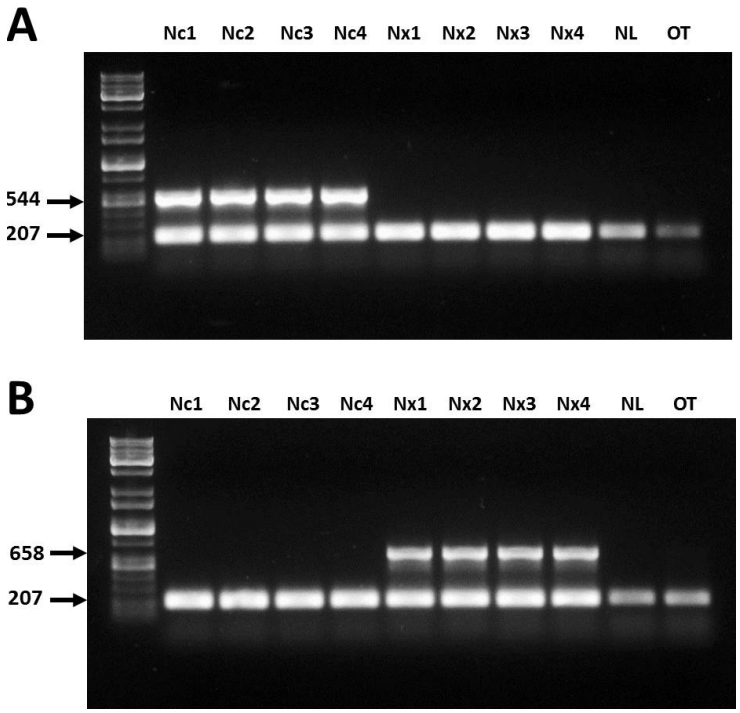
**Problema**

~ 70% de rechazos USDA por presencia de huevos de curculiónidos que no podían ser identificados

Se inicia Proyecto para Identificación Molecular de Curculiónidos

# Resultados del Proyecto

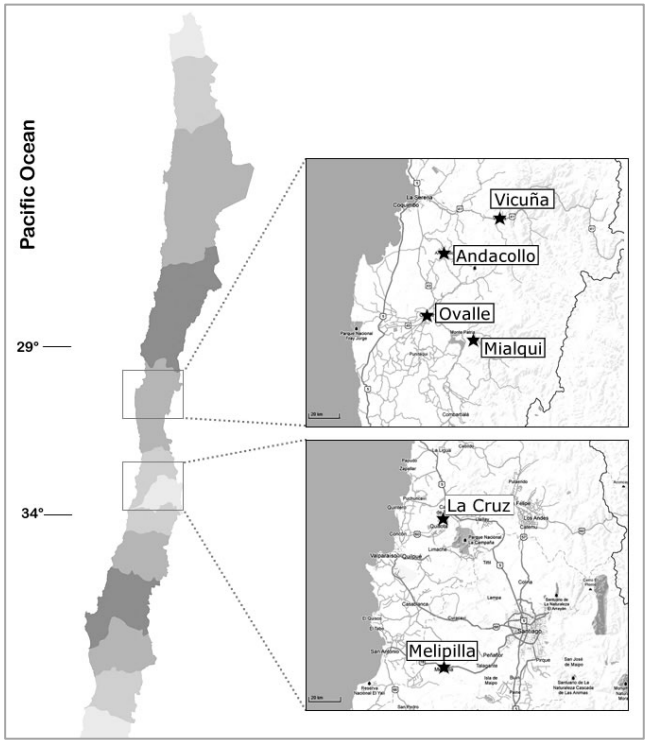
A: Reacción para detectar *N. cervinus*
B: Reacción para detectar *N. xhantographus*




**Sistema de PCR dúplex especie-específico**

- Se pueden identificar ambas especies de forma específica
- La reacción incluye un control interno para chequear la calidad del DNA y del PCR
- No hay reacción cruzada entre las 2 especies
- No hay reacción cruzada con otras especies relacionadas (*N. laucoloma* y *Othiorhynchus* sp.)

