24 y 25 - SETIEMBRE 2015

Resultados de Investigación en CITRICULTURA

+ GENÉTICA SANIDAD PRODUCTIVIDAD

INIA
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Diagnóstico de HLB por PCR

JOSÉ ARTIGAS
UNIÓN DE LOS PUEBLOS LIBRES
BICENTENARIO.UY

MGAP
Servicios Agrícolas
DIVISIÓN ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO

Lic. Mariana Richero

Unidad de Biología Molecular
Laboratorios Biológicos
DGSA-MGAP

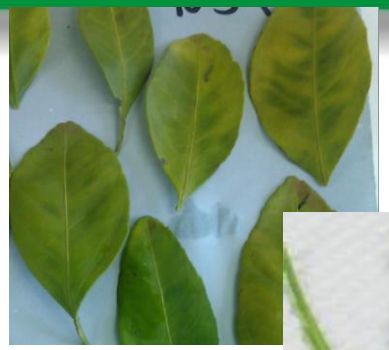
¿PCR?

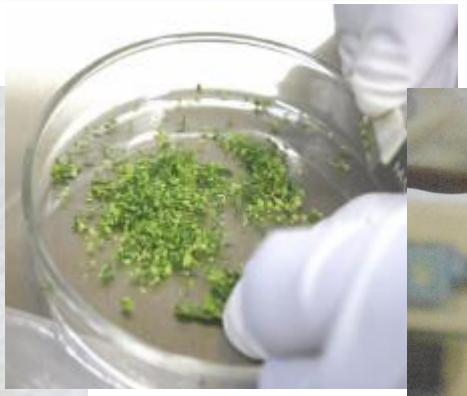
Objetivo:
Obtener un gran número de copias de un fragmento particular de ADN a partir de una cantidad mínima original.

¿PCR en el diagnóstico?

A partir de una mezcla compleja de ADN,
se puede realizar la amplificación con *primers* específicos de un fragmento dado de ADN de una bacteria y luego visualizar el amplicón en un gel de agarosa

Multiplex PCR para HLB



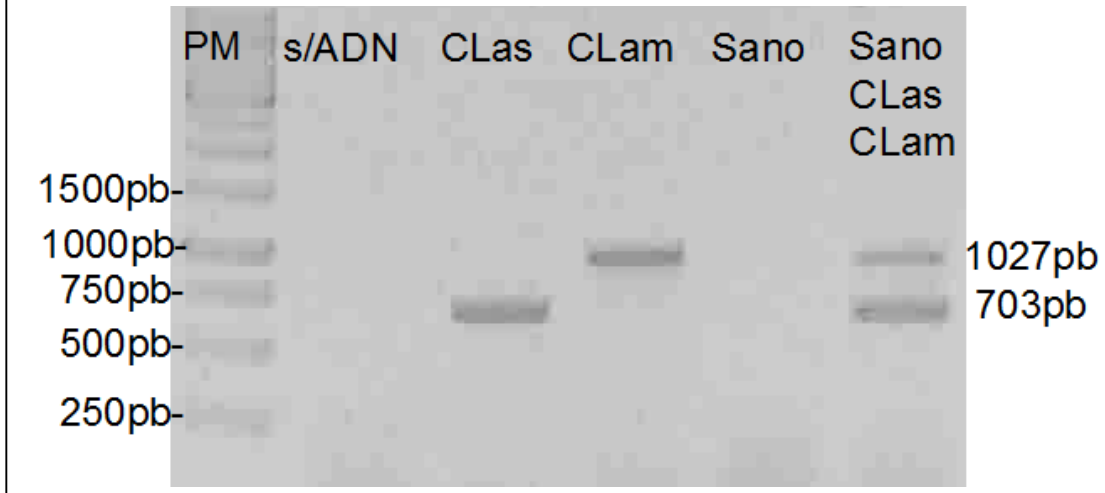


- Procesamiento del material vegetal
- Extracción de ADN (CTAB, Murray & Thompson, 1980)
- Multiplex PCR

