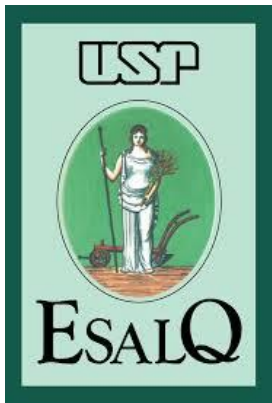


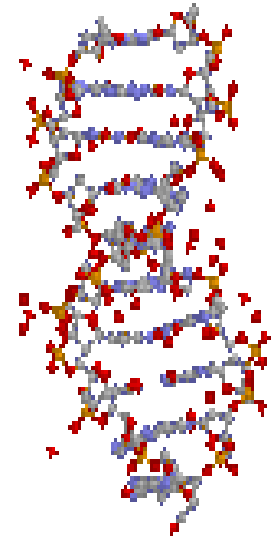
Detecção molecular de fitopatógenos



Dra. Maisa Ciampi Guillard

Laboratório de Fungos Fitopatogênicos
Departamento de Fitopatologia
ESALQ/USP

maisaciampi@usp.br
maisaciampi@gmail.com



Diagnóstico molecular de doenças de plantas

- ✓ Globalização dos mercados de produtos agrícolas – intercâmbio de material vegetal – proteção
- ✓ Necessidade de diagnóstico confiável – tomada de decisões – manejo de doenças
- ✓ Estratégias de prevenção contra novas introduções e progressões de doenças
- ✓ Avaliação de um grande n° de amostras em curto período de tempo
- ✓ Material perecível – ferramentas de diagnóstico no local – patógenos quarentenários – elevar eficiência e rapidez na inspeção – fronteiras

Princípios dos métodos moleculares

- ✓ Ferramentas essenciais para a diagnose precisa de doenças de plantas
- ✓ Ácidos nucleicos – DNA e RNA – especificidade
 - ✓ Reação da amplificação da polimerase em cadeia (PCR)
 - ✓ RT-PCR
 - ✓ Nested-PCR
 - ✓ PCR multiplex
 - ✓ PCR quantitativa em tempo real (qPCR)
 - ✓ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)
 - ✓ Hibridização
 - ✓ Microarranjos

Preparo da amostra para análise molecular

- ✓ Essencial, crítico
- ✓ Protocolos eficientes e reprodutíveis – processamento de lotes de amostras
- ✓ Isolamento de ácidos nucleicos – DNA e RNA
- ✓ Evitar a presença de compostos inibitórios – comprometer a detecção
 - ✓ Polissacarídeos, compostos fenólicos, óleos, látex
 - ✓ Patógenos biotróficos – material do hospedeiro infectado

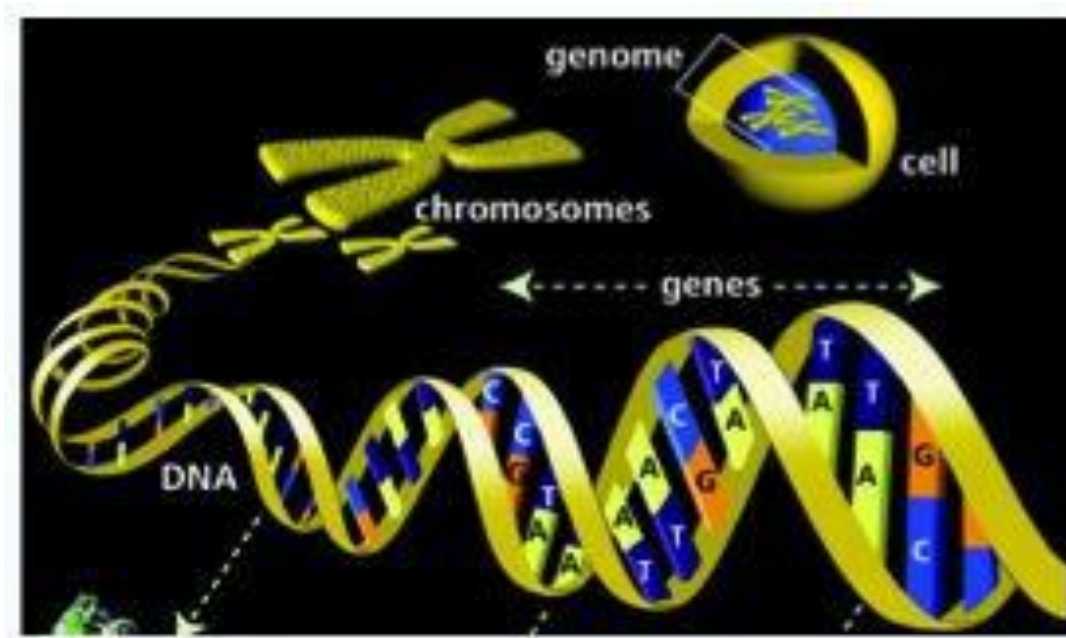
Preparo da amostra para análise molecular

- ✓ Uso de kits comerciais para extração de ácidos nucleicos:
 - ✓ DNeasy e RNeasy Plant System – Qiagen
 - ✓ Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega
 - ✓ NucleoSpin Plant II - Macherey-Nagel

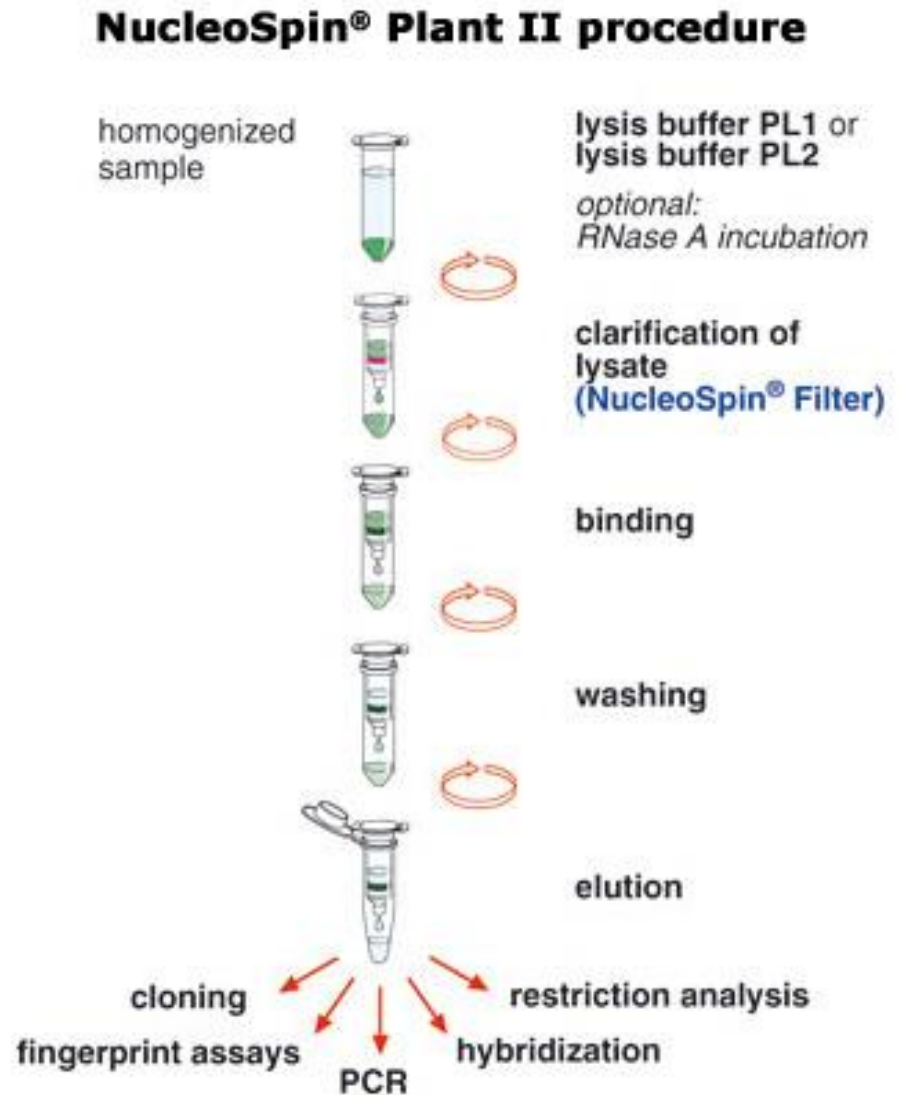
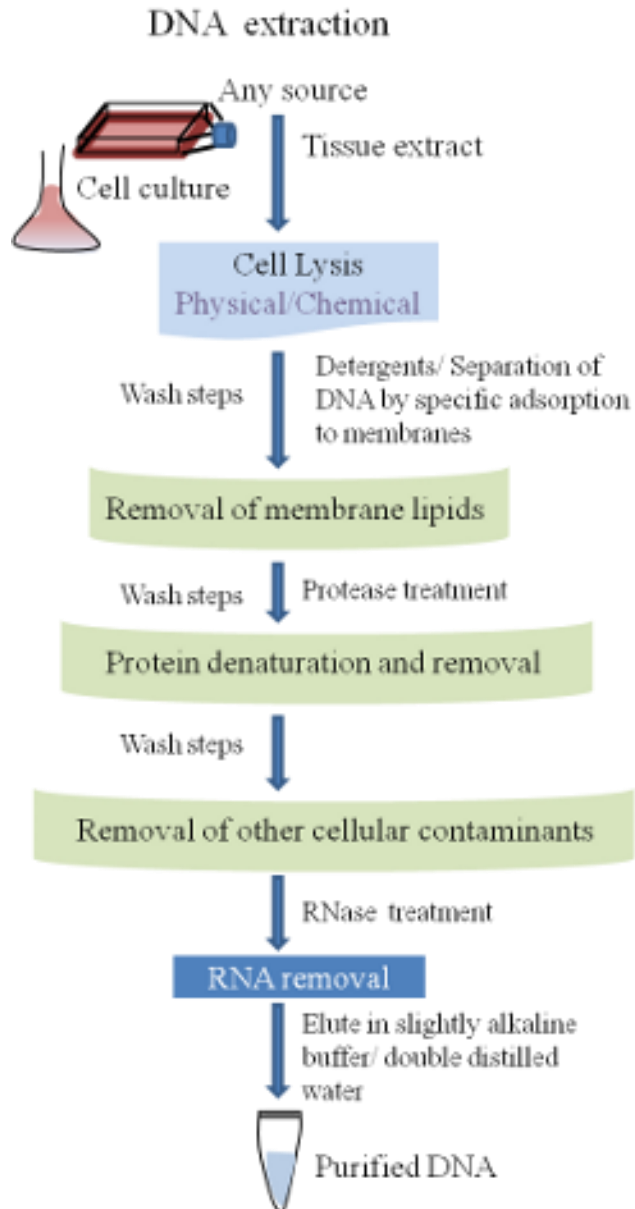


Extração de ácidos nucleicos

- ✓ Protocolo convencional - CTAB
- ✓ Lise celular – rompimento da parede celular e membrana citoplasmática
- ✓ Remoção de polissacarídeos e proteínas – SDS
- ✓ Precipitação dos ácidos nucleicos – álcool
- ✓ Degradação do ácido nucleico não alvo – uso de RNase ou DNase

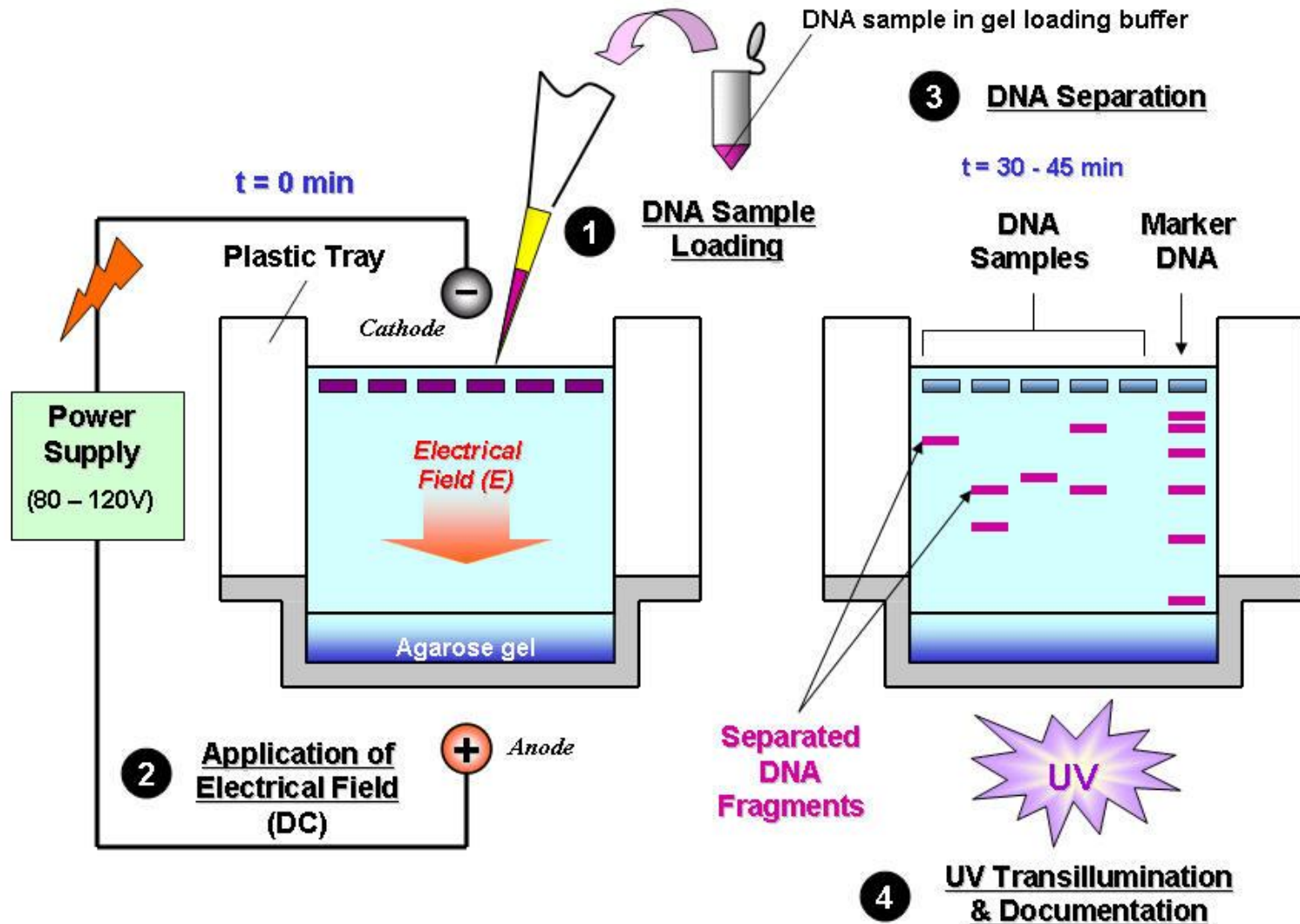


Extração de ácidos nucleicos



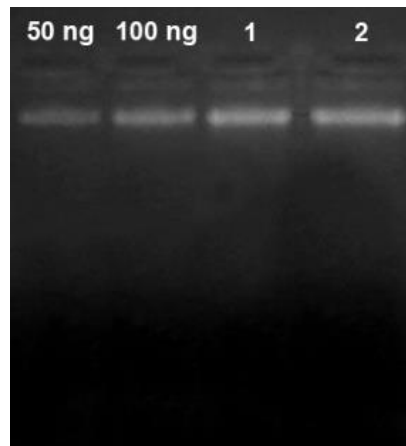
Extração de ácidos nucleicos

- ✓ Quantificação - Eletroforese em gel de agarose



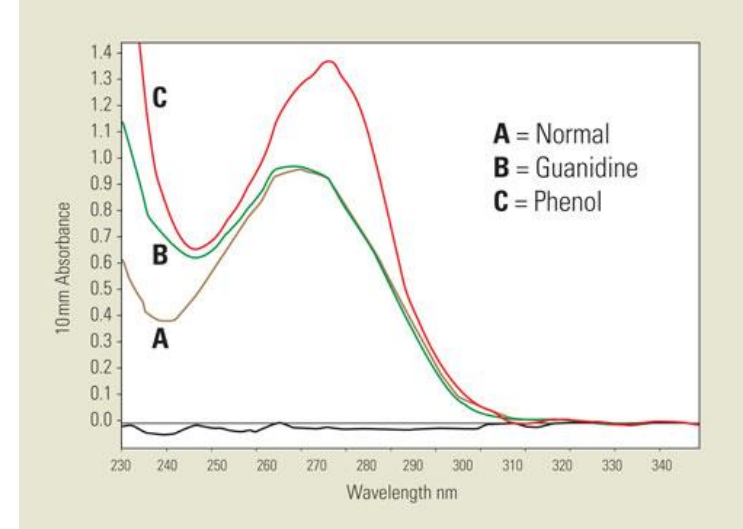
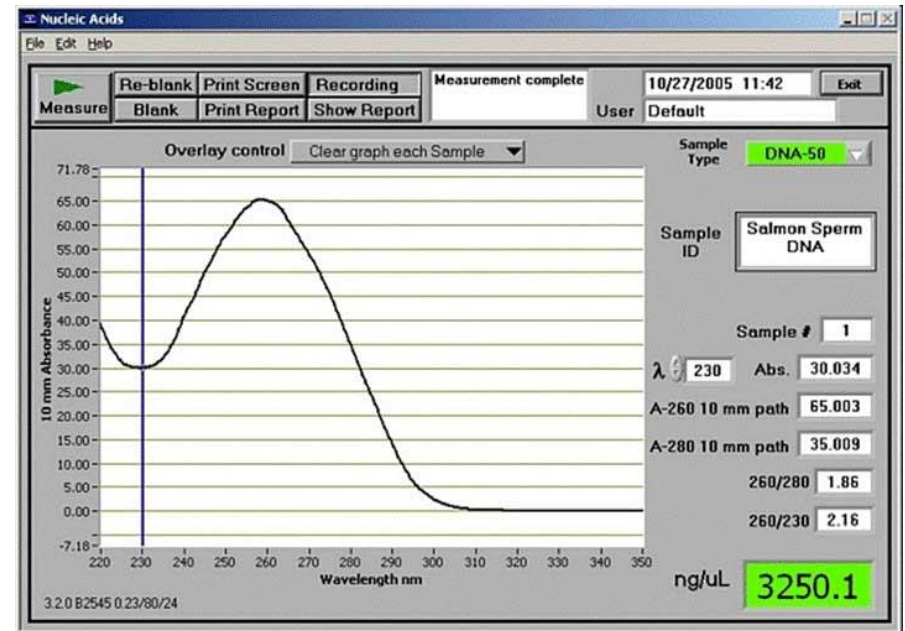
Extração de ácidos nucleicos

