

DIAGNÓSTICO DEL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Fundamento de la técnica

Las técnicas moleculares son muy usadas en la actualidad en el diagnóstico de enfermedades de las plantas, especialmente si estas son causadas por patógenos no cultivables *in vitro*. Para la realización de estas técnicas es necesario en primera instancia el aislamiento del ADN total de la planta para la posterior detección del ADN del patógeno a través de diversas técnicas como la hibridación de ácidos nucleicos y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la purificación de ADN de las plantas se han descrito numerosas metodologías. Dentro de las más utilizadas se encuentran los métodos en los que se usa el cetyl-trimetil-bromuro de amonio (CTAB) para la extracción.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que permite la amplificación de ácidos nucleicos mediante la repetición de la reacción de polimerización de una enzima ADN polimerasa termoestable. Esta reacción cuenta de tres pasos principales: *desnaturalización*, que separa la doble hélice y rompe las estructuras secundarias del ADN, *hibridación*, para el acoplamiento de los cebadores a las cadenas complementarias molde, y *extensión*, que consiste en la adición de nucleótidos por la enzima Taq ADN polimerasa. La repetición de ciclos de estos 3 pasos en el termociclador, permite la acumulación exponencial del fragmento blanco. El uso de cebadores específicos que flaquean el ADN permite la detección del ADN de un patógeno si se encuentra presente en una muestra de ADN total de una planta. La banda específica amplificada se visualiza bajo luz ultravioleta, al marcarse con bromuro de etidio, a través de una electroforesis en gel de agarosa.

Extracción de ADN de cítricos por el método de Murray y Thompson (1980)

1. Pesar 500 mg de nervadura central de las hojas.
2. Macerar en mortero con nitrógeno líquido.
3. Pasar el macerado a tubos de 50 mL y agregar 3 mL de tampón de extracción (CTAB 20g + NaCl 82g + PVP (25) 20g + Tris-HCL 1 M pH 8 100mL + EDTA 0,5M 100 mL y completar con H₂O a 1 L), esterilizar.
4. Adicionar β mercaptoetanol para una concentración final de 0,2 %. al momento de usarse. Incubar a 65°C por 30 minutos.
5. Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm.
6. Pasar a tubos eppendorf de 2 mL, 900 μ L del sobrenadante y adicionar 900 μ L de cloroformo-isoamilalcohol 24:1, conservado a 4 °C.
7. Agitar en vortex y centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.
8. Recuperar a nuevos tubos 800 μ L del sobrenadante (fase acuosa) y adicionar 480 μ L de isopropanol o una solución de etanol absoluto-acetato de amonio 7,5 M (85,71 mL + 14,29 mL).
9. Incubar a -20°C durante 30 minutos o toda la noche.
10. Centrifugar 10 minutos a 14 000 rpm y descartar el sobrenadante.
11. Lavar dos veces el pellet con 300 μ L de etanol (70%) conservado a 4°C.
12. Agitar en vortex brevemente, centrifugar 10 minutos a 14 000 rpm.
13. Secar el pellet al vacío durante unos minutos y resuspender en 100 μ L de agua bidestilada estéril.

PCR para la detección de *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. africanus*

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer 10X	4
dNTP 5 mM	1,6
MgCl ₂ 50 mM	1,6
CebadorA2 (100 µM)	0,2
Cebador J5 (100 µM)	0,2
Cebador GB1 (100 µM)	0,2
Cebador GB3 (100 µM)	0,2
Água bidestilada estéril	30,5
DNA genômico (500 ng/µL)	1,0
Taq DNA polimerasa 5U/ µL	0,3
Volumen final	40

Ciclos de reacción

- 1- 94°C – 30 segundos
- 2- 62°C – 30 segundos
- 3- 72°C – 1 minuto
- 4- 35 veces al paso 1
- 5- 4°C - 10 min

Electroforesis en gel de agarosa 2 %

- 1) Pesar 2g de agarosa y adicionar 100 mL de tampón TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA).
- 2) Fundir la solución a 105°C por 5 minutos en un horno de microondas, adicionar bromuro de etidio de una solución madre (10 mg/ mL en agua) hasta una concentración de 0,5 µg/ mL y mezclar agitando vigorosamente.
- 3) Enfriar la solución a 60°C.
- 4) Verter en el molde de una cámara de electroforesis con un peine apropiado.
- 5) Remover el peine cuidadosamente y aplicar 20 µL de cada producto de PCR con 2 µL de tampón de carga III (0,25% bromofenol azul, 0,25 % xileno cianol y 30% glicerol, en agua) y 5 µL de un patrón de peso molecular de 1 Kb.
- 6) Correr la electroforesis a 100 V con la cámara de electroforesis llena de tampón TAE 1X.
- 7) Visualizar las bandas de los fragmentos amplificados en un transiluminador de luz ultravioleta.