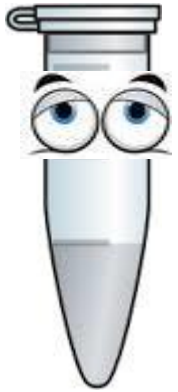
Primers	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Referencia
RPLA2	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	Clas: 703bp Claf: 669bp	Hocquellet *et al.*, 1999
RPLJ5	CAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA		
GB1	AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT	1027bp	Teixeira *et al.*, 2005
GB3c	CCAACTTAATGATGGCAAATATAG		

94ºC	94ºC	62ºC	72ºC	72ºC
2min	30s	45s	1min 30s	5min

35 ciclos

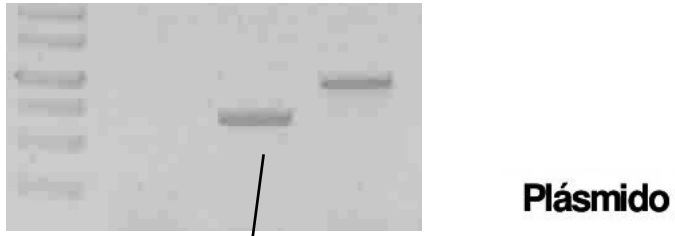


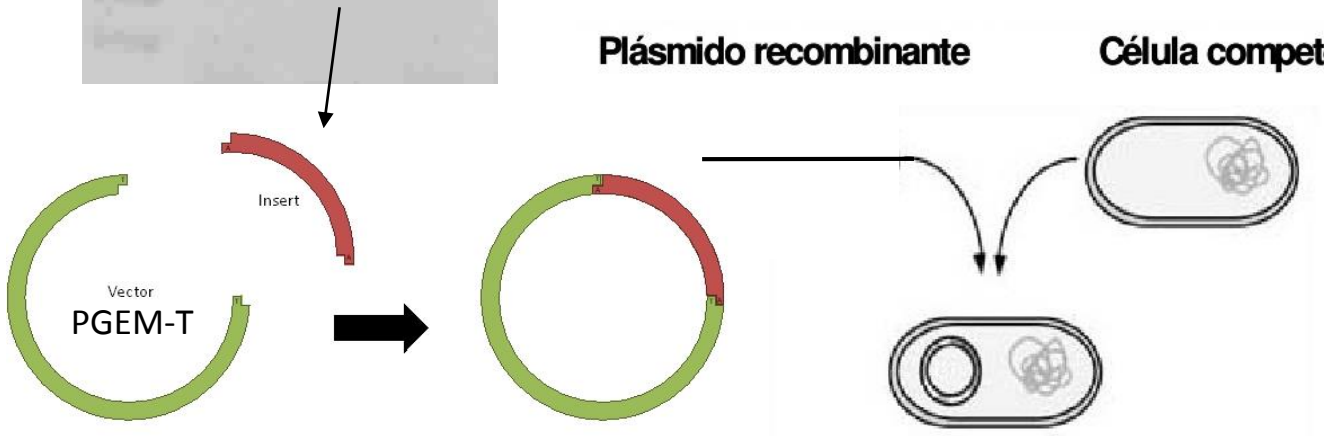
Controles positivos



-ADN plantas infectadas con CLam y CLas (FUNDECITRUS, Brasil)
-ADN planta infectada con CLas (SENASICA, México)