- ✓ Quantificação
 - ✓ Eletroforese em gel de agarose + marcador de concentração conhecida
 - ✓ Coloração do gel com SYBR Green – detecção sob luz UV (em substituição do brometo de etídeo – tóxico)
- ✓ Diluição – 10 ng/uL para PCR

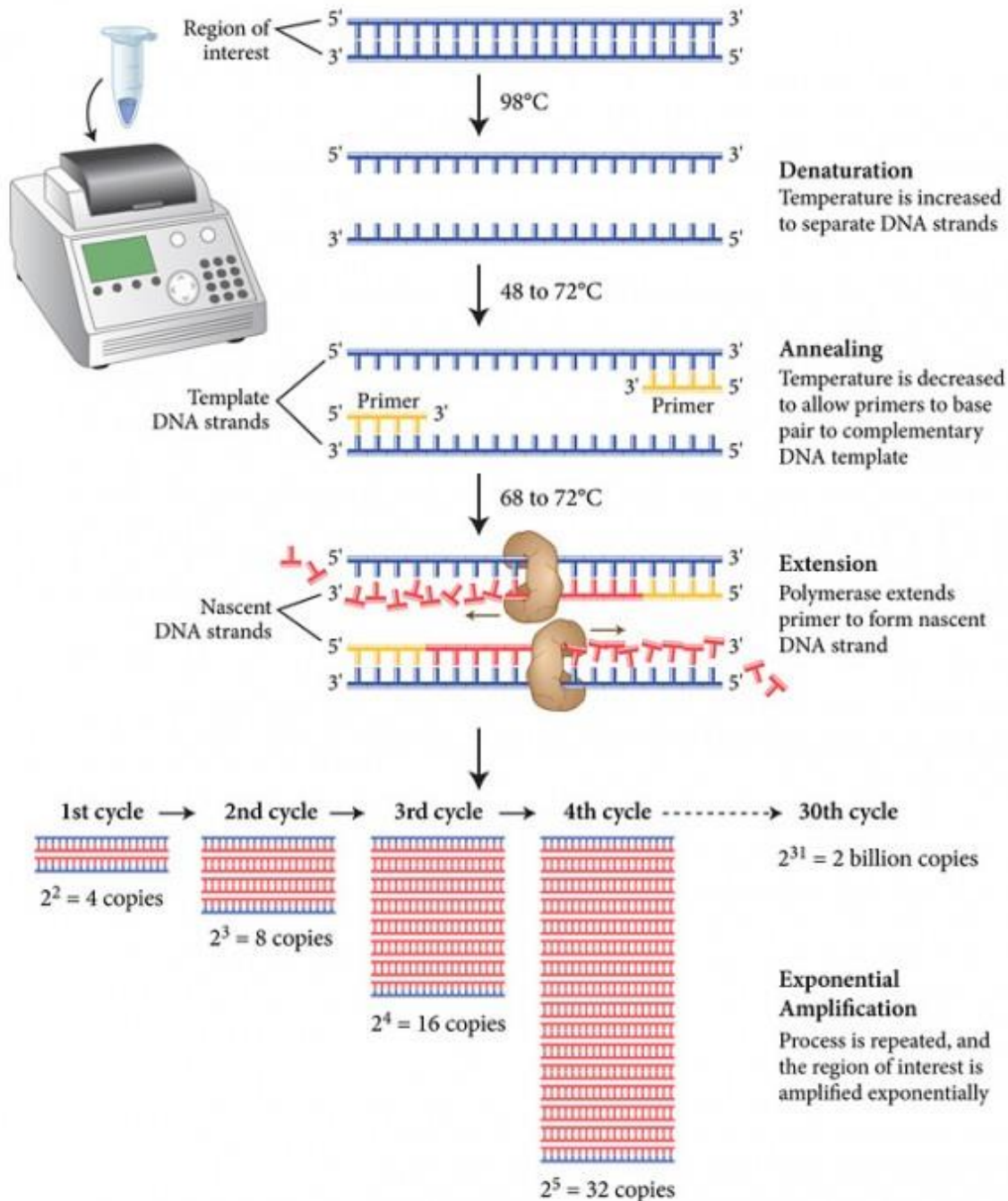


Extração de ácidos nucleicos

- ✓ Quantificação
 - ✓ Espectrofotômetro: Nanodrop

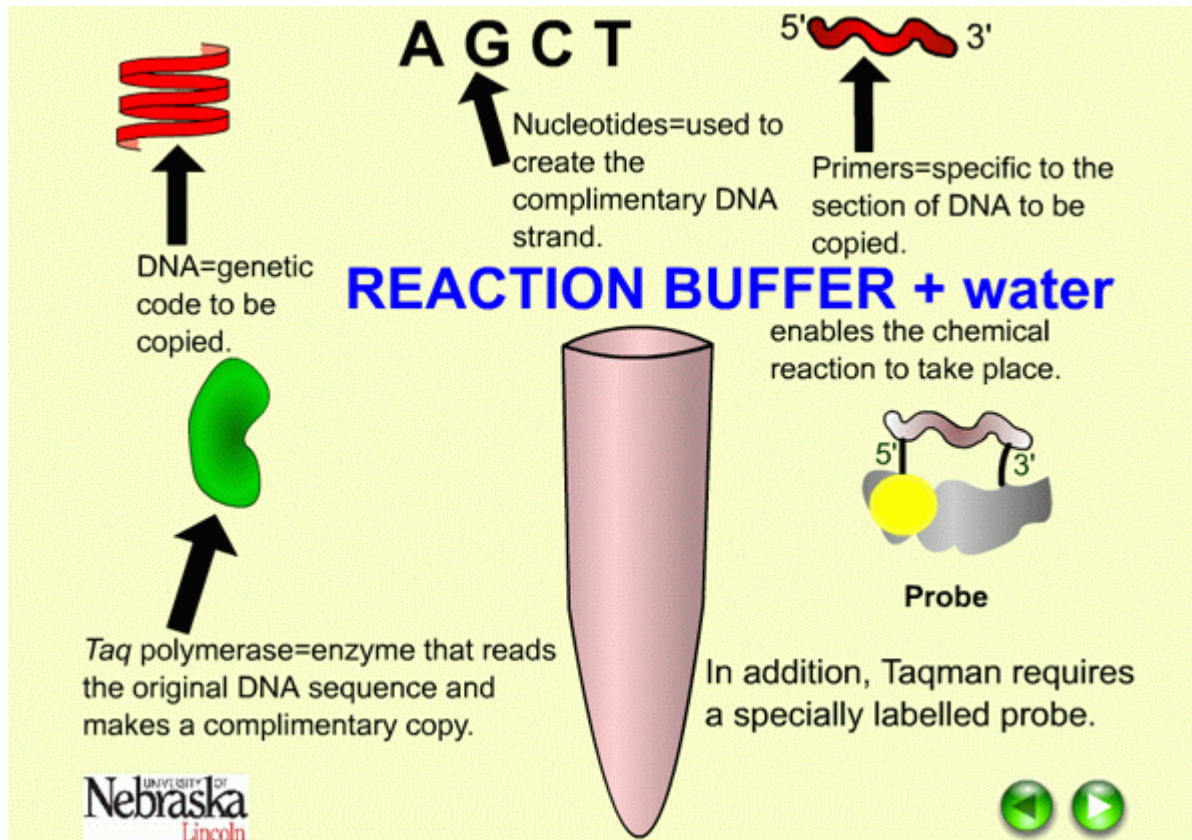


PCR



- ✓ Amplificação in vitro a partir de uma única molécula de ácido nucleico – exponencial
- ✓ DNA ou RNA polimerase – duplicação material genético durante divisões celulares

PCR



<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

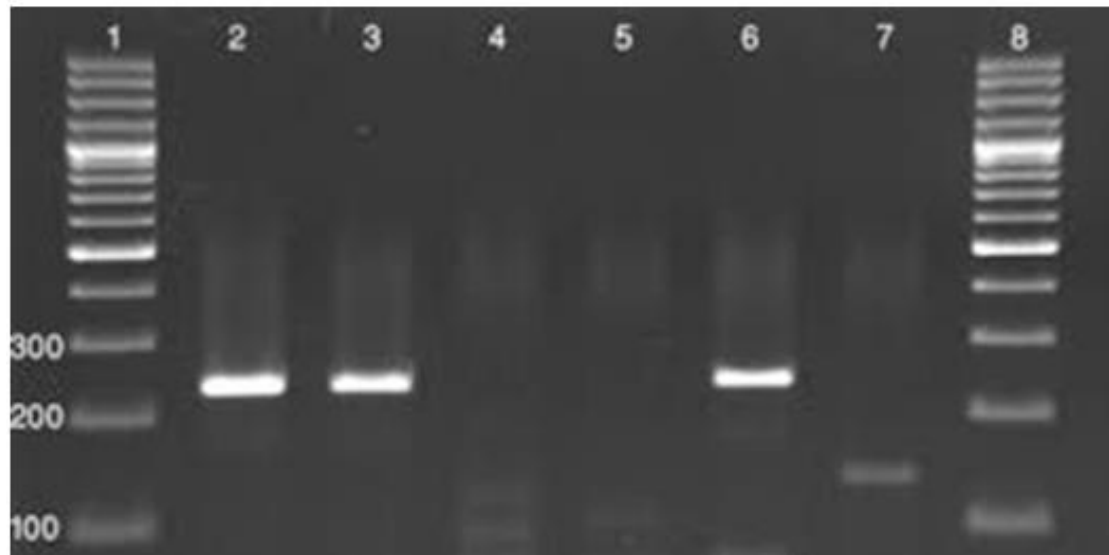
PCR

- ✓ Programação de amplificação:
 - ✓ Desnaturação inicial – 94-96°C por 2 a 5 min
 - ✓ Ciclagem – 30-40 ciclos
 - ✓ Desnaturação – 94-96°C por 30 seg
 - ✓ Anelamento – iniciador + alvo – 50-65°C - 30 seg a 1 min
 - ✓ Extensão – 72°C por 30 seg a 1 min
 - ✓ Extensão final – 72°C por 5 a 10 min
- ✓ Termociclador
- ✓ 2 a 3 horas



PCR

- ✓ Visualização da amplificação
 - ✓ Eletroforese em gel de agarose + marcador de concentração conhecida
 - ✓ Coloração do gel com SYBR Green – detecção sob luz UV



PCR

Vantagens:

- ✓ Detecção de um único alvo em misturas complexas – iniciadores projetados complementares a regiões únicas do genoma do patógeno alvo
- ✓ Detecção rápida e específica de múltiplos alvos
- ✓ Detecção de patógenos não-cultiváveis como vírus, algumas bactérias e fitoplasmas e fungos biotróficos
- ✓ Custo ~R\$ 3,00/amostra

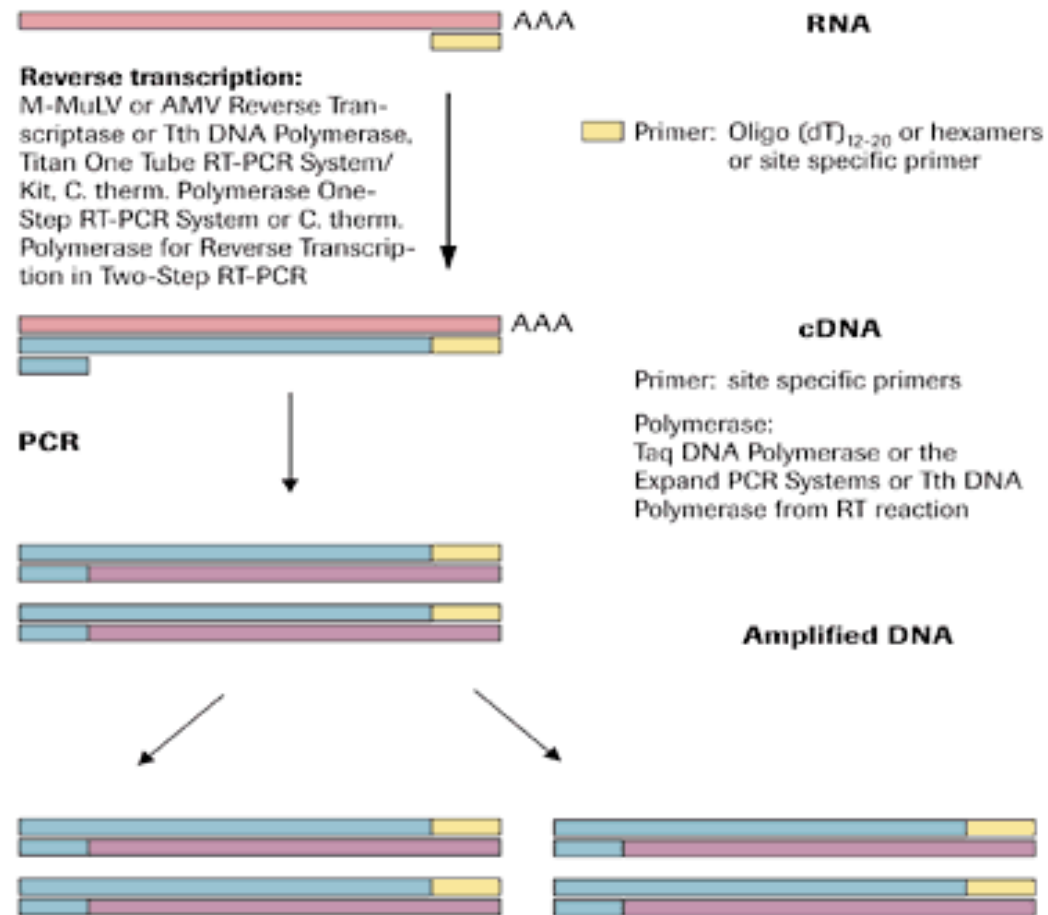
PCR

Pontos negativos:

- ✓ Presença de amplificação confirma a presença de DNA do patógeno na amostra testada, mas não a sua viabilidade
- ✓ Contaminantes
- ✓ Inibidores
- ✓ Informação prévia de sequências genômicas

RT-PCR

- ✓ Detecção de vírus de plantas
- ✓ Alta sensibilidade e especificidade
- ✓ Maioria vírus RNA
- ✓ Transcrição reversa converte RNA em cDNA – amplificação por PCR



RT-PCR

Identification of natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* in Korea by RT-PCR with root tissues

Eui-Joon Kil • Ye-Ji Lee • Seungchan Cho • Chung-Kyoon Auh •
Donggiun Kim • Kyeong-Yeoll Lee • Mi-Kyeong Kim •
Hong-Soo Choi • Chang-Seok Kim • Sukchan Lee

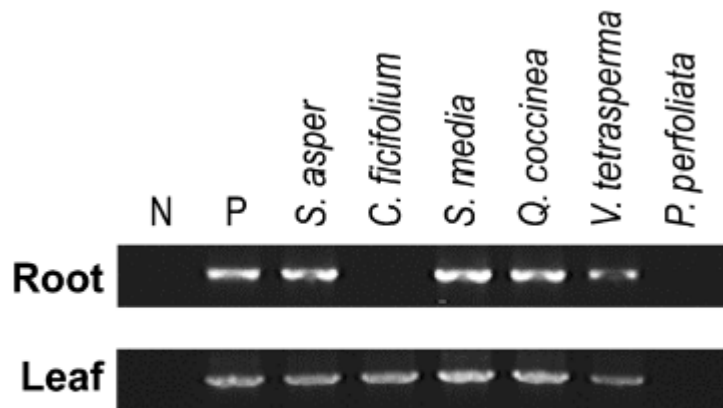


Fig. 2 Detection of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) in weeds collected from a ToCV-containing greenhouse. Lane N, non-infected tomato plants; lane P, ToCV-infected tomato plants



FIGURE 1 - *Tomato chlorosis virus* on plant showing leaf symptom of interveinal chlorosis. Afonso Cláudio ES. 2007.

