

Comparación de la sensibilidad de tres métodos de PCR cuantitativa para el diagnóstico de *Candidatus Liberibacter*

Escobar R.; Aranda, P.; Soliz, J.; Lezcano, C. C.; Canteros, B. I.; Gochez, A.
Fitopatología de Citrus. INTA EEA Bella Vista. escobar.romina@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing, HLB de los cítricos, causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), es considerada mundialmente como la enfermedad más amenazadora para la citricultura y se encuentra presente en la zona NEA de nuestro país desde 2012. El INTA participa desde 2009 en la Red Nacional de Laboratorios del SENASA (RedLab) realizando diagnóstico molecular de HLB, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (q-PCR) que hasta ahora es el método más confiable para la evaluación de la bacteria causante de la enfermedad.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue comparar la sensibilidad de 3 tipos de primers utilizados para el diagnóstico molecular de HLB: HLBAs (desarrollado por Li et al. 2006), LJ900 (Morgan et al. 2012) y RNR (Zheng et al. 2016) los cuales se usan según referencia con diferentes volúmenes finales y cantidades de ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Utilizando el método de CTAB se realizaron extracciones de ADN de nervaduras de hojas con síntomas de clorosis irregular típico de HLB. Se cuantificó (ng/ml) cada extracción de ADN y se ajustaron 4 concentraciones: 1000, 500, 100 y 50ng/ul de ADN vegetal de tres plantas de naranja infectadas con CLAs, colectadas en Monte Caseros (2 muestras), Chajari (1 muestra) y como control negativo una planta de naranja sana negativa para CLAs colectada en Bella Vista. Se ajustó y puso a punto una única master mix estándar con volumen final de 20ul para cada primer y 1ul de ADN vegetal por reacción. Se agregó un control de reactivos solo con agua destilada. Se realizó qPCR con cada uno de los primers para cada planta, utilizando las 4 concentraciones por duplicado. Se analizaron y validaron cada uno de los resultados.

RESULTADOS

Los primers HLBAs mostraron amplificación con Ct de 17.3, 18.7, 20 y 22 respectivamente para las 4 concentraciones. Los primers LJ900 mostraron amplificación con Ct 20.7, 21.3, 23.3, 24.7 respectivamente, y los primers RNR mostraron amplificación con Ct 19.3, 20, 22, 23.3. El menor Ct fue 17.3 para HLBAs con 1000 ng. El mayor Ct obtenido fue 24.7 para LJ900 con 50ng.

CONCLUSIONES

Los primers HLBAs demostraron tener los menores Ct ante grandes cantidades de ADN positivo para CLAs, amplificando incluso ante bajos volúmenes de extractos de ADN de plantas positivas para HLB, con lo que podemos concluir que es el más sensible entre los tres métodos analizados.

Referencias

- Li, W., Hartung, J. S., & Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of microbiological methods*, 66(1), 104-115.
- Morgan, J. K., Zhou, L., Li, W., Shatters, R. G., Keremane, M., & Duan, Y. P. (2012). Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes*, 26(2), 90-98.
- Zheng, Z., Xu, M., Bao, M., Wu, F., Chen, J., & Deng, X. (2016). Unusual five copies and dual forms of *nrdB* in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*': Biological implications and PCR detection application. *Scientific Reports*, 6(1), 39020.