C. Liberibacter spp. no es cultivable!!



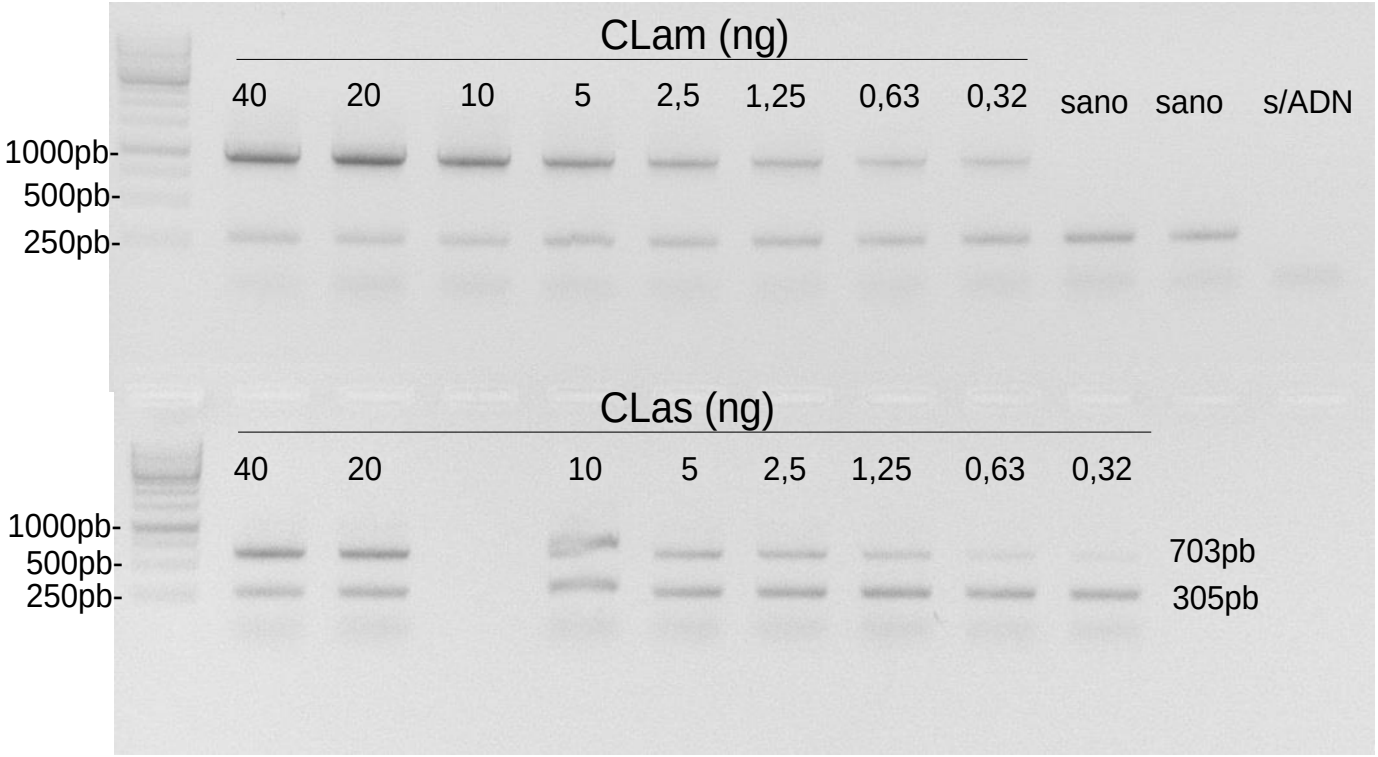


Cepas de *E. coli* productoras de plásmidos
Controles positivos de forma ilimitada

Desventajas:
Sólo control de PCR, no control de extracción
Ausencia de matriz

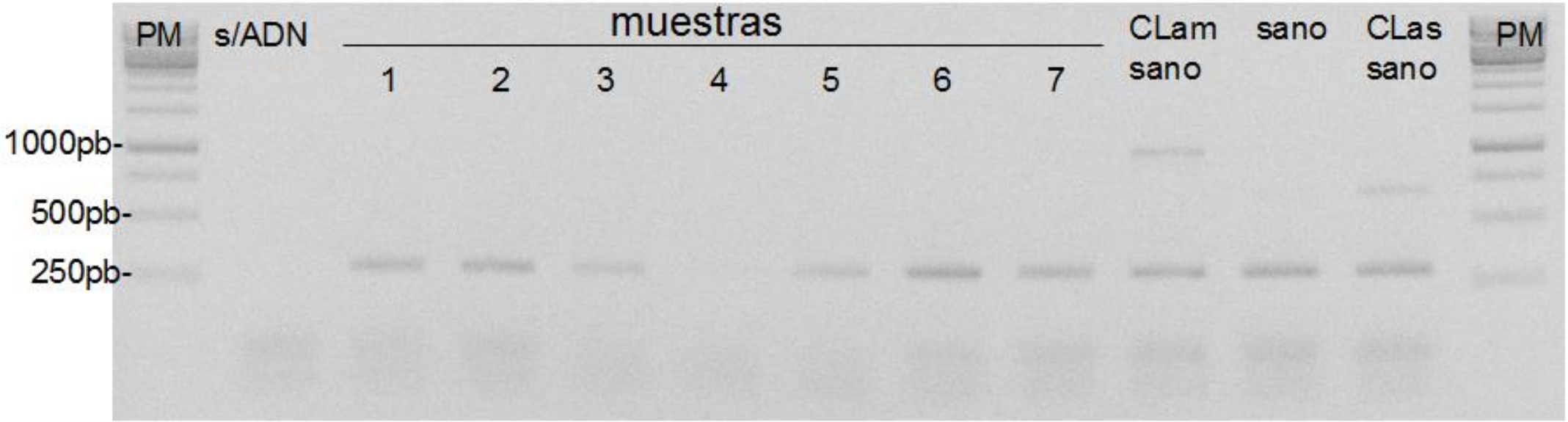
¿Cómo identificar Falsos negativos?