Tomato chlorosis virus (ToCV) é uma espécie do gênero *Crinivirus*, transmitida por *Bemisia tabaci* biótipo B

Nested-PCR

- ✓ PCR em 2 etapas:
 - ✓ Pré-amplificação com 1º par de iniciadores externos
 - ✓ Amplificação com 2º par de iniciadores internos
- ✓ DNA ou RNA molde da 2ª reação = produto amplificado da 1ª reação
- ✓ Detecção material genético em baixa quantidade na amostra: > sensibilidade
- ✓ Risco de contaminação – 2 rodadas de amplificação em 2 tubos

Detecção de *Citrus tristeza virus* (CTV) (Olmos *et al.*, 2003)



Nested-PCR

Detecção de *Citrus tristeza virus* (CTV)
(Olmos *et al.*, 2003)

- Diluição 10 x planta sadia: infectada

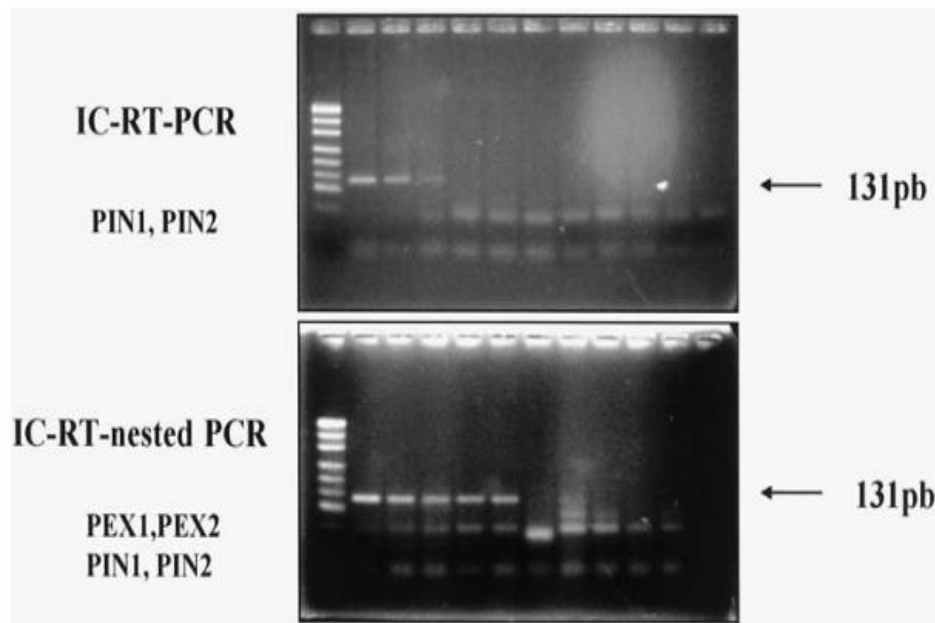
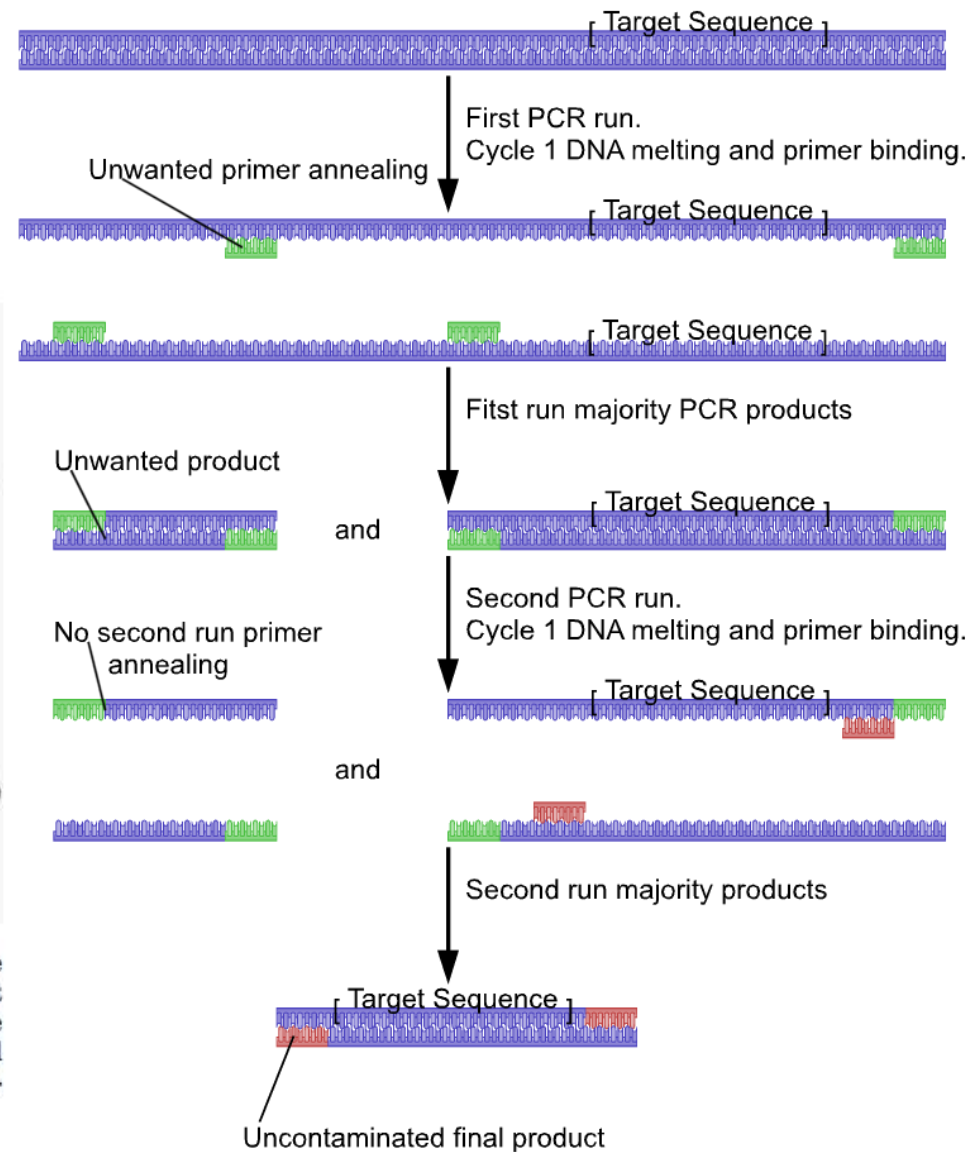
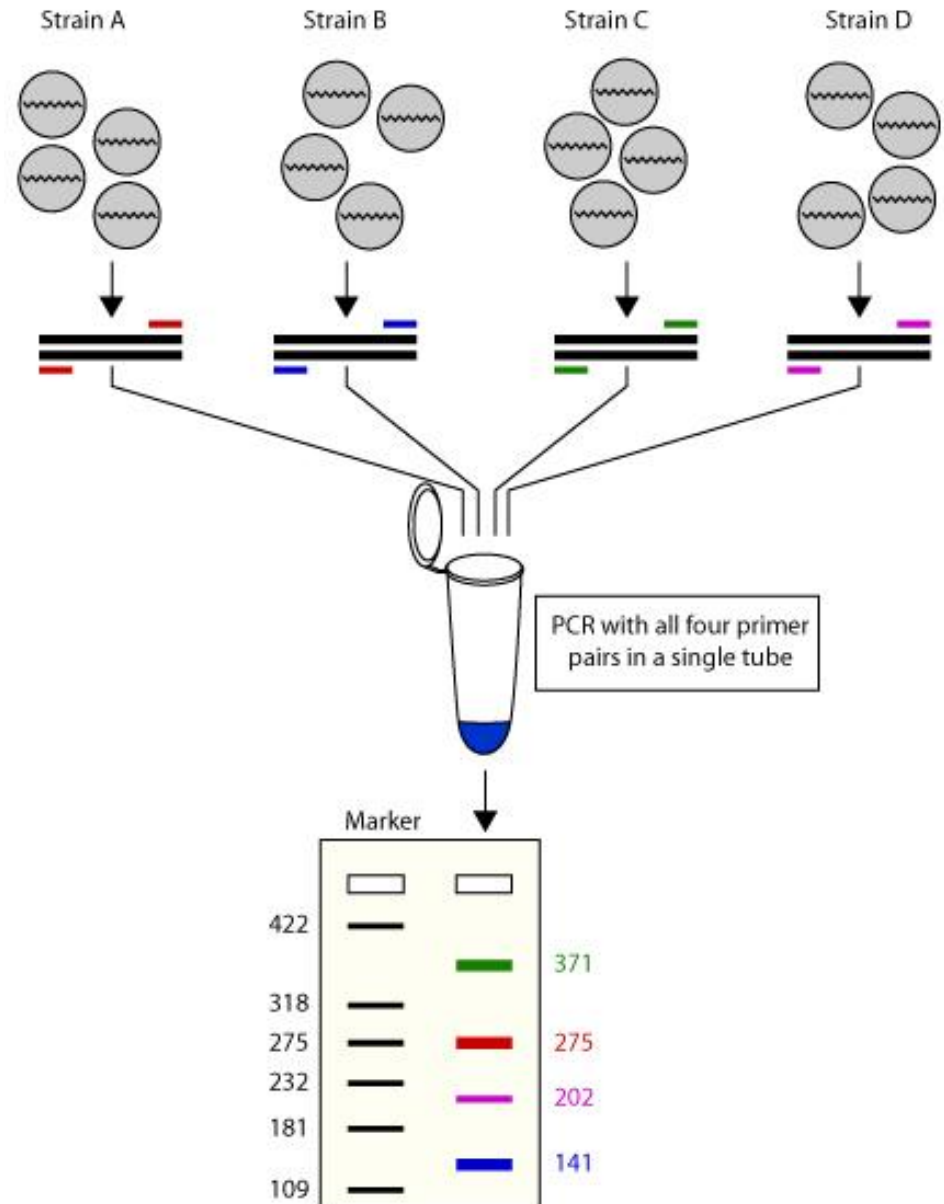


Fig. 2. Comparison of the sensitivity of IC-RT-PCR and IC-RT-nested PCR in a single closed tube using ten-fold serial dilutions of an extract of Washington Navel sweet orange prepared in an extract from healthy sweet orange. The molecular weight of the amplicons (131 bp) was the same in both PCR variants because RT-PCR was performed using primers (PIN1, PIN2) internal to PEX1 and PEX2 used in the first round of amplification.



PCR multiplex

- ✓ Amplificação simultânea de múltiplos alvos na mesma reação – múltiplos patógenos na mesma planta – redução de custo
- ✓ Verificar compatibilidade entre iniciadores – teste *in silico* e experimental

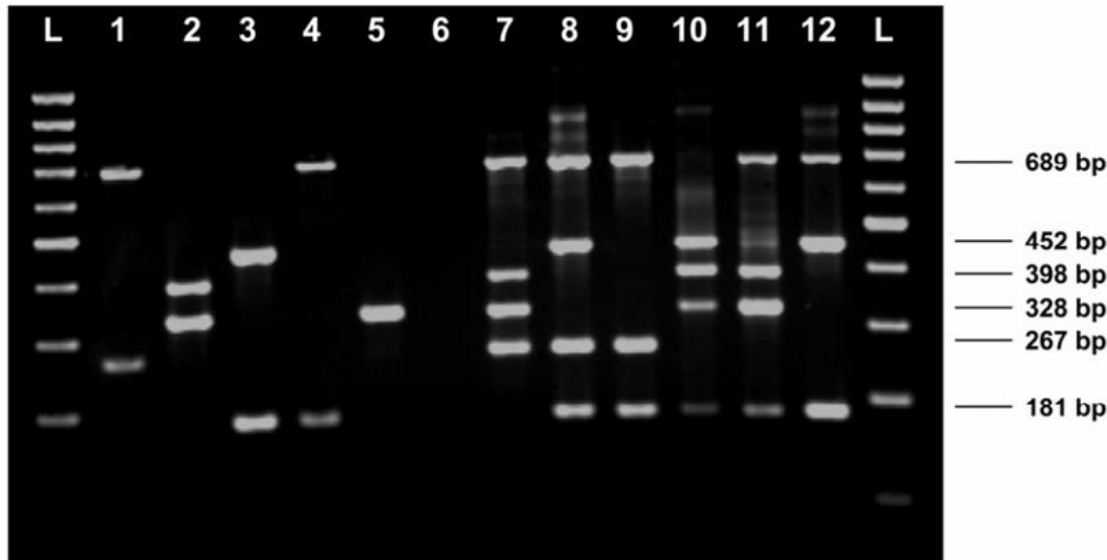


PCR multiplex

A Multiplex PCR Assay to Characterize *Potato virus Y* Isolates and Identify Strain Mixtures

Lorenzen et al. (2006)

- Vírus do mosaico da batata (PVY)
- PVY^{NTN} (3) - anéis necróticos nos tubérculos

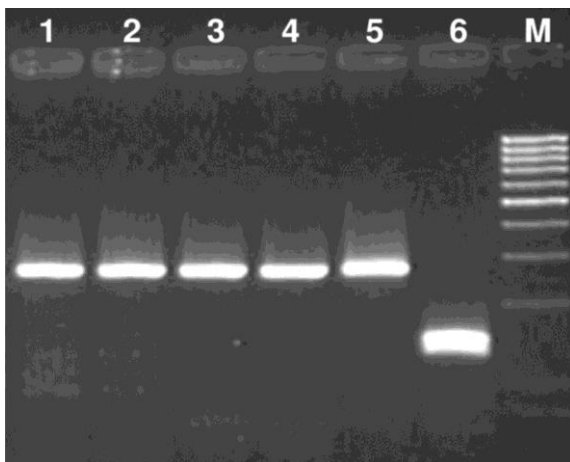


(Antônio Carlos de Ávila)

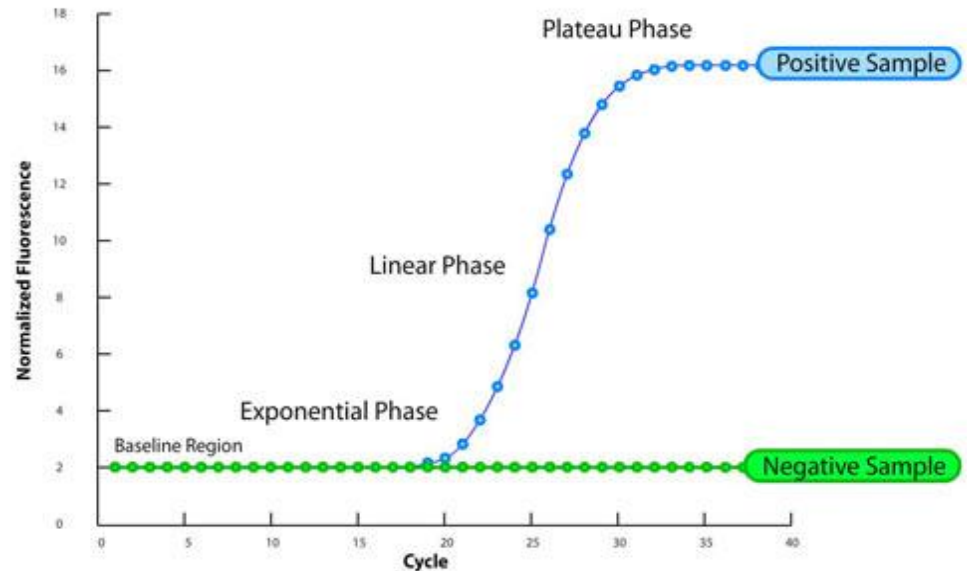
Fig. 2. Separation of polymerase chain reaction (PCR) products produced by the *Potato virus Y* (PVY) strain types detected by this assay and artificial mixtures of the above strain types. From left to right: L = 100-bp molecular size ladder, 1 = PVY^O, 2 = PVY^N, 3 = PVY^{NTN}, 4 = PVY^{N:O}, 5 = NA-PVY^{NNTN}, 6 = negative control, 7 = PVY^O + PVY^N, 8 = PVY^O + PVY^{NTN}, 9 = PVY^O + PVY^{N:O}, 10 = PVY^N + PVY^{NTN}, 11 = PVY^N + PVY^{N:O}, 12 = PVY^{NTN} + PVY^{N:O}, L = 100-bp molecular size ladder.

PCR quantitativa (qPCR)

- ✓ Amplificação simultânea de múltiplos alvos na mesma reação – vários patógenos em um único hospedeiro
- ✓ Permite a quantificação do patógeno e o monitoramento da reação em andamento
- ✓ Verificar compatibilidade entre iniciadores – teste *in silico* e experimental
- ✓ > rapidez, especificidade e confiança
- ✓ Sistema fechado, < risco de contaminação cruzada
- ✓ > sensibilidade, < concentração de reagentes na reação
- ✓ Resultado direto em 1,5h de reação – elimina eletroforese



VS



PCR quantitativa (qPCR)

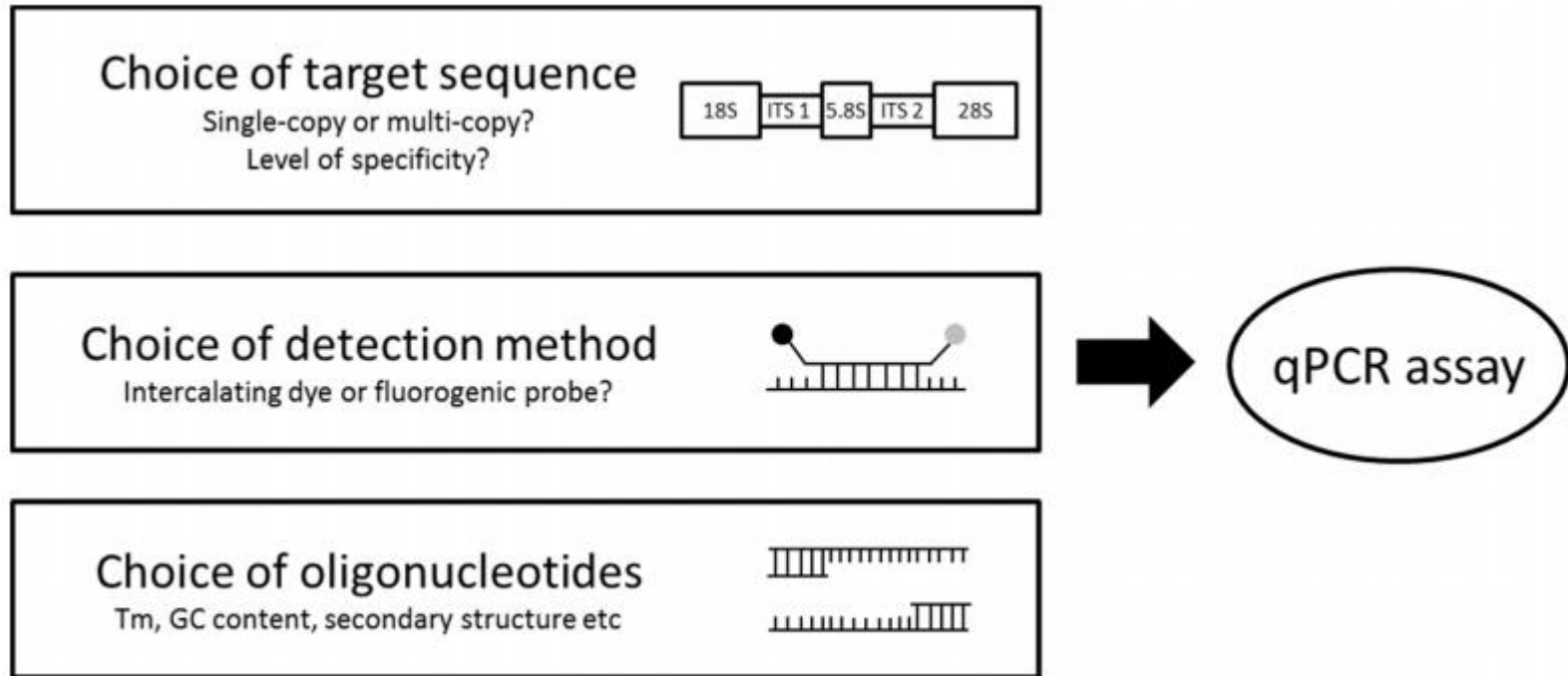
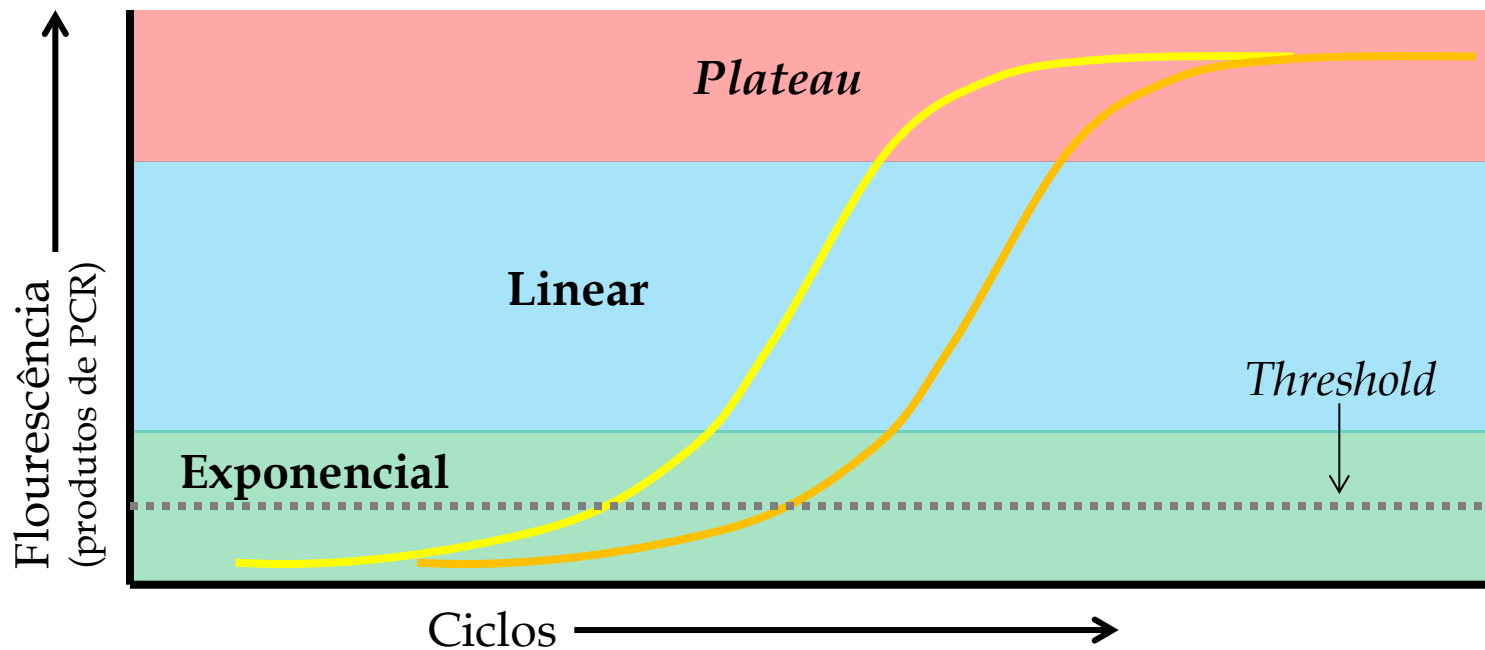


Figure 1. The three initial steps in the development of a diagnostic real-time PCR assay.