# Validación de la técnica de PCR dúplex convencional

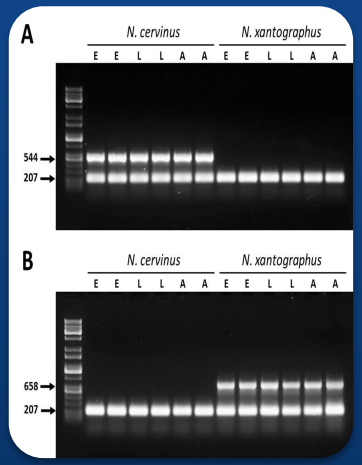



| Specie | Locality | Host | Samples |
|---|---|---|---|
| *N. cervinus* | Calera de Tango | Rosa sp. | 1 |
| *N. cervinus* | La Cruz | Rosa sp. | 5 |
| *N. cervinus* | La Cruz | Ligustrum sinense | 74 |
| *N. cervinus* | La Cruz | Rosa sp. | 4 |
| *N. xanthographus* | Calera de Tango | Rosa sp. | 6 |
| *N. xanthographus* | La Cruz | Rosa sp. | 2 |
| *N. xanthographus* | La Cruz | Vitis sp. | 11 |
| *N. xanthographus* | La Cruz | Ligustrum sinense | 1 |
| *N. xanthographus* | Melipilla | Citrus sinensis | 7 |
| *Othiorhynchus* sp | Calera de Tango | Rosa sp. | 1 |
| *N. leucoloma* | Calera de Tango | Rosa sp. | 1 |

- Se analizaron 113 ‘’muestras ciegas’’
- Resultado: 100% de efectividad

## 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 artículo 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

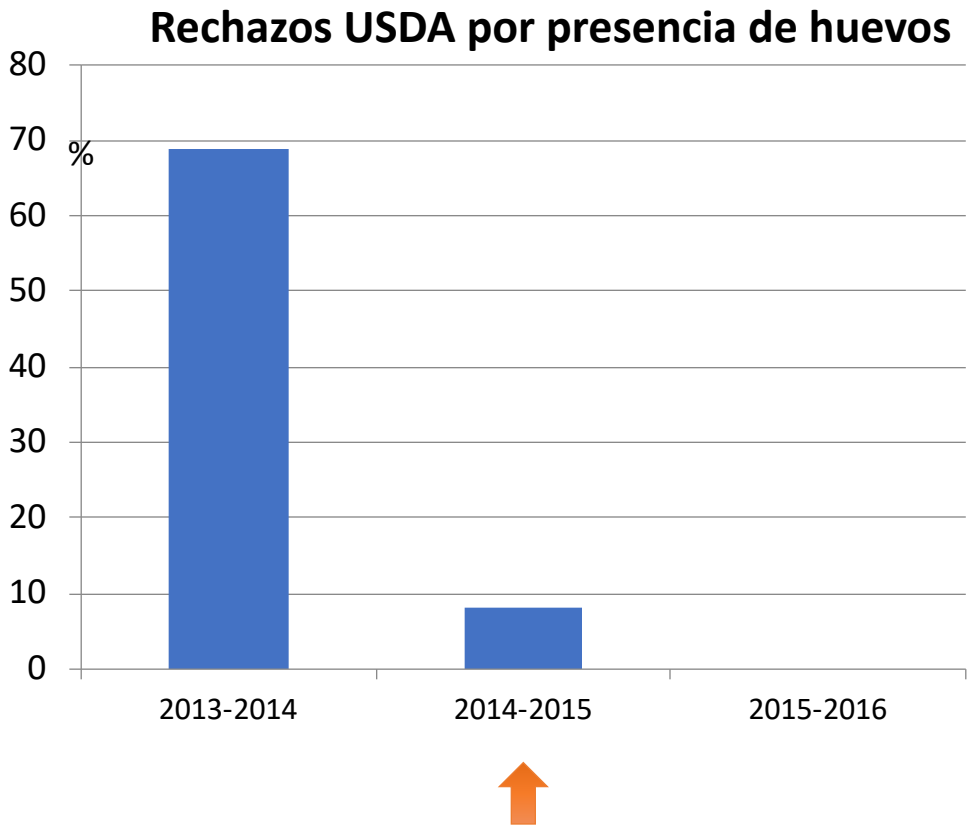
- USDA aprueba Protocolo de identificación Molecular basado en PCR para la identificación de *N. cervinus* y *N. xanthographus*
- Artículo es publicado en JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY

Instituto Nacional de Propiedad Industrial
INAPI - Chile

## 2019

- El INAPI concede la patente de diagnóstico molecular de Naupactus spp.

# Impacto del Proyecto




**Se implementa sistema de detección por PCR en el SAG**

**2015**

Se inicia proyecto: Desarrollo, validación e implementación de un Kit para la identificación de especies del género Naupactus, mediante herramientas moleculares (PCR en tiempo real)

# Diferencias técnicas con PCR dúplex convencional

| PCR convencional | PCR en Tiempo Real |
| --- | --- |
| • Dos reacciones de tipo dúplex<br>• 4 partidores por reacción | • Una reacción de tipo múltiplex<br>• 6 partidores y 3 sondas por reacción |

# Mejoras obtenidas con el PCR en Tiempo Real

- Determinación de la especie en una sola reacción
- Aumento en la especificidad y sensibilidad de detección
- Disminución significativa en los tiempos de procesamiento de muestras

Sistema aprobado por USDA para su utilización