Control interno:
Un fragmento de ADN que se amplifica simultáneamente con el ADN blanco en el mismo tubo de reacción.



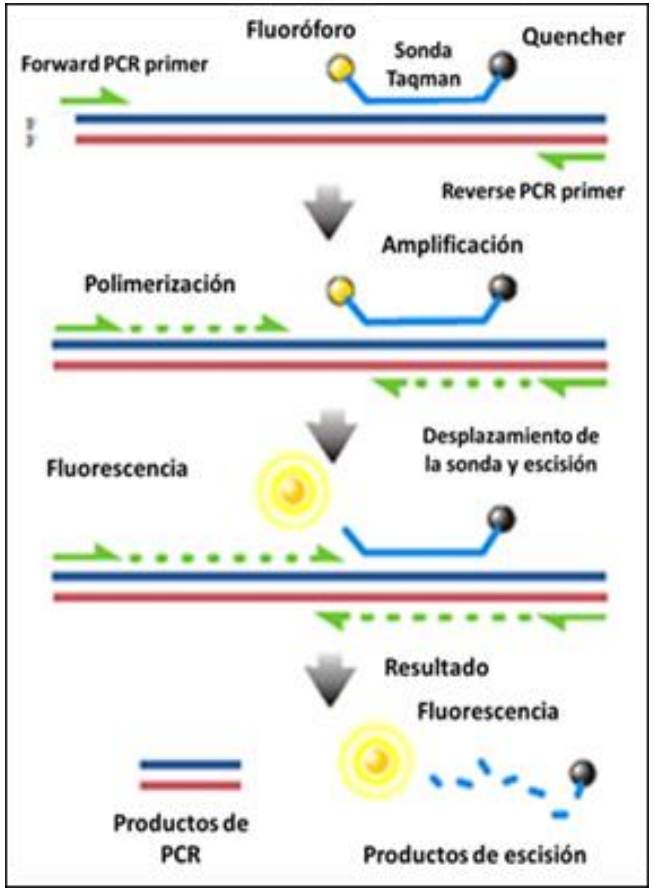
Primers	Secuencia (5'-3')	Referencia
28C	GCTATCCTGAGGGAAACTTC	Cullings, 1992
28new	TCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	Richero, 2012

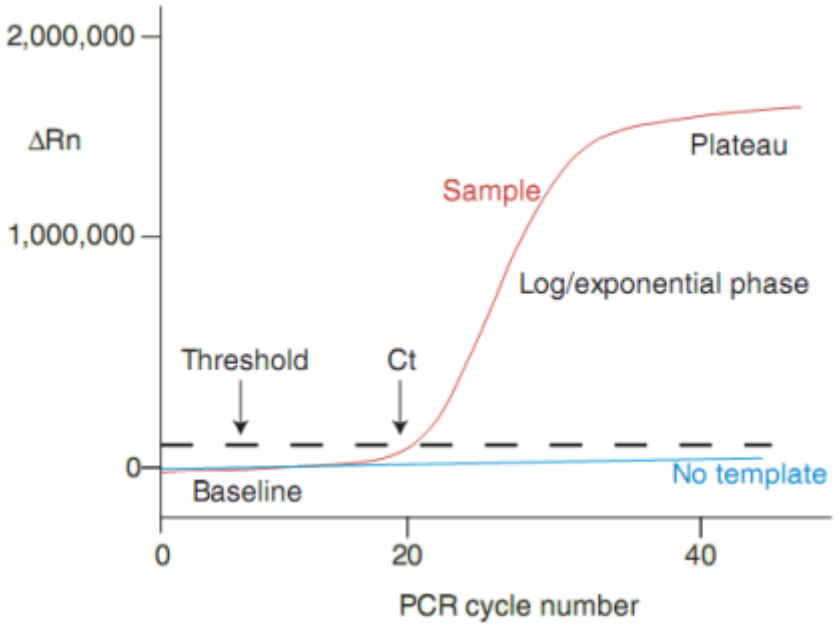
Muestras:
500ng de ADN muestra por reacción
Controles positivos:
2ng ADN plasmídico
500ng de ADN planta sana



¿PCR Real Time?