Almqvist (2016)

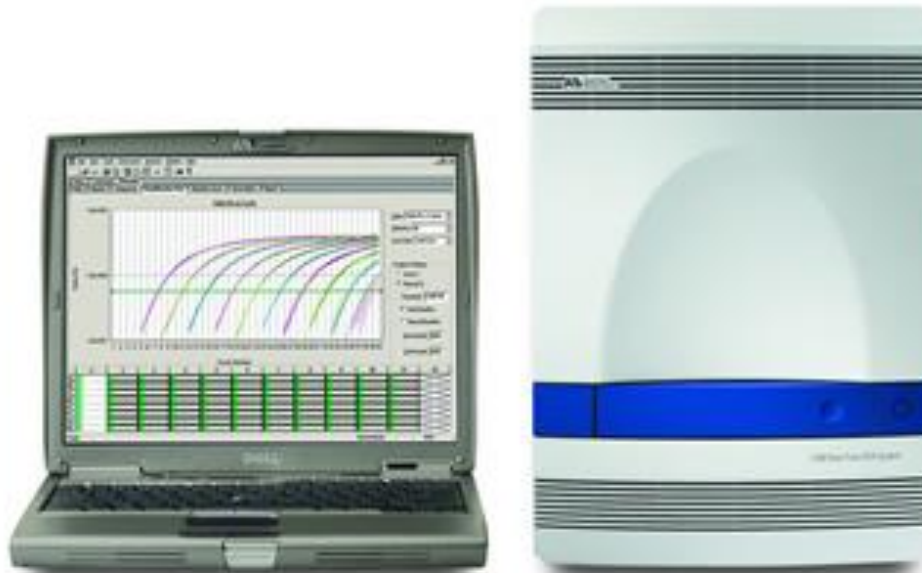
PCR quantitativa (qPCR)

- Fases exponencial, linear ou logarítmica e *plateau*
- Threshold
 - *Cycle threshold* (C_T)



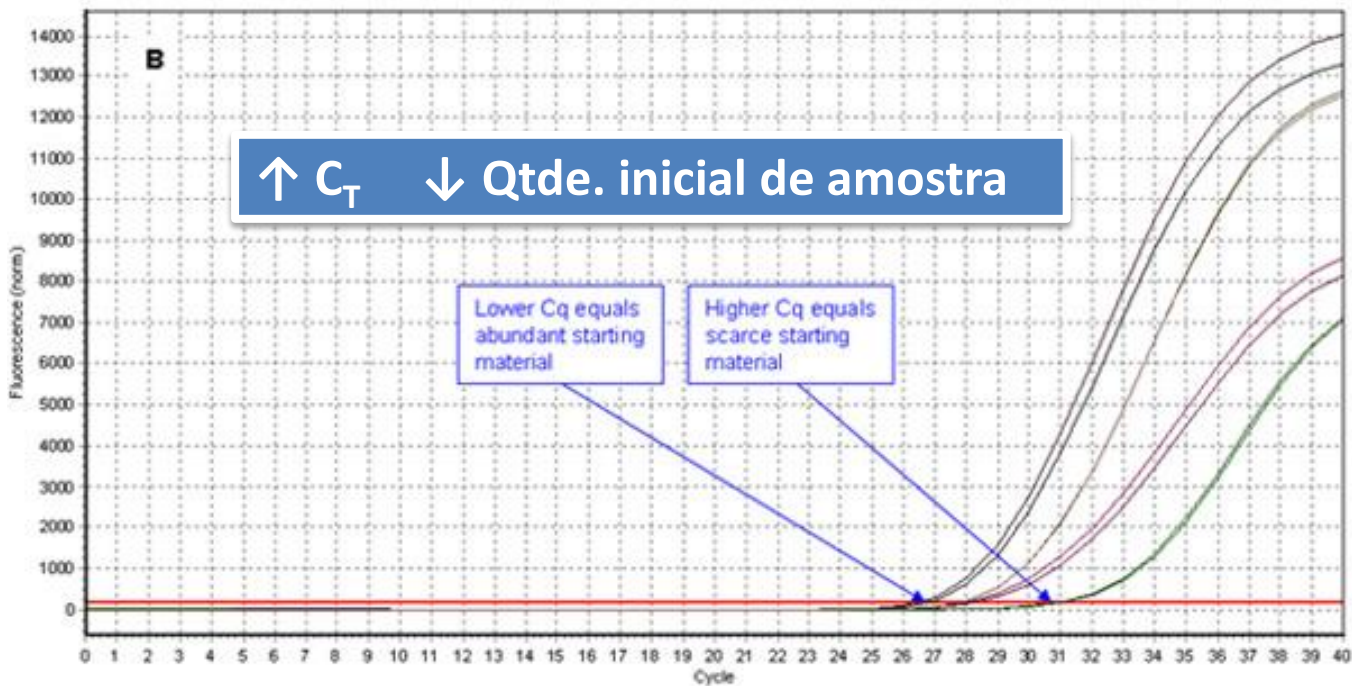
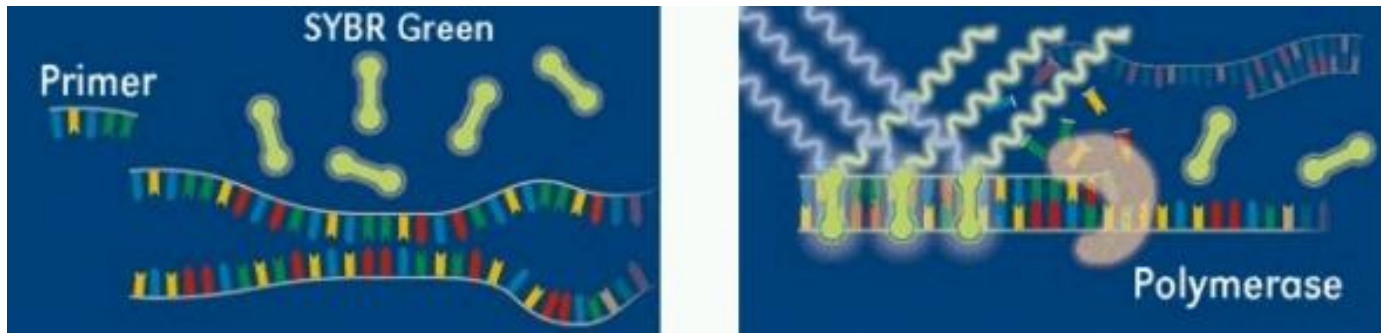
PCR quantitativa (qPCR)

7500 Real-Time PCR System – termociclador – Life Technologies/Thermo Fisher



PCR quantitativa (qPCR)

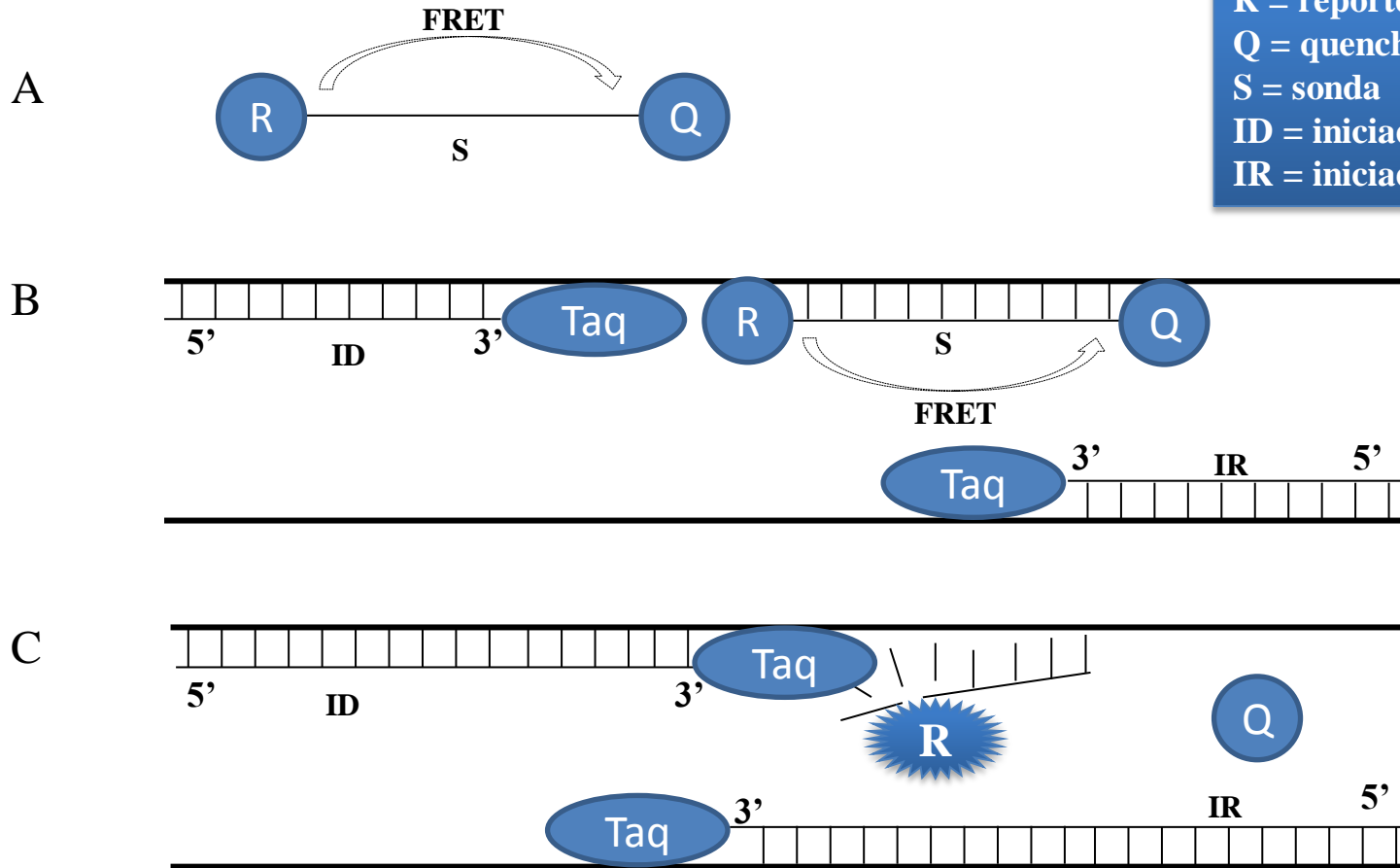
SYBR Green



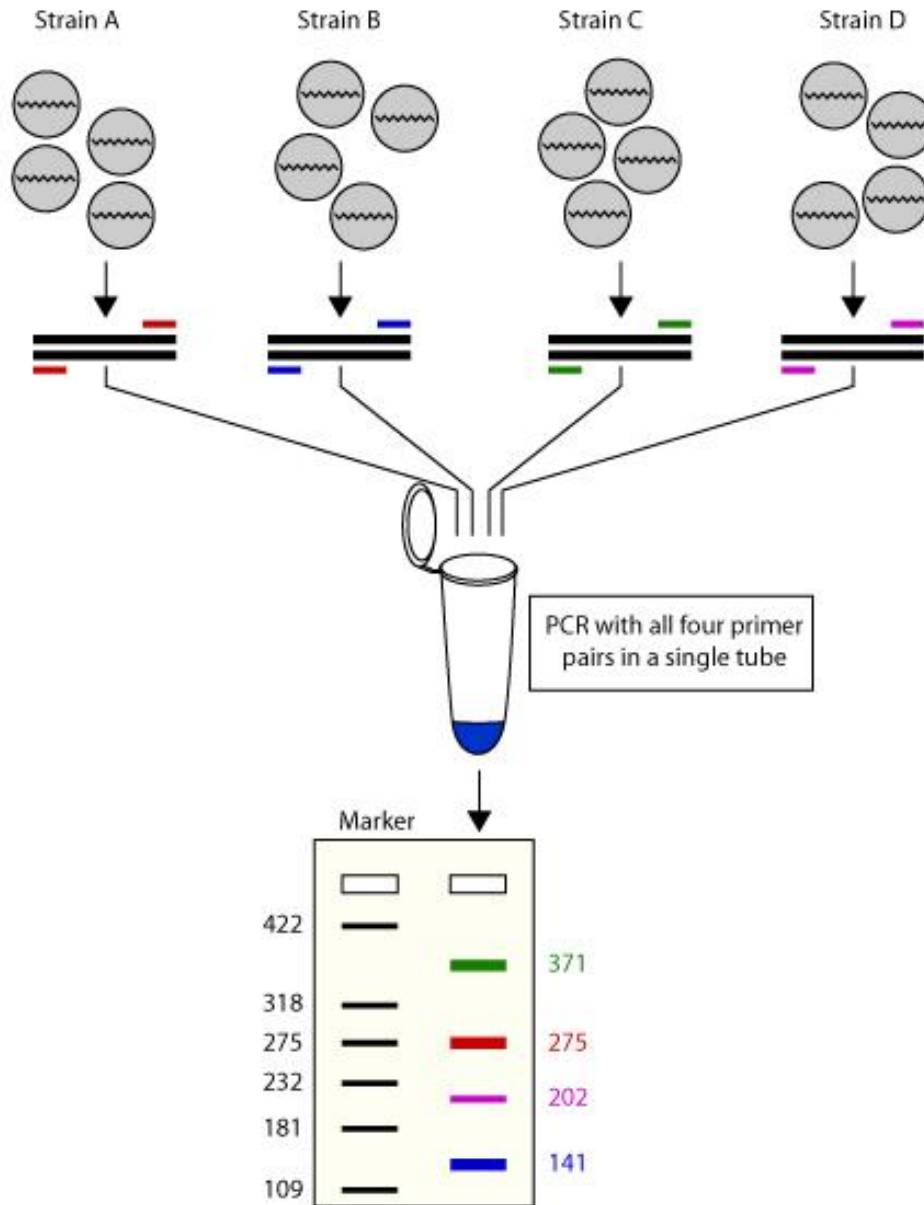
PCR quantitativa (qPCR)

Taqman

R = reporter
Q = quencher
S = sonda
ID = iniciador direto
IR = iniciador reverso



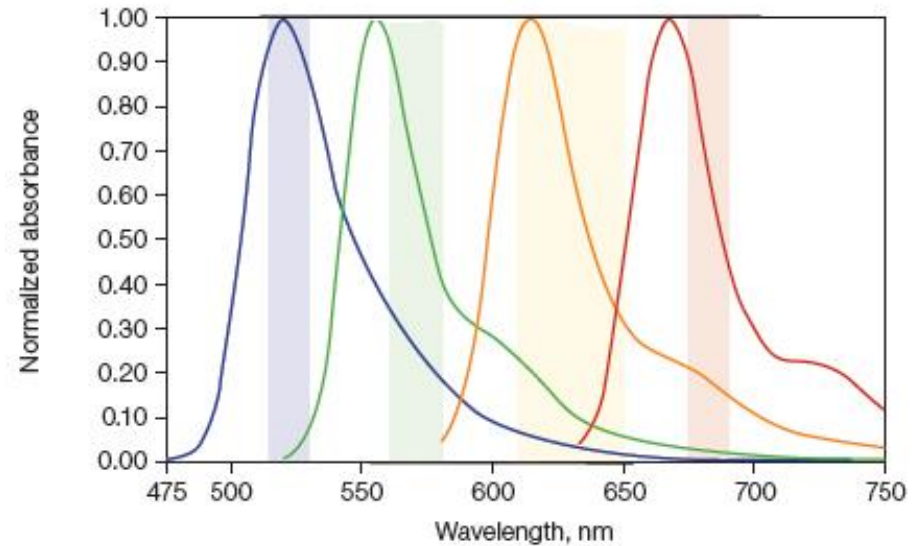
PCR quantitativa (qPCR)



