

Autores: Israel Morales-González*, Mario Espinosa-Mendoza, Sonia Monroy-Martínez, José Gustavo Torres-Martínez, José Abel López-Buenfil.

Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-Laboratorio de Biología Molecular. dgsv.cnrfito35@senasica.gob.mx

Introducción

La colección de controles positivos (CNRFBM) es el principal repositorio de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) de fragmentos clonados a partir de la amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) los cuales se realizan a partir de organismos fitopatógenos. Su misión radica en la adquisición, autenticación, producción, preservación, desarrollo y distribución de material genómico y material clonado, con la finalidad de respaldar la investigación científica y coadyuvar al diagnóstico fitosanitario.

Objetivo

Constituir un banco de controles positivos de RNA, gDNA y DNA plasmídico

Materiales y Método

Origen de las muestras: la colección se ha conformado con muestras de detecciones positivas por parte de los laboratorios de CNRF, por compras a otras colecciones biológicas y de donaciones (Figura 1).



Generación de controles positivos: se realizan mediante clonación la cual genera miles de copias exactas de un fragmento de DNA. Se introduce el fragmento de DNA amplificado mediante PCR en un plásmido, dicho plásmido se introduce en *E. coli* mediante un proceso llamado transformación, las bacterias con dicho plásmido se seleccionan mediante antibióticos, las bacterias con el plásmido se cultivan y se utilizan para hacer DNA plasmídico (Figura 2).



Verificación del inserto clonado por secuenciación: se corrobora el fragmento amplificado mediante secuenciación (3130 AB). La secuencia que se obtiene se compara con las que están reportadas en el Gen Bank mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica NCBI por sus siglas en Inglés.

De la preservación: se realiza después de la verificación del inserto por medio de secuenciación, se almacena en glicerol 30% a -70°C.



Figura 1. Adquisición de material y donaciones de investigadores



Figura 2. Proceso de preservación de DNA plasmídico

Resultados

A la fecha se cuenta con un total de 1518 viales con DNA plasmídico conservados a -20°C que corresponden a 85 especies de plagas tales como *Xylella fastidiosa*, *Guignardia bidwellii*, *Potato virus Y strain NTN*, *Potato mop-top virus*, *Ditylenchus dipsaci*, *D. destructor*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Citrus cachexia viroid*, *Avocado sunblotch viroid*, *Maize bushy stunt phytoplasma*, *Ceratitis capitata*, *Grapholita packardii*, entre otros.

Se cuenta con 1 base de archivos .ab1 de las especies clonadas (Figura 3)

Material resguardado		Conservación (viales)	
Familias	30	DNA plasmídico a -20°C	1518
Géneros	95	Cepa bacteriana en glicerol a -70°C	733
Especies	85		

1 base con 135 secuencias generadas

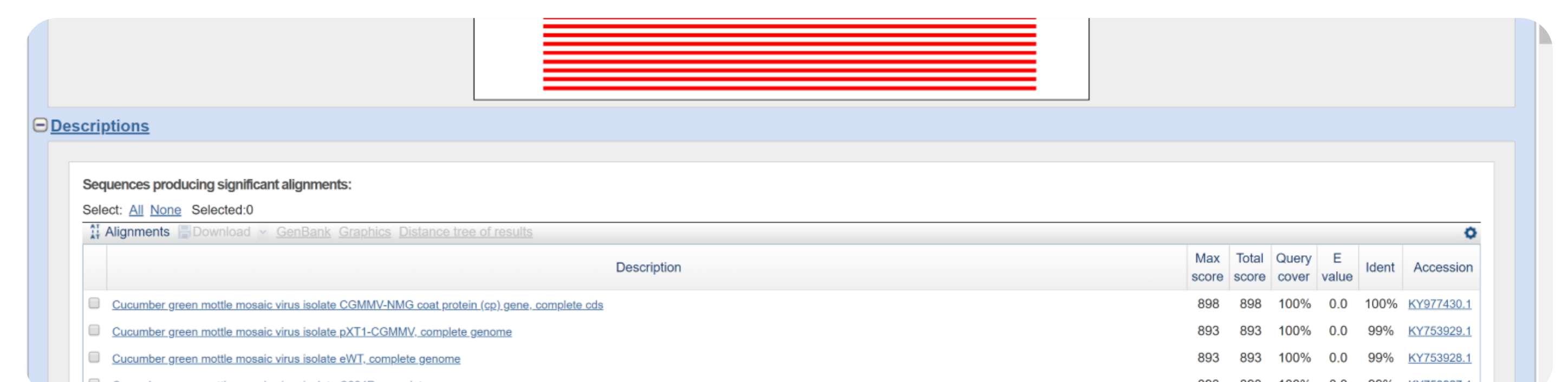


Figura 3. Resultado del análisis de la secuencia en el GenBank del NCBI, obteniendo una identidad del 100%, una cobertura del 100% y 0% de error.

Conclusiones

El contar con un banco de controles de RNA, gDNA y DNA plasmídico fortalece al diagnóstico fitosanitario, coadyuva a la estandarización de protocolos de detección por técnicas moleculares y apoya investigación fitosanitaria en México.

Bibliografía

Sambrook, J. y Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. Ed Cold Spring Harbor Laboratories. Nueva York. USA 2001. 2344 págs.