Permite amplificar y simultáneamente cuantificar el ADN amplificado.
Se emplean sondas marcadas con fluorocromos.





Ct: el número de ciclo de la PCR donde la emisión de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección (umbral).

PCR Real Time	PCR convencional
Amplificación y detección simultanea	Amplificación y detección en dos etapas separadas
Detección durante la fase exponencial temprana (máxima eficiencia)	Detección en punto final (efecto *plateau*)
Mayor especificidad con el uso de sondas	Menor especificidad
Equipamiento e insumos muy costosos	Equipamiento y reactivos de menor costo

HLB por PCR Real Time

- Basado en protocolo USDA (WI-B-T-D-2)

Un par de *primers* y sonda marcada con FAM

específicos para *Ca.* Liberibacter spp.

Un par de *primers* y sonda marcada con TET

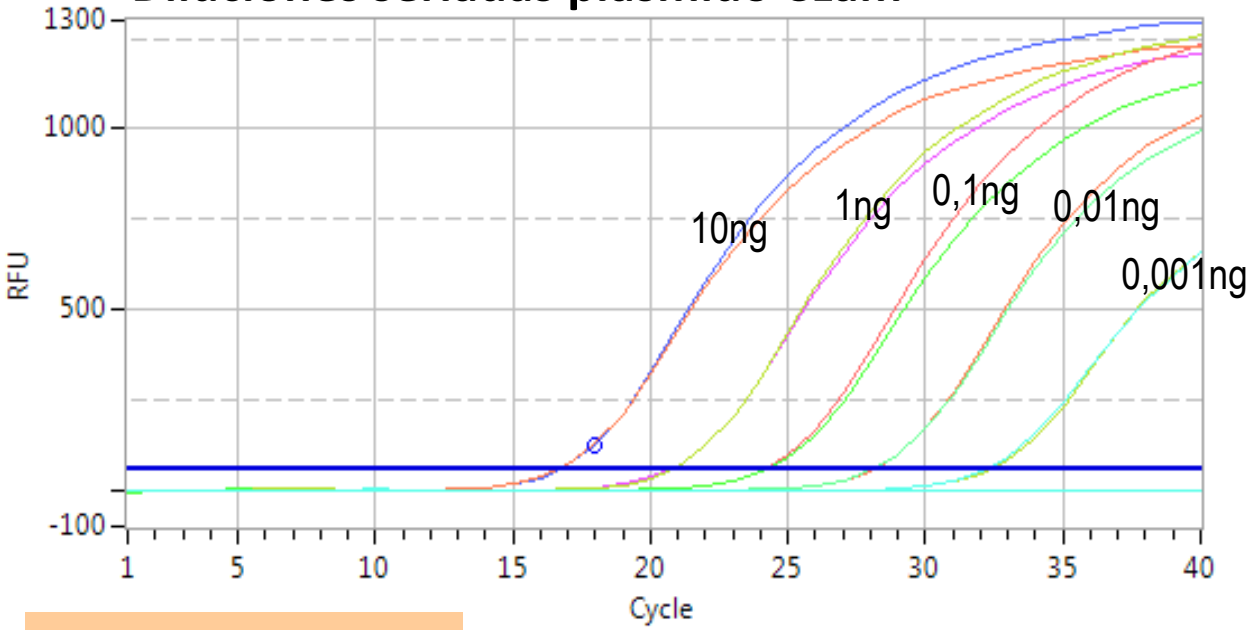
específicos para citocromo oxidasa de plantas

Control negativo: $Ct_{FAM}=0$ y $Ct_{TET}=0$
Control interno: $0 < Ct_{TET} < 38$
Control positivo: $0 < Ct_{FAM} < 32$