Taqman - multiplex

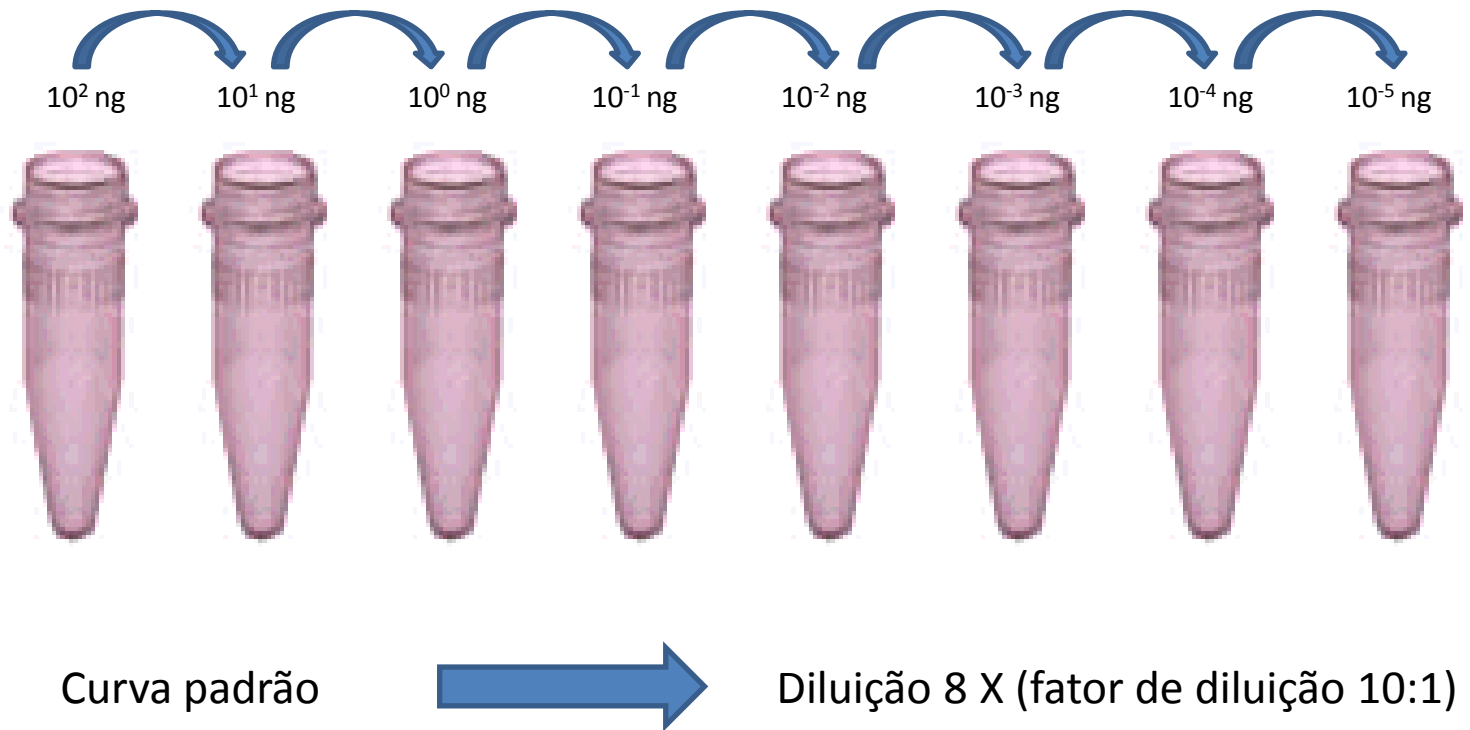
Detection

Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4
515–530	560–580	610–650	675–690
FAM	HEX	Texas Red	Cy5



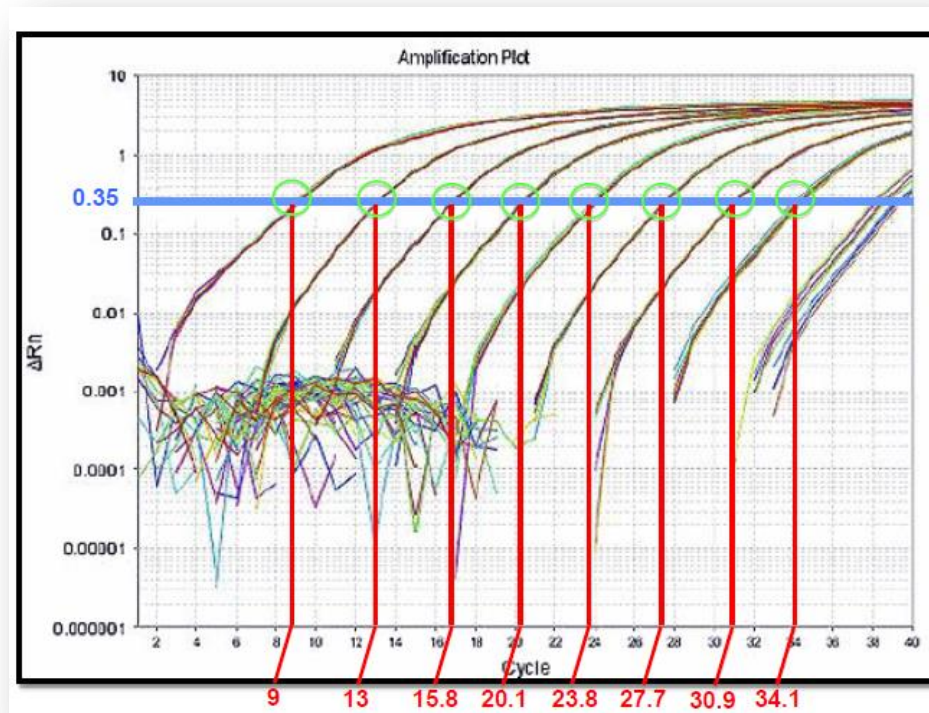
PCR quantitativa (qPCR)

- Quantificação – curva padrão – diluição seriada



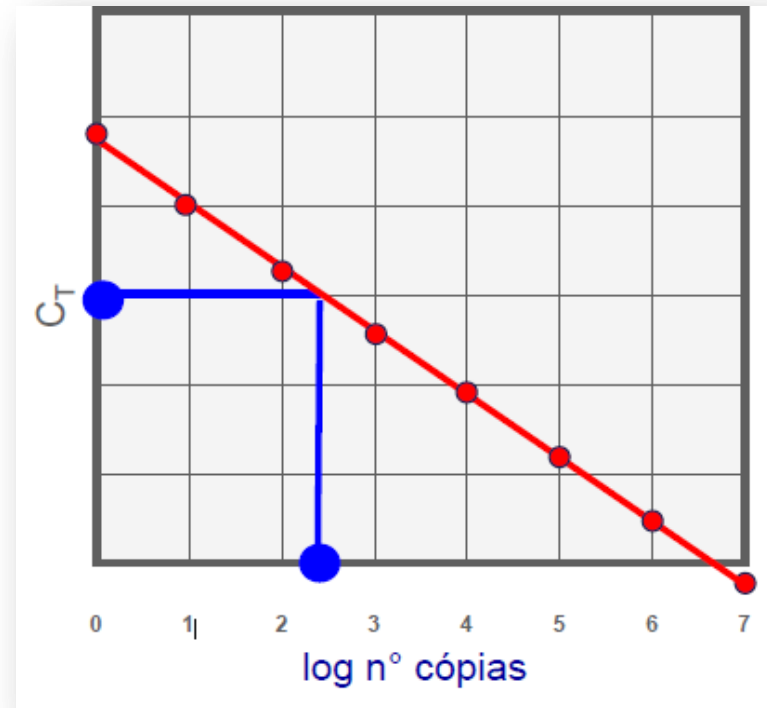
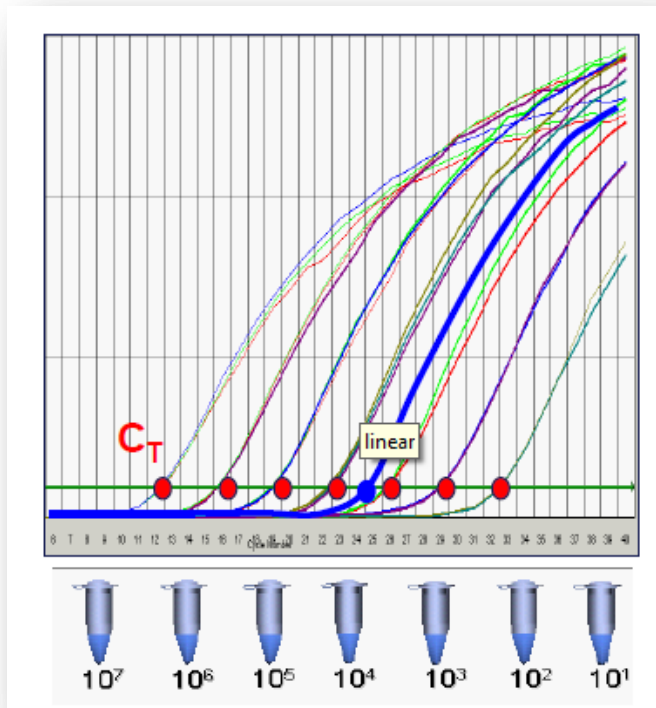
PCR quantitativa (qPCR)

- Quantificação – curva padrão – diluição seriada
 - *Cycle Threshold* (C_T) x quantidade de DNA do alvo



PCR quantitativa (qPCR)

- Quantificação – curva padrão – diluição seriada
 - *Cycle Threshold* (C_T) x quantidade de DNA do alvo



PCR quantitativa (qPCR)

- ✓ **Detecção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja – Auxílio FAPESP - 2013-2015 – Prof. Dr. Nelson S. Massola Jr**
- ✓ Semente de soja – veículo de disseminação de doenças (fungos, bactérias, vírus e nematoides)
- ✓ Sementes sadias
- ✓ Detecção precisa
- ✓ Exclusão



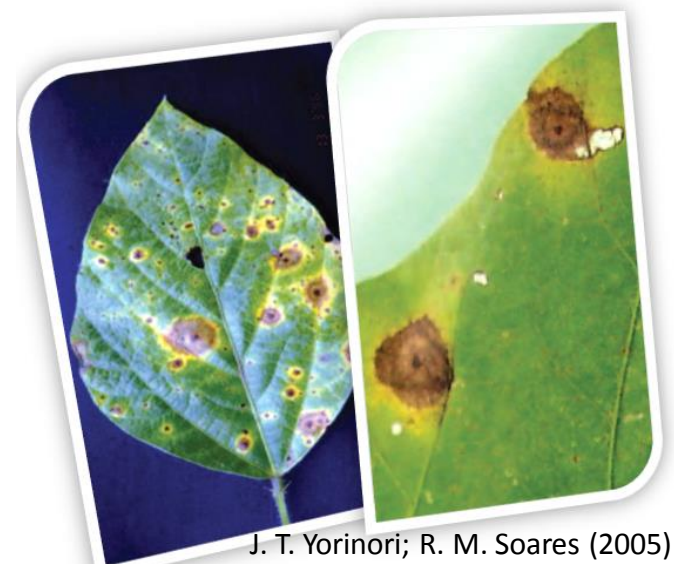
Fungos patogênicos associados às sementes de soja

☐ *Colletotrichum truncatum*

☐ *Corynespora cassiicola*

☐ *Phomopsis* spp.

☐ *Sclerotinia sclerotiorum*

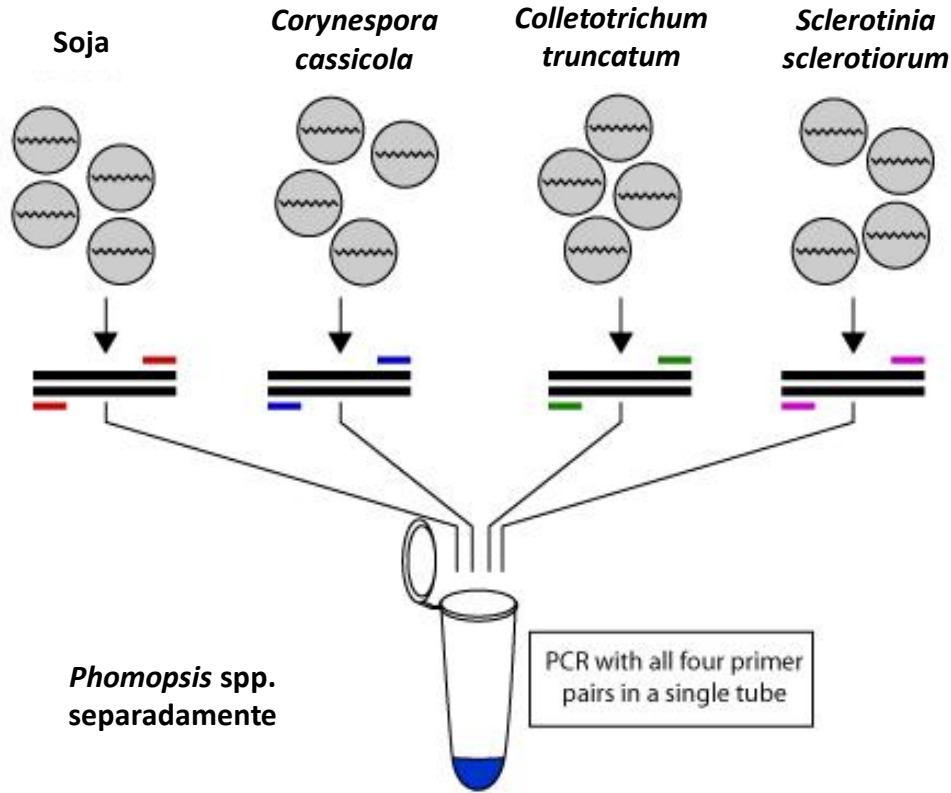


Riccioni & Petrović



Jaccoud Filho (2010)

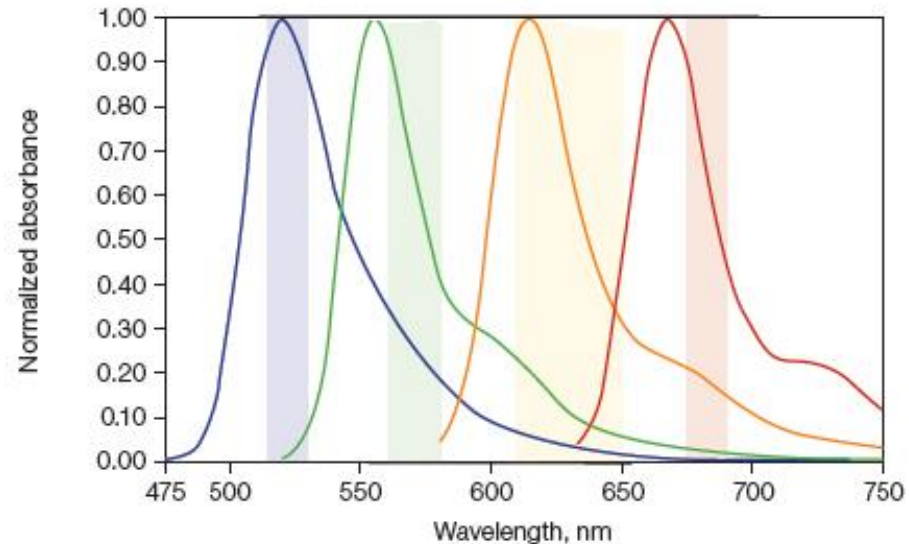
PCR quantitativa (qPCR)



- ✓ Anelamento: 60°C
- ✓ 45 ciclos
- ✓ iniciadores (*primers*) específicos

Detection

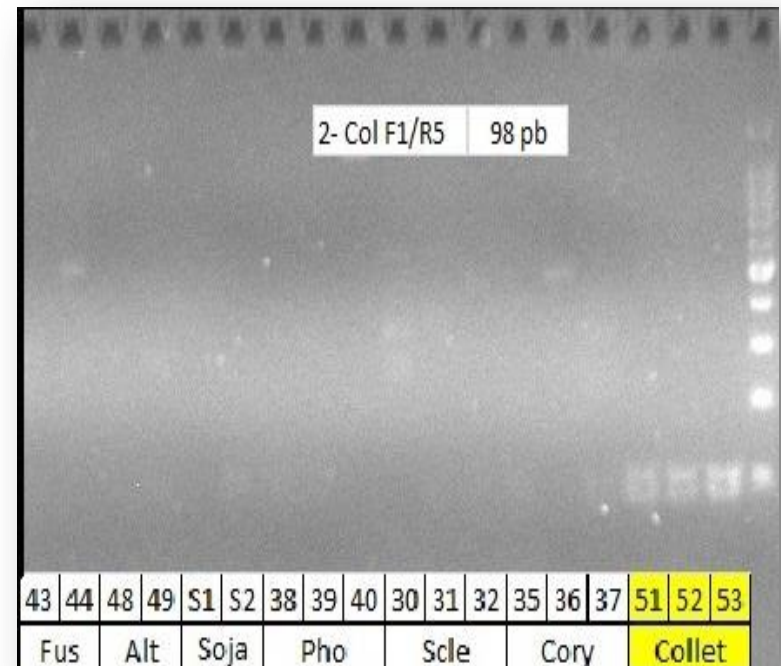
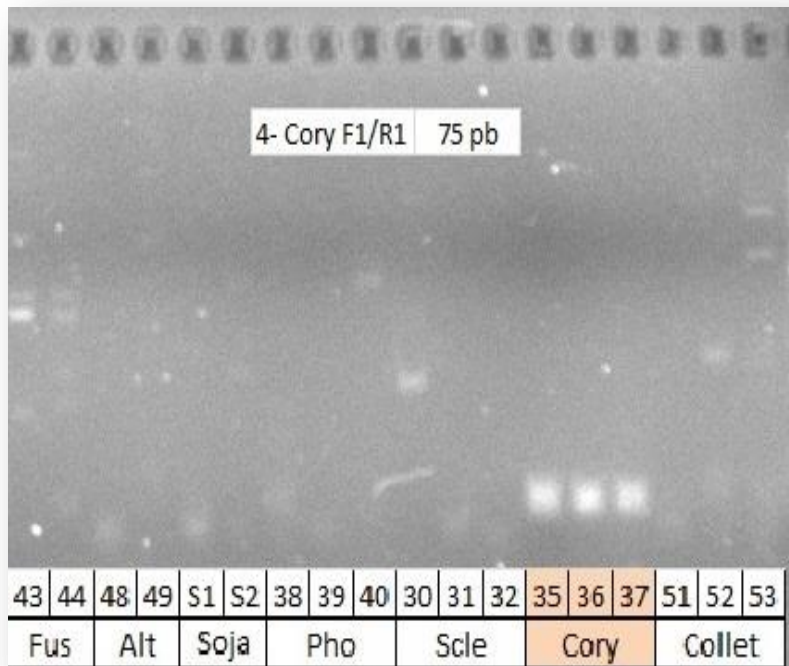
Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4
515–530	560–580	610–650	675–690
FAM	HEX	Texas Red	Cy5



Ciampi-Guillardi et al. (dados não-publicados)

PCR quantitativa (qPCR)

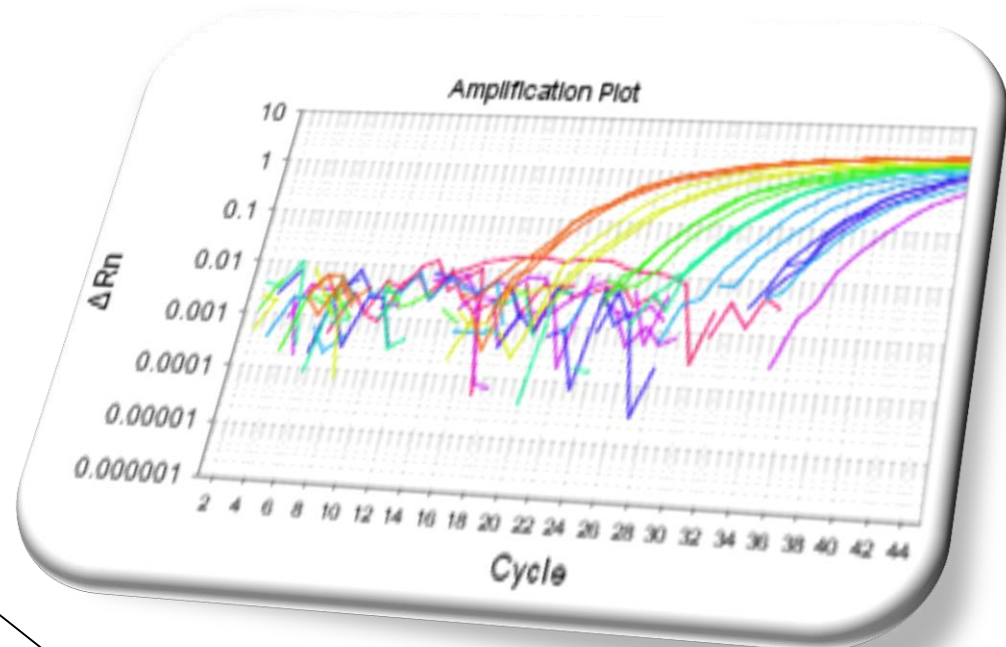
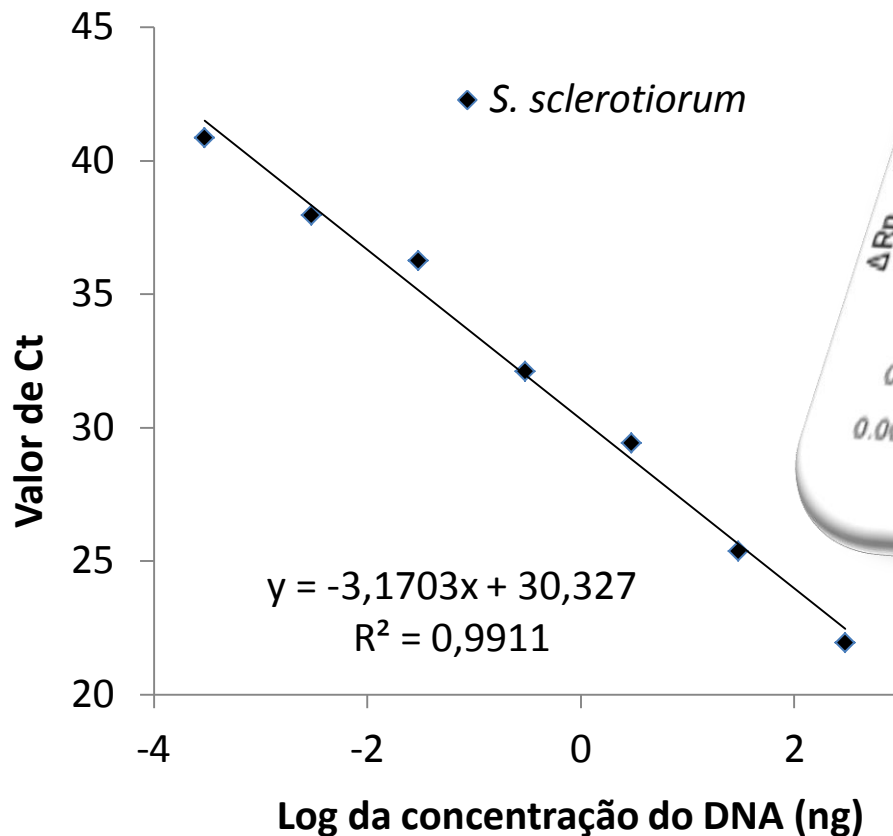
Avaliação da especificidade dos iniciadores e sondas – PCR convencional



Ciampi-Guillardi et al. (dados não-publicados)

PCR quantitativa (qPCR)

Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas



Ramiro (2015)

PCR quantitativa (qPCR)

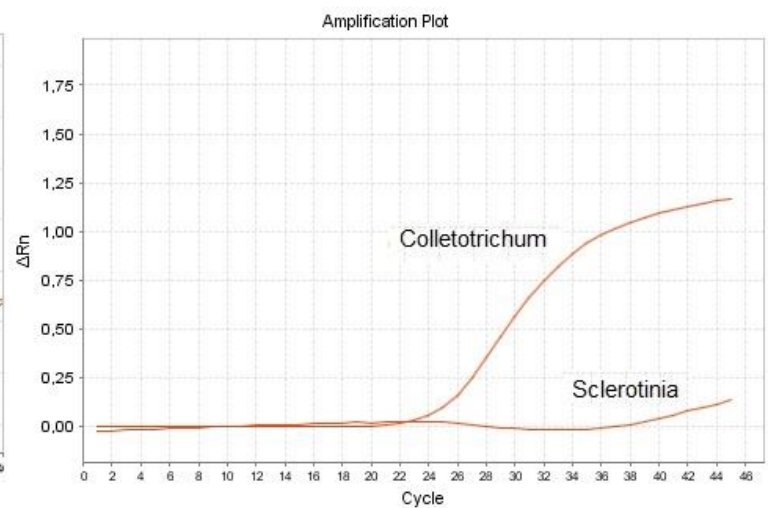
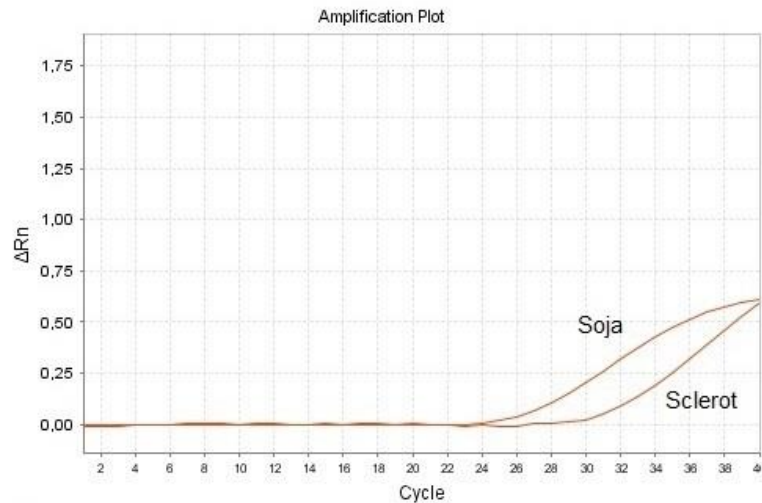
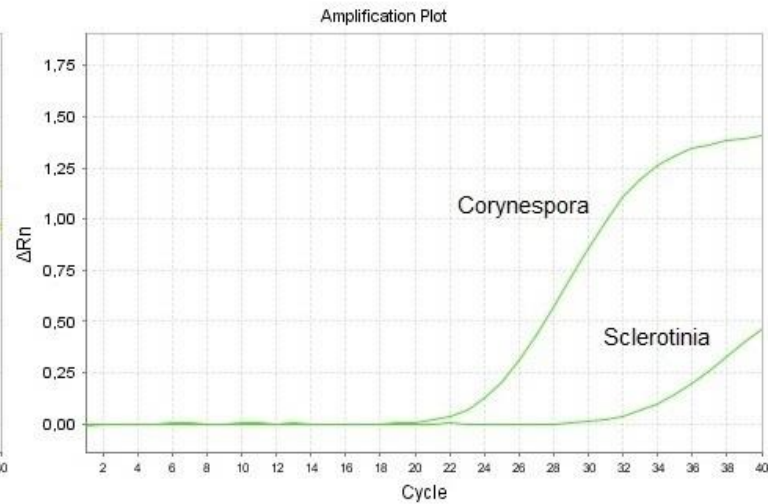
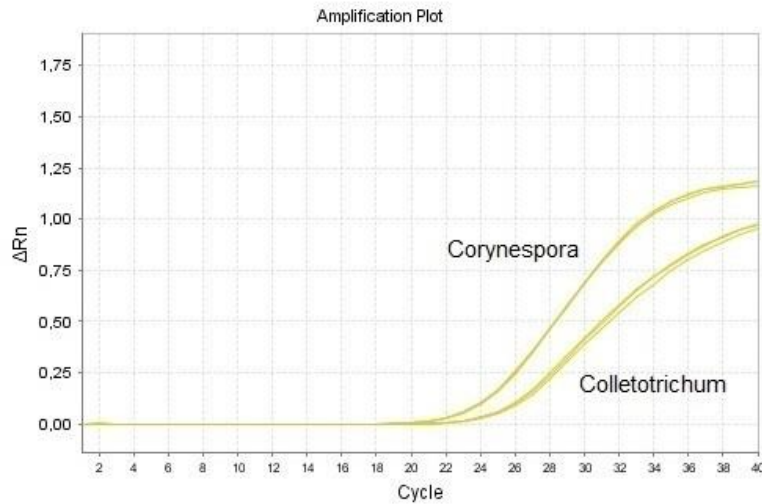
Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas

Quantidade inicial de DNA	Valores de C _T ^a			
	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Corynespora cassicola</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
3 x 10 ² ng (300 ng)	16,47±0,26	18,63 ± 0,30	20,86 ± 0,20	27,27 ± 1,67
3 x 10 ¹ ng (30ng)	20,86±0,23	21,48 ± 0,09	24,10 ± 0,12	28,49 ± 0,31
3 x 10 ⁰ ng (3ng)	24,24±0,34	27,74 ± 0,69	27,53 ± 0,03	31,39 ± 0,50
3 x 10 ⁻¹ ng (300 pg)	29,43±0,09	27,24 ± 0,17	30,81 ± 0,02	34,82 ± 0,09
3 x 10 ⁻² ng (30 pg)	33,88±0,18	30,90 ± 0,18	34,67 ± 0,23	38,86 ± 0,24
3 x 10 ⁻³ ng (3 pg)	39,43±0,06	35,58 ± 1,20	37,69 ± 0,31	42,00 ± 0,91
3 x 10 ⁻⁴ ng (300 fg)	42,82± 0,10	38,26 ± 0,53	0	0

Ciampi-Guillardi et al. (dados não-publicados)

PCR quantitativa (qPCR)

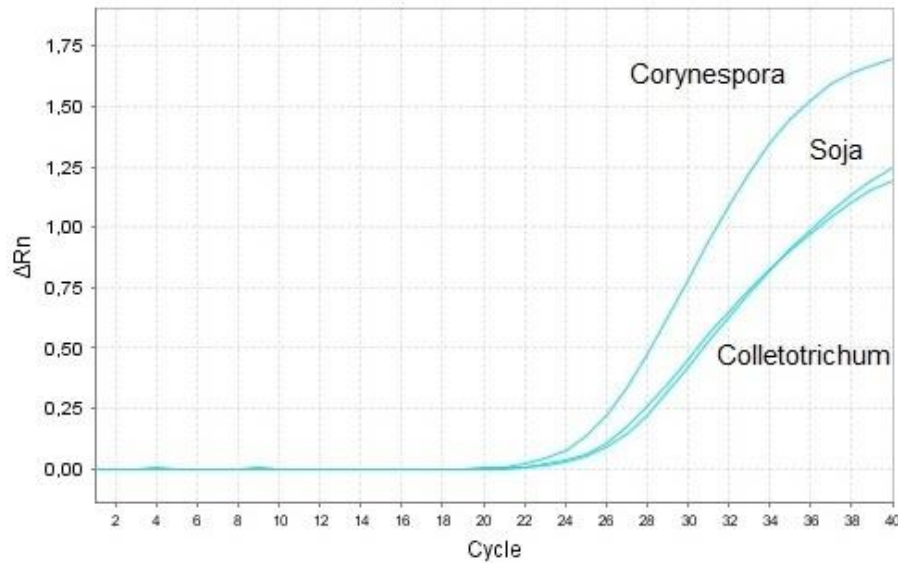
- ✓ Detecção por qPCR duplex – Taqman – sondas fluorescentes



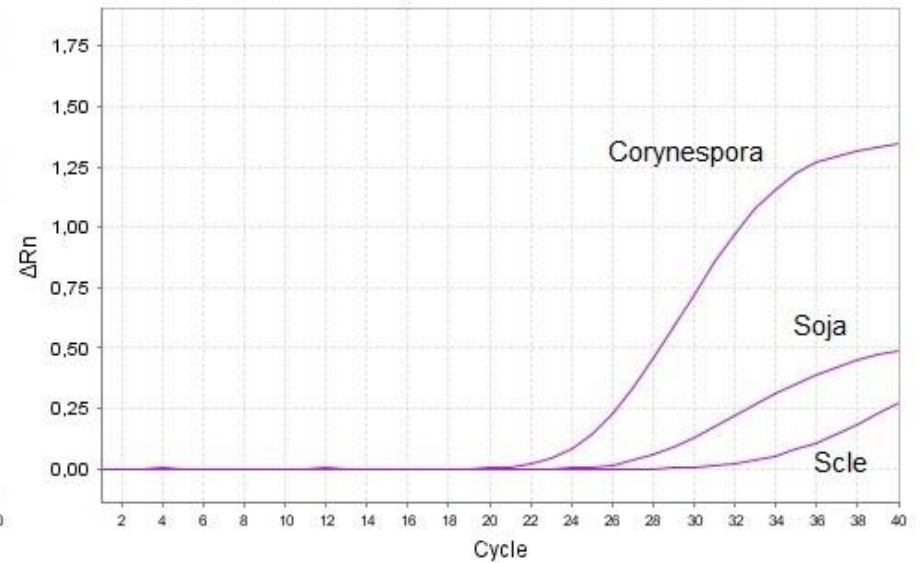
PCR quantitativa (qPCR)

- ✓ Detecção por qPCR triplex – Taqman – sondas fluorescentes

Amplification Plot

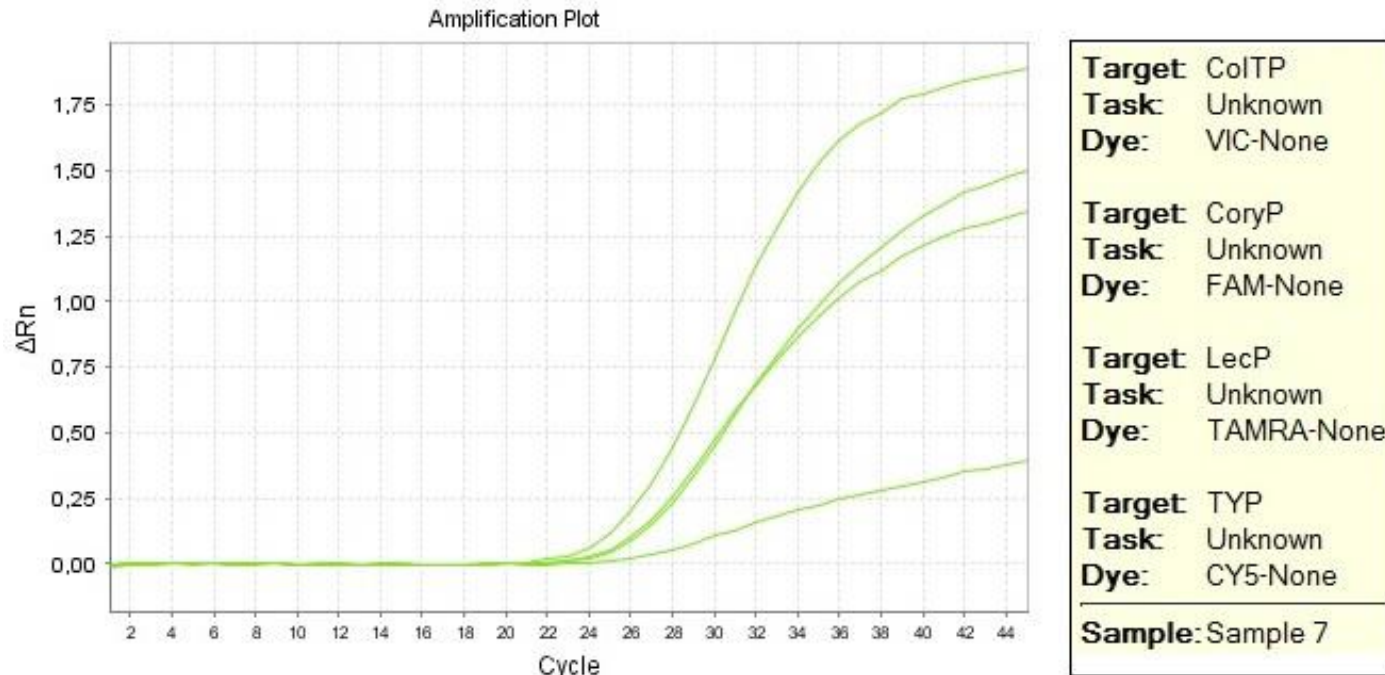


Amplification Plot



PCR quantitativa (qPCR)

- ✓ Detecção por qPCR tetraplex – Taqman – sondas fluorescentes



Ciampi-Guillard et al. (dados não-publicados)

PCR quantitativa (qPCR)

Avaliação da sensibilidade do método de detecção

- ❑ Diluições das sementes (sementes inoculadas: sementes saudias) nas seguintes proporções:

1 : 399 (0,25%)

1 : 799 (0,125%)

1 : 1599 (0,0625%)

Embebição de sementes em água ultrapura



100 mL de água ultrapura : 100 sementes

PCR quantitativa (qPCR)

Avaliação da sensibilidade do método de detecção

✓ Detecção por qPCR tetraplex – Taqman – sondas fluorescentes

Incidência de sementes artificialmente inoculadas	Sementes artificialmente inoculadas /total de sementes	Valores de C _T ^a			
		<i>Phomopsis</i>	<i>Corynespora</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Sclerotinia</i>
100%	400/400	32,36 ± 0,02	31,39 ± 0,25	29,58 ± 0,16	33,99 ± 0,09
0,25%	1/400	38,70 ± 0,09	32,60 ± 1,04	33,86 ± 0,22	36,38 ± 0,41
0,125%	1/800	37,92 ± 0,47	35,08 ± 0,15	36,99 ± 0,61	38,75 ± 0,47
0,0625%	1/1600	41,45 ± 0,50	38,27 ± 0,54	40,12 ± 0,92	41,12 ± 0,81
0	0/400	0	0	0	0

^a Dados representam a quantidade de DNA detectada em amostras (alíquotas) de 3µL retirada da solução de embebição de sementes em água em cada nível de incidência