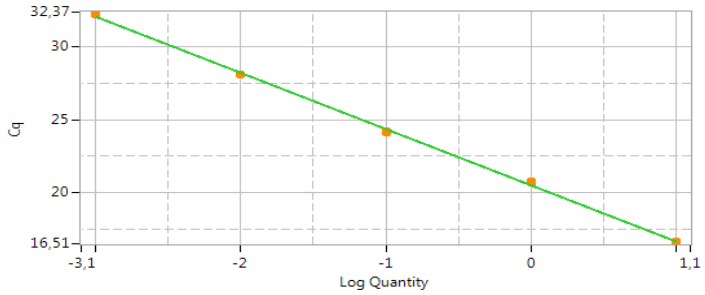
Modificaciones

- Volumen de reacción 25/12,5
- TET/HEX

Diluciones seriadas plásmido CLam



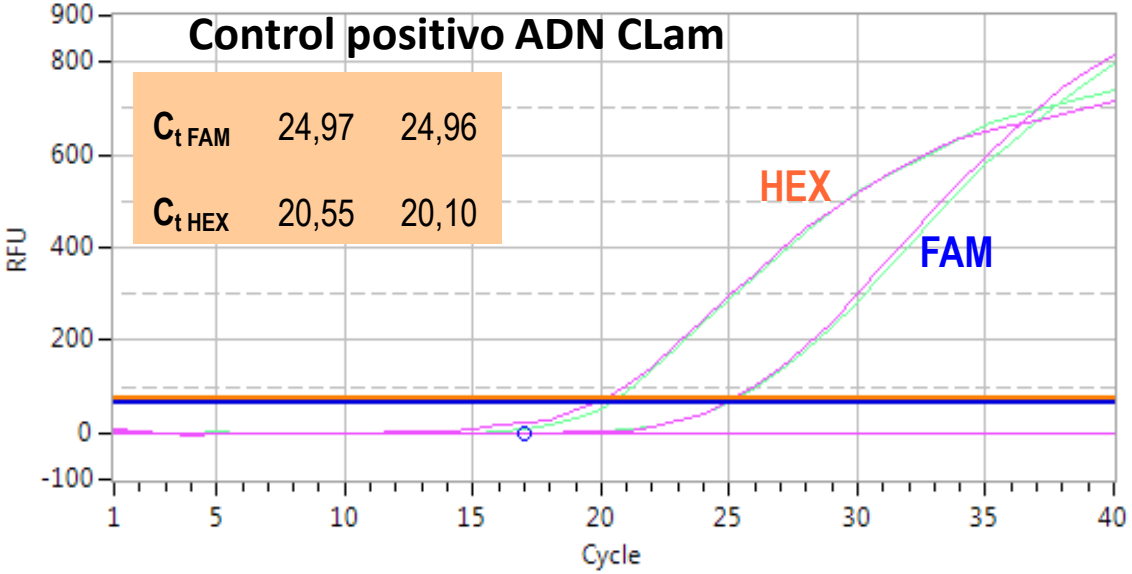
Conc.	C_t	C_t
10ng	16,68	16,61
1ng	20,71	20,76
0,1ng	24,17	24,24
0,01ng	28,09	28,07
0,001ng	32,27	32,19