Ciampi-Guillardi et al. (dados não-publicados)

PCR quantitativa (qPCR)

Validação do método de detecção molecular por qPCR

15 amostras (Goiás, Minas Gerais e Paraná)

400 sementes para:

- *Blotter test*
- Ágar-azul de bromofenol
- Embebição para qPCR



Ramiro (2015)

PCR quantitativa (qPCR)

Avaliação da sensibilidade do método de detecção: qPCR x método tradicional

☐ *Blotter test*

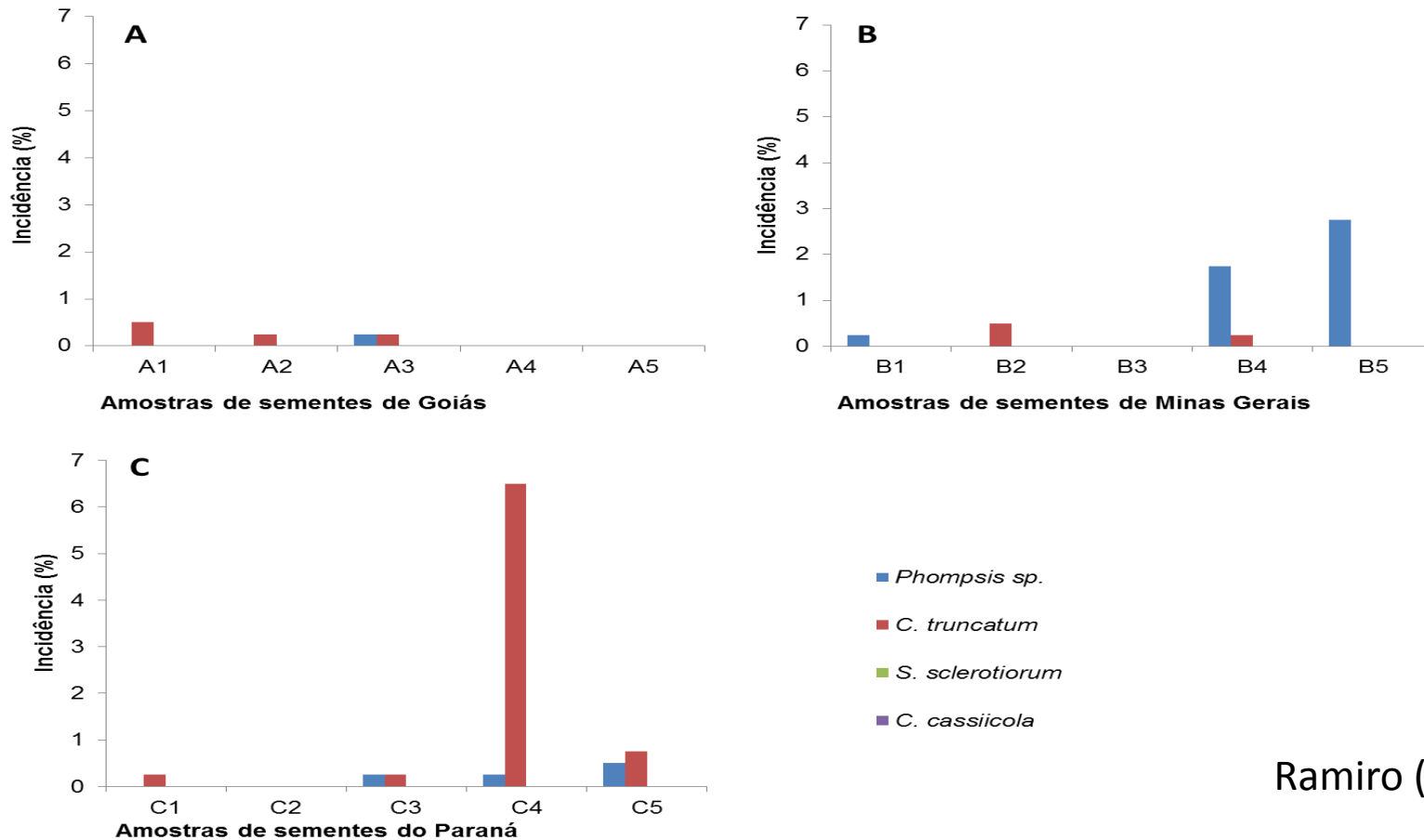
☐ Ágar-azul de bromofenol



Ramiro (2015)

PCR quantitativa (qPCR)

Avaliação da sensibilidade do método de detecção: método tradicional



Ramiro (2015)

Figura 3 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp., *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola* e *Sclerotinia sclerotiorum* em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), reveladas por meio do *blotter test* e meio NEON

PCR quantitativa (qPCR)

Avaliação da sensibilidade do método de detecção: método tradicional

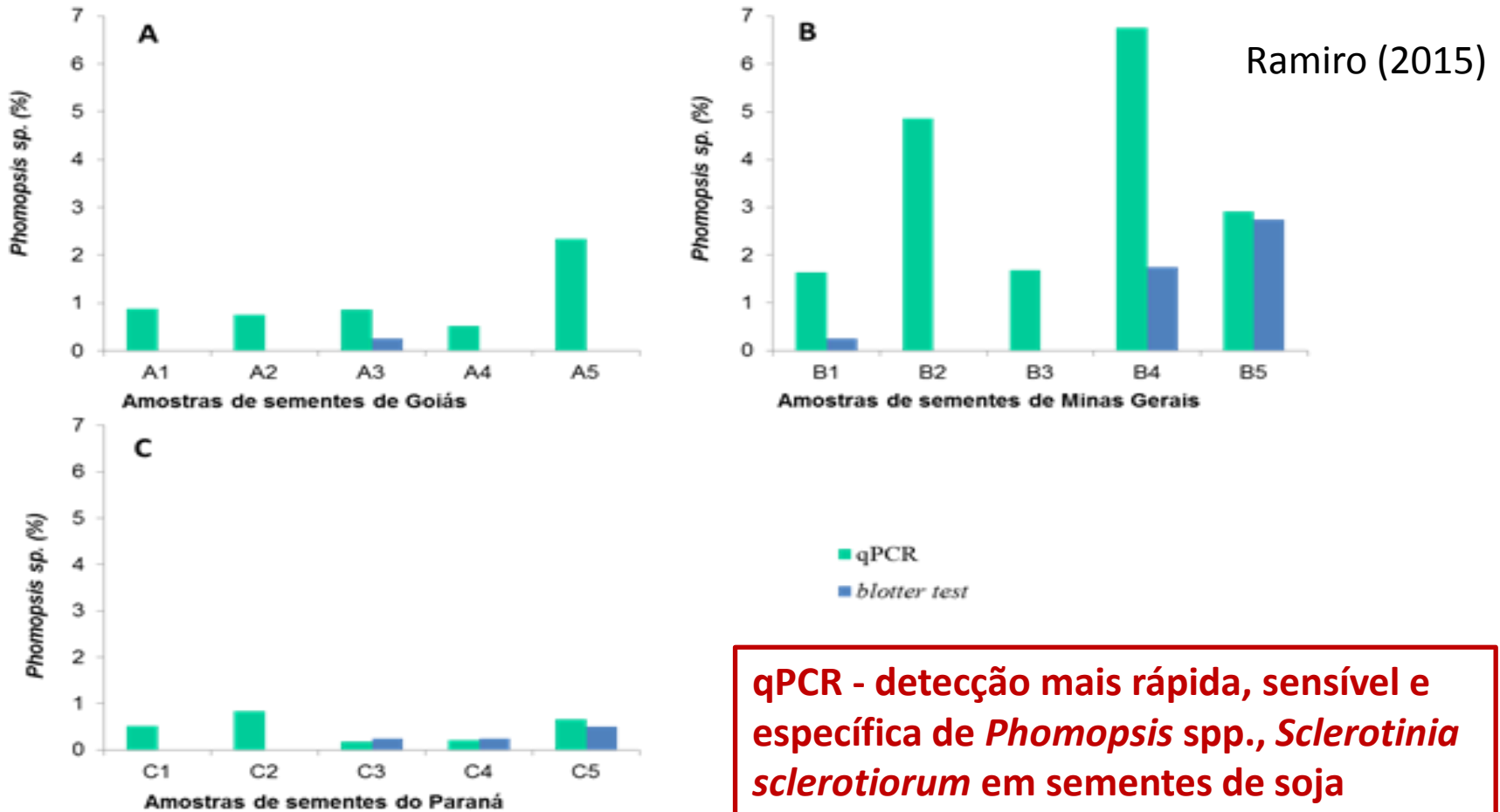
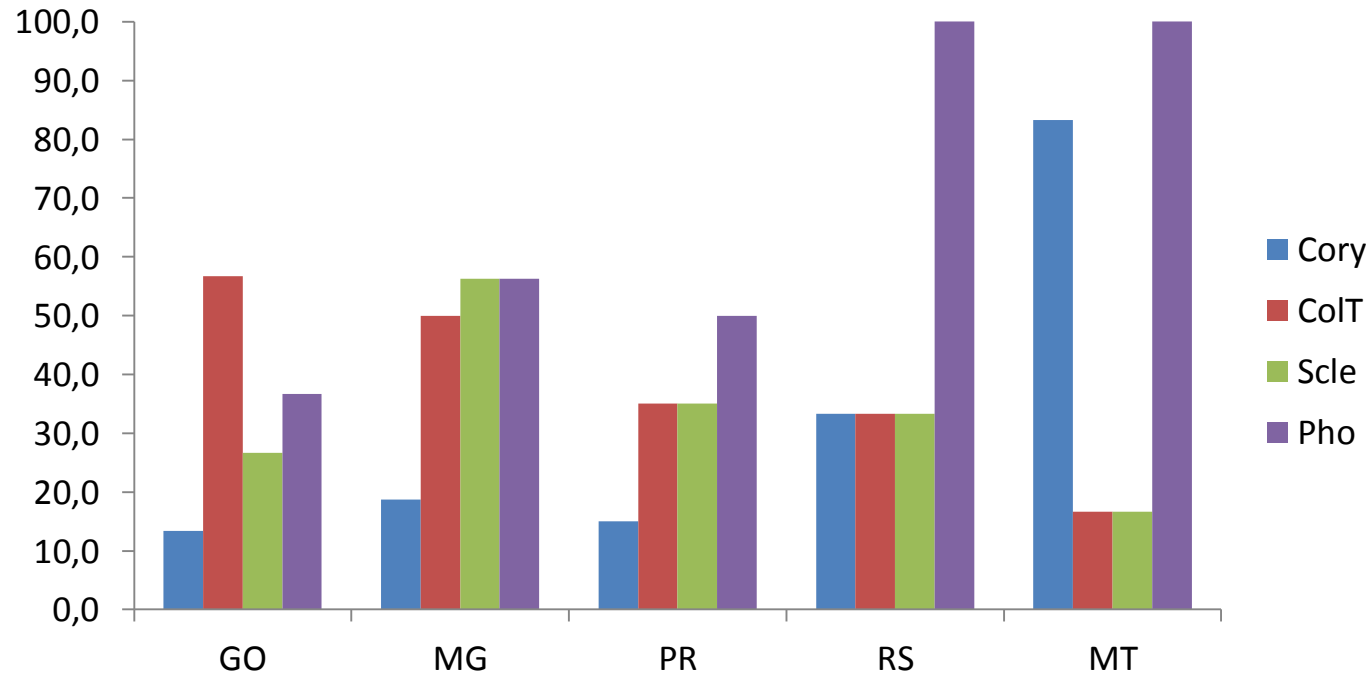


Figura 4 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp. em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), avaliadas por dois métodos de detecção, qPCR e *blotter test*

PCR quantitativa (qPCR)

Detecção molecular por qPCR: incidência em 81 amostras de 5 estados do BR



PCR quantitativa (qPCR)

- ✓ *Huanglongbing* (HLB) – greening
- ✓ Uma das doenças mais destrutivas dos citros – perdas de até 100%
- ✓ 3 espécies de bactérias: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *C. L. africanus* e *C. L. americanus*
- ✓ Transmissão por psilídeo – *Diaphorina citri* e/ou *Trioza erytreae*
- ✓ Difícil de detectar – longo período de latência (6-12 meses), distribuição não homogênea na planta

Tabela 1: Resultado de mudas positivas para HLB por análise com qPCR

Nº de plantas positivas por qPCR (%)						
1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês	5º Mês	6º Mês	7º Mês
5 (8,33%)	21 (35,00%)	29 (48,33%)	44 (73,33%)	52 (86,67%)	54 (90,00%)	54 (90,00%)

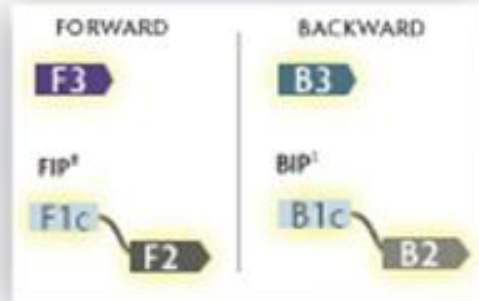
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

- ✓ Amplificação por fotometria – turbidez da solução – T°C constante (60 - 65 °C)
- ✓ SYBR Green – alteração na coloração da solução – diagnóstico visual
- ✓ Amplificação eficiente e precisa + baixo custo – detecção de doenças

Target RNA or DNA



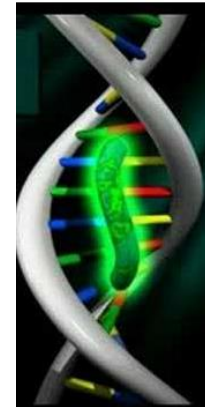
4 Key Primers[†]



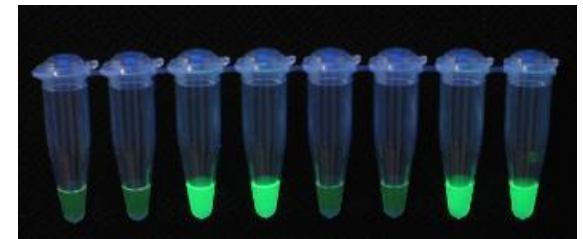
OmniAmp™



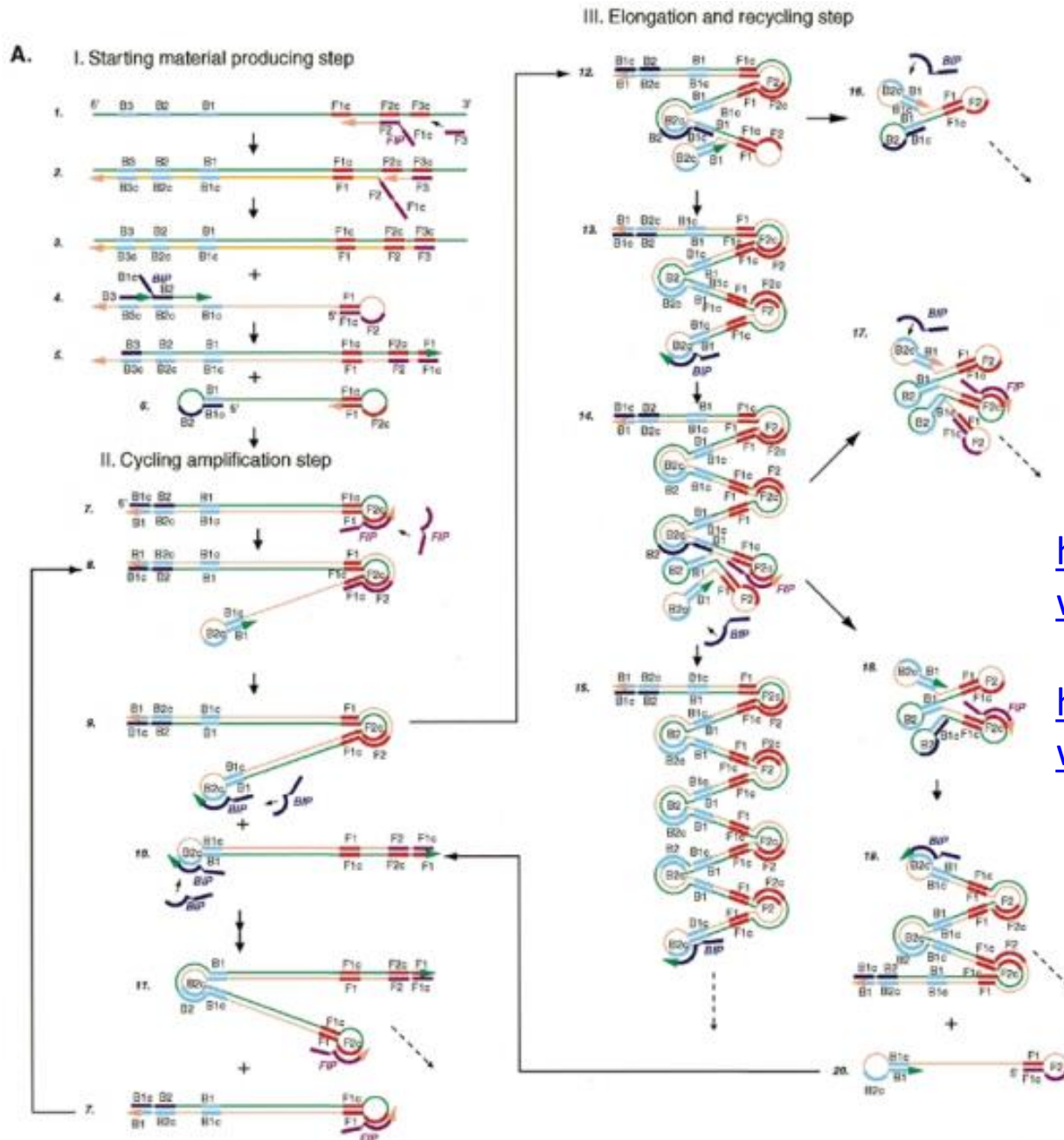
polimerase



Target DNA Detail: Key primer sequences highlighted.



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)



Notomi et al.
(2000)

https://www.youtube.com/watch?v=RkSql_mB-8E

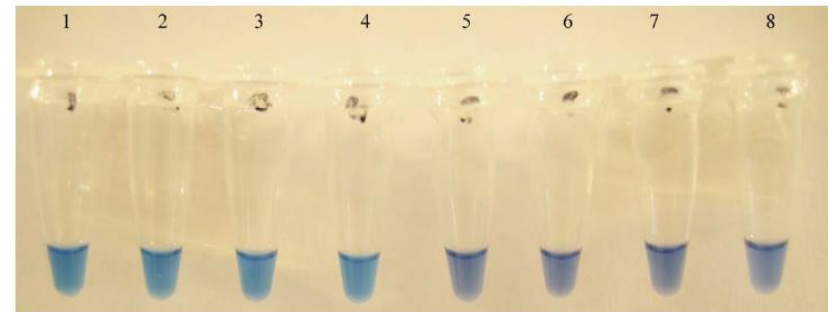
<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella fastidiosa* for Quarantine and Field Applications

S. J. Harper, L. I. Ward, and G. R. G. Clover

- Mal de Pierce da videira
- CVC ou amarelinho dos citros
- Pragas quarentenárias A2



Source of material	Extraction method	Test	
		LAMP	Real-time PCR ^a
<i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon	DNeasy	+	20.86 ± 0.01
	PickPen w/Invimag Kit	+	28.45 ± 0.11
	Sigma Extract n' Amp	-	...
<i>V. rotundifolia</i>	DNeasy	+	24.54 ± 0.18
	PickPen w/Invimag Kit	+	30.19 ± 0.03
	Sigma Extract n' Amp	-	...
<i>Quercus rubra</i>	DNeasy	+	17.82 ± 0.29
	PickPen w/Invimag Kit	+	22.39 ± 0.22
	Sigma Extract n' Amp	-	...

^a Real-time PCR results with a crossing threshold value of >38 cycles were considered negative.

ORIGINAL ARTICLE

Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*

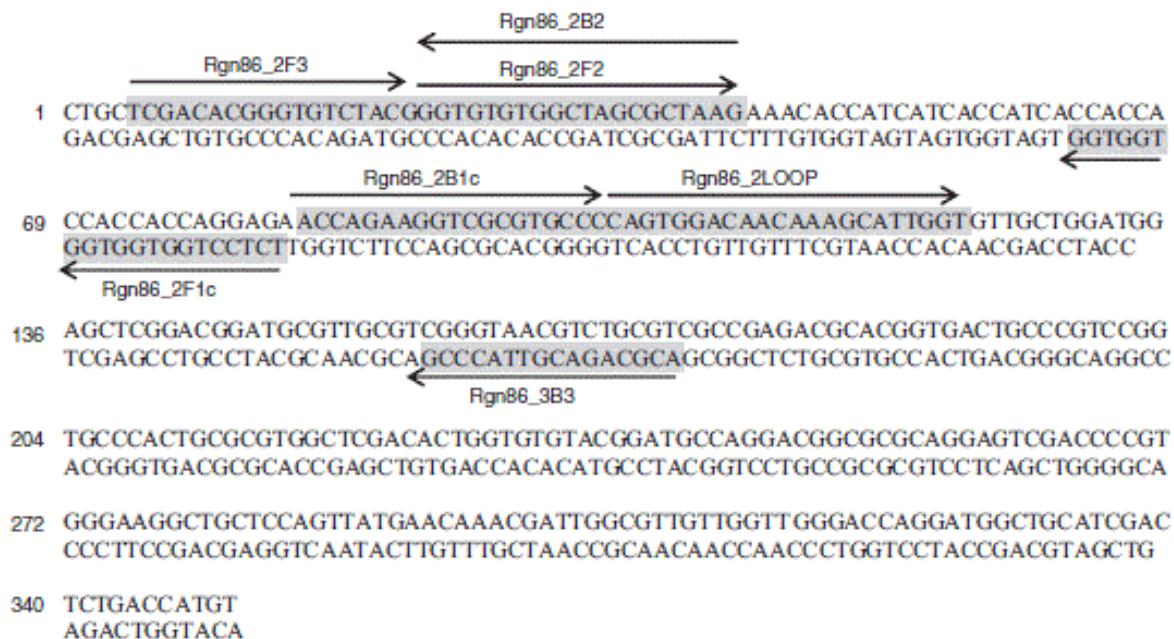
Z.R. Hansen¹, B.J. Knaus², J.F. Tabima³, C.M. Press², H.S. Judelson⁴, N.J. Grünwald^{2,3} and C.D. Smart¹

Figure 1 Rgn86_2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers located within the forward and reverse DNA sequences of a conserved portion of Region 86. LAMP primer sequences are highlighted in grey.



Figure 2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ITSII primers tested with a 10-fold *P. infestans* DNA dilution series. Positive LAMP reactions resulted in a colour change from violet to blue. *P. infestans* DNA quantities from left to right: 2 ng; 200 pg; 20 pg; 2 pg; 0.2 pg; 0.02 pg; 2 fg; no template (negative control).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Procedure as a Sensitive and Rapid Method for Detection of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Potatoes and Psyllids

Aravind Ravindran, Julien Levy, Elizabeth Pierson, and Dennis C. Gross

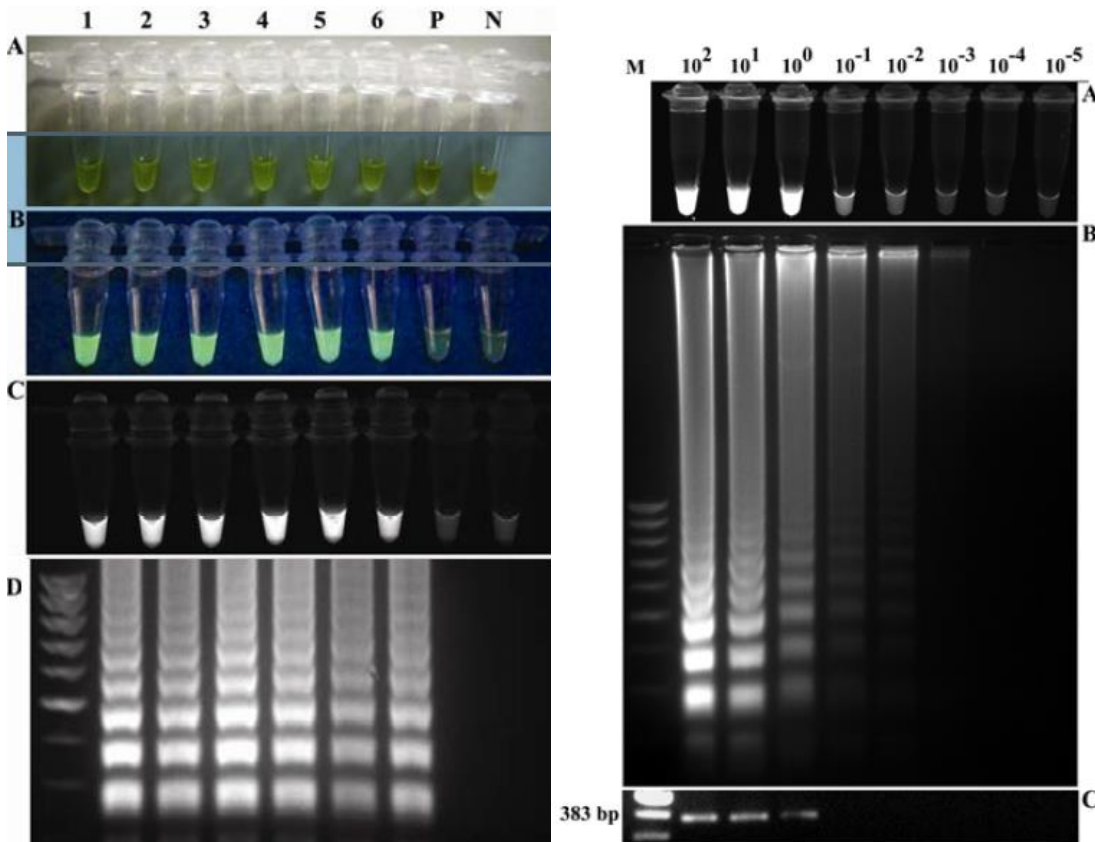


TABLE 2. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) detection of '*Ca. Liberibacter solanacearum*' using a conventional PCR primer pair (LsoTX 16/23F/R), the newly developed loop-mediated isothermal amplification procedure (LAMP) primers (LsoTX16SLAMP), and a quantitative PCR (qPCR) primer pair (LsoF and HLBr) in assays of 10 zebra chip-symptomatic plants from a commercial field in Weslaco, TX

Plant parts sampled	16/23F/R primer set	16S rDNA LAMP primer set	qPCR primer set
Tuber	9/10 (100.0%) ^a	9/10 (100.0%) ^a	9/10 (100.0%) ^a
Stem	9/10 (90.0%)	9/10 (90.0%)	10/10 (100.0%)
Petiole	9/10 (90.0%)	9/10 (90.0%)	9/10 (90.0%)
Leaf	8/10 (80.0%)	8/10 (80.0%)	8/10 (80.0%)
' <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> ' detection total	35/40 (87.5%)	35/40 (87.5%)	36/40 (90.0%)

^a Number of '*Ca. Liberibacter solanacearum*'-positive samples per total number (percentage).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Crop Protection 68 (2015) 41–48



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

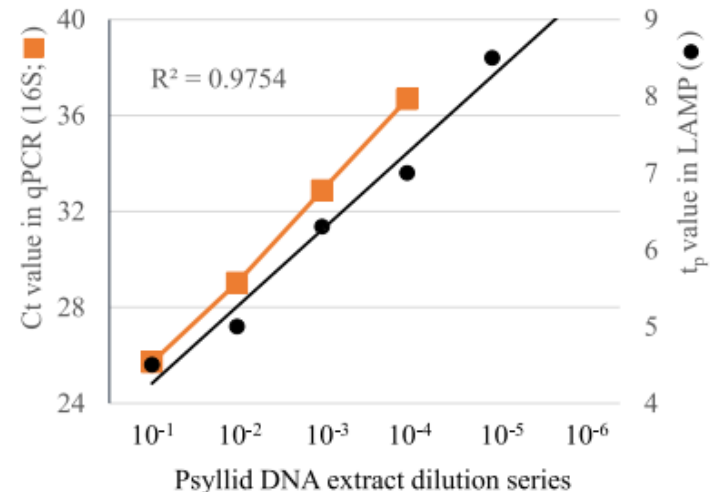
journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro



A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management

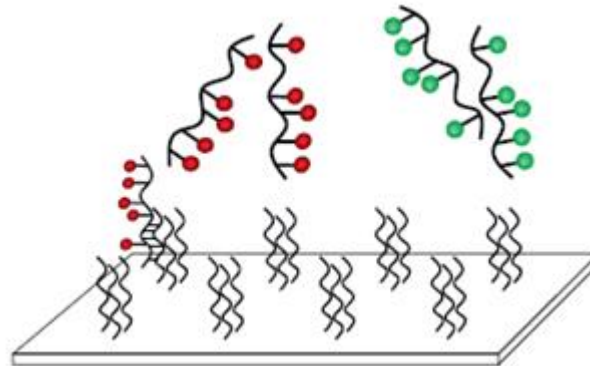


Manjunath L. Keremane ^{a,*}, Chandrika Ramadugu ^b, Esteban Rodriguez ^a, Ryo Kubota ^c, Scott Shibata ^c, David G. Hall ^d, Mikeal L. Roose ^b, Daniel Jenkins ^e, Richard F. Lee ^a

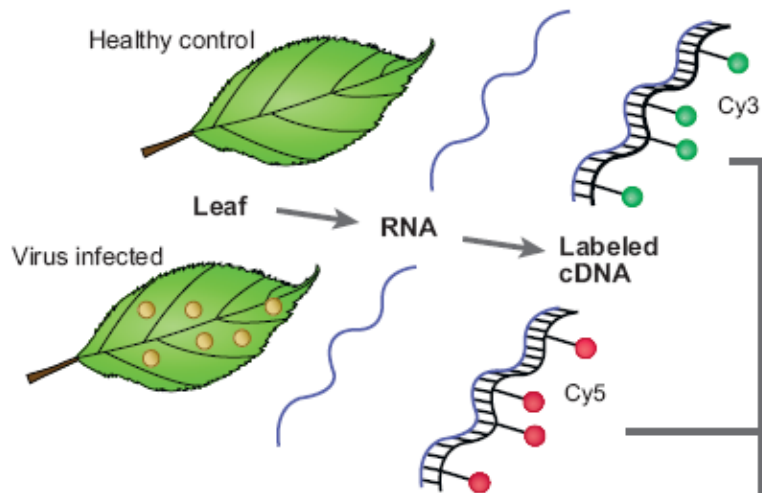


Microarranjos

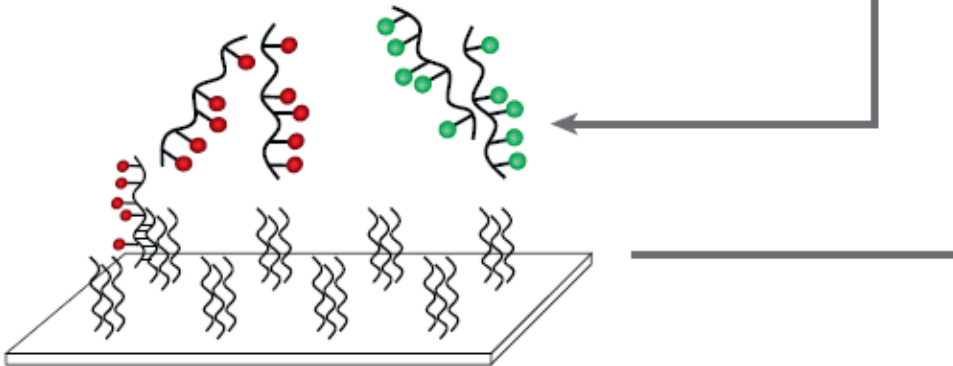
- ✓ Chips de DNA ou RNA – centenas a milhares de sondas – genoma do organismo alvo
- ✓ Multiplex – diagnose de múltiplos patógenos
- ✓ Extração de ácidos nucleicos, PCR e detecção diretamente no arranjo – potencial p/ automação



1 Extraction and labeling



2 Hybridization to array



3 Two-color scanning

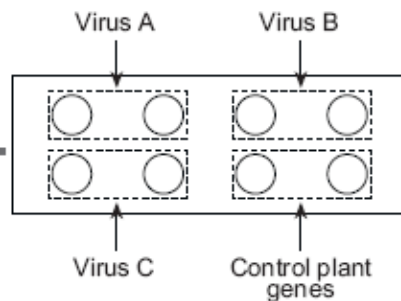


Figure 2

A schematic diagram detailing a simple approach to virus detection using a microarray. RNA is extracted from the test material and known healthy leaf material and reverse transcribed into cDNA incorporating fluorescently labeled nucleotides. Cy 3 is used for the healthy and Cy 5 for the test material (1). The cDNAs are pooled and hybridized to the array (2). Following washing and scanning of the slides, the results reveal specific hybridization of Cy5-labeled (*red*) target to the probe spots belonging to virus A. As an internal positive control, probes homologous to plant genes are also present on the array, these hybridize to cDNA from both the test (labeled with Cy5) and healthy (labeled with Cy3) plants, thus these spots appear yellow.

Detecção de vírus de plantas por microarranjo

Boonham et al. 2007

Diagnóstico molecular

Table 17.2 Comparison of sensitivity, specificity, feasibility, speed and cost of some different techniques in the detection of plant-pathogenic bacteria and viruses. Adapted from López *et al.* (2009). Reproduced with permission of Elsevier.

Technique	Sensitivity ^a	Specificity ^b	Feasibility ^c	Speed	Cost
Molecular hybridization	+ ^d	++++	++	+	+++
Conventional PCR	+++	++++	+++	+++	+++
Co-operational-PCR ^e	++++	++++	+++	+++	+++
Multiplex PCR	+++	++++	+++	+++	+++++
Real-time PCR ^f	+++++	+++++	++++	+++++	+++

^aSensitivity: probability of detecting true positives.

^bSpecificity: probability of detecting true negatives.

^cFeasibility: practicability in routine analysis, execution and interpretation.

^dThe number of + symbols indicates how methods rate regarding each considered criterion, from acceptable (+) to optimum (+++++).

^eCoupled with hybridization and colorimetric detection.

^fUsing TaqMan probes.

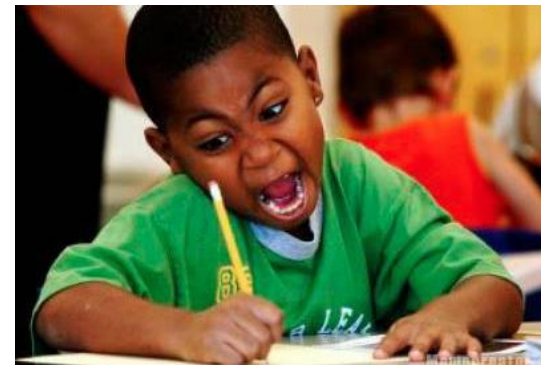
Sheikha & Ray (2014)

Diagnóstico molecular

- ✓ Escolha do método: custos de equipamentos e reagentes, tempo para análise, n° de espécies investigadas e n° de amostras
- ✓ Pontos fracos:
 - ✓ Em sementes, insetos vetores, água e solo, a concentração do patógeno frequentemente está abaixo do limite de detecção dos métodos (10-100 pg)
 - ✓ Falso negativos – DNA alvo degradado, reagentes de baixa qualidade, inibidores da polimerase
 - ✓ Falso positivos – contaminação cruzada, artefatos
 - ✓ Tamanho amostral inadequado – não representativo da realidade
 - ✓ Presença de inibidores
 - ✓ Detecção do ácido nucleico – patógeno pode não estar viável – quarentenários – *screening* preliminar + testes convencionais

Detecção molecular: O que é importante saber?

- ✓ Métodos de monitoramento de patógenos devem ser custo-efetivos, simples de usar, robustos e rápidos, ter longa vida de prateleira e especificidade – sensibilidade variável
- ✓ Além de produtores rurais, são úteis para agências regulatórias, exportadores, importadores, agentes de extensão agrícola – bioterrorismo
- ✓ Desenvolvimento de dispositivos diagnósticos portáteis para testes in loco, no campo, serviços de laboratório acessíveis
- ✓ Já em uso na produção de batata e citros – culturas com propagação vegetativa
- ✓ Amplificação do DNA (LAMP), qPCR multiplex, microarranjos
- ✓ Novas tecnologias - barcode, sequenciamento de nova geração, biosensores, espectrometria de massa – aplicação em diagnose e identificação de patógenos



Questões futuras

- ✓ Desenvolvimento de iniciadores específicos a cada patógeno – atualmente indisponíveis para muitos deles
- ✓ Confiança de banco de dados internacional de sequências genéticas – precisão no diagnóstico
- ✓ Validação de cada teste – confiabilidade – antes da implementação como estratégias de controle de doenças ou ações regulatórias
- ✓ Com maior precisão na determinação da presença de patógenos, limiares devem ser estabelecidos para minimizar efetivamente a dispersão de patógenos sem criar obstáculos desnecessários ao comércio internacional de produtos agrícolas

De Boer et al. (2012)

Obrigada pela atenção!

maisaciampi@usp.br