Efficiency = 81,819%;
y = -3,851x + 20,528; R2 = 0,9992

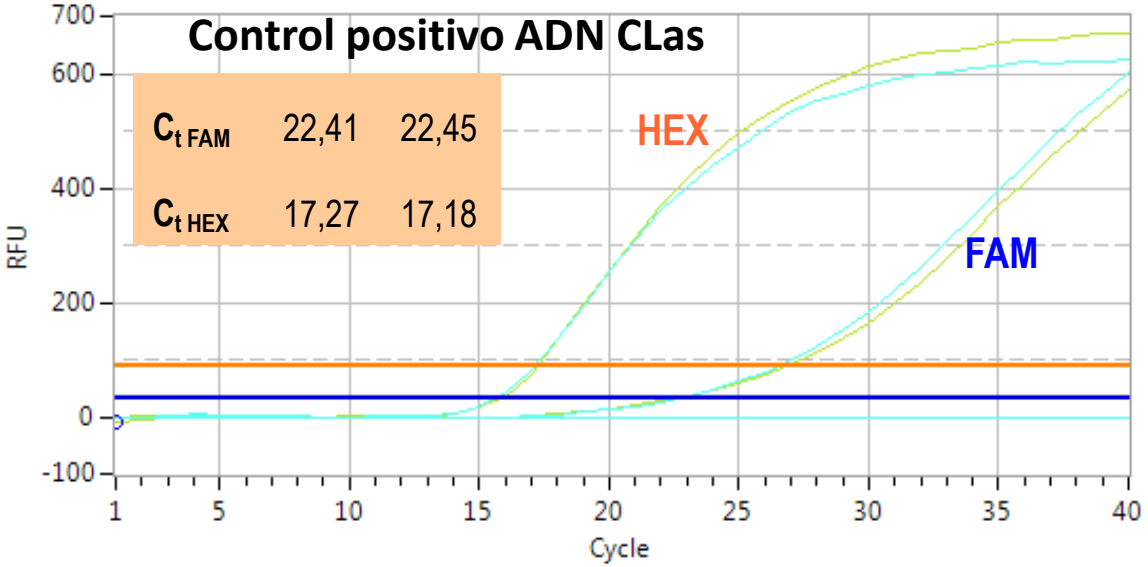
Control positivo ADN CLam

$C_{t\ FAM}$	24,97	24,96
$C_{t\ HEX}$	20,55	20,10



Control positivo ADN CLas

$C_{t\ FAM}$	22,41	22,45
$C_{t\ HEX}$	17,27	17,18



Perspectivas:

Validación de la detección de HLB en tejido vegetal por PCR en tiempo real:
Sensibilidad, Repetibilidad y Reproducibilidad

Ensayos Interlaboratorio con:

- Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal (SENASICA, México)
- Laboratorios FUNDECITRUS, Brasil

Optimización de la extracción de ADN del vector

Puesta a punto de la detección de HLB en el vector por PCR en tiempo real.

Gracias!

Referencias:

Cullings, K.W. (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol Ecol* 1, 223-240

Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J.-M., Garnier, M.(1999). Detection and identification of the two *Candidatus* Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Mol Cell Probes* 5, 373-9

Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of highmolecular weight plantDNA. *Nucleic Acids Res* 239,487-91

Richero, M. (2012). Elección de un Control Interno para incluir en la multiplex-PCR utilizada para diagnosticar las tres especies de *Candidatus* Liberibacter. Informe Técnico del Laboratorio del Biología Molecular. Laboratorios Biológicos, DIGESA-MGAP.

Teixeira, D. C., Danet, J. L., Eveillard, S. & 8 other authors (2005). Citrus huanglongbing in Sa˜o Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus* Liberibacter' species associated with the disease. *Mol Cell Probes* 19, 173–179.

Diseño del primer 28new

Alineamiento de secuencias
del gen de la ARN 28S (Clustal W)

99 pertenecientes a plantas
(las más similares a *Citrus*)
50 pertenecientes a hongo

	Número de acceso	secuencia	
PLANTAS	gi|30230581|gb|AY260012.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
	gi|57340754|gb|AY727939.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|19919600|gb|AF479159.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|57340755|gb|AY727940.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|57340767|gb|AY727952.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|57340769|gb|AY727954.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	401
	gi|188526360|gb|EU544383.1|	GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	401
	gi|19919631|gb|AF479190.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
	gi|9799449|gb|AF274651.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
	gi|9799444|gb|AF274646.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	413
	gi|19919568|gb|AF479127.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|133918089|emb|AM235557.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
HONGOS	gi|425905829|gb|KC015062.1|	GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	434
	gi|425905828|gb|KC015061.1|	GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	365
	gi|291170420|gb|GU250924.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	437
	gi|296905299|gb|GQ254672.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATTCGTGCGAGTGTTC	455
	gi|219960795|gb|FJ568335.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960610|gb|FJ568150.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960783|gb|FJ568323.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960608|gb|FJ568148.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960792|gb|FJ568332.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960786|gb|FJ568326.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960782|gb|FJ568322.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960777|gb|FJ568317.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960760|gb|FJ568300.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279

Zona a 305pb *downstream* del primer 28C existe una secuencia altamente conservada en plantas que difiere claramente de la secuencia conservada en hongos