



TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES EN PLANTAS: MÉTODO LAMP

Mr. Satoki Yokoi

Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT)

1. Tecnologías de diagnóstico de campo
 - 1.1. Análisis de imágenes
 - 1.2. Diagnóstico por sintomatología de la enfermedad
 - 1.3. Diagnóstico por técnicas de biología molecular

¿Es posible la identificación específica de razas de patógenos causantes de enfermedades mediante métodos de biología molecular?

Si podemos hacerlo. Se realiza mediante la identificación de genes específicos relacionados con la especificidad de su hospedante y genes determinantes de la raza. Para el caso de la Marchitez en banano y plátano (*Fusarium wilt*) causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC), ¿será posible identificar eficientemente el hongo o su raza mediante técnicas de biología molecular? En los últimos años, el análisis genómico de patógenos vegetales se ha vuelto posible; y mediante la comparación de genomas, se ha revelado información sobre genes que solo posee el hongo causante de la Marchitez en banano y plátano o sus razas (Asai, 2019).

En la Tabla 1.3.1.1 se muestra que las razas 1, SR4 TR4 de FOC no poseen genes homólogos en los genes SIX3, 5, 10, 11, 12 y 14.

Tabla 1.3.1.1. Detección de presencia de genes homólogos del grupo de genes efectores SIX de FOL de Marchitez de tomate en las razas de FOC de la Marchitez en banano y plátano.

RAZA	SIX genes													
	SIX1	SIX2	SIX3	SIX4	SIX5	SIX6	SIX7	SIX8	SIX9	SIX10	SIX11	SIX12	SIX13	SIX14
Raza 1	d,f	-	-	b	-	b	-	-	a	-	-	-	a	-
Raza SR4	g	d	-	a	-	-	a	a,b	a	-	-	-	-	-
Raza TR4	a,h,i	c	-	a	-	a	-	a	a	-	-	-	a,e	-

Una letra diferente en la tabla indica que cada gen homólogo tiene una secuencia de bases diferente.

Por ejemplo, como resultado del análisis del genoma de la cepa 160527 de la Raza 1, el cromosoma 12 (contig 12) es un cromosoma accesorio, y se especula que los genes relacionados con la patogenicidad y la especificidad del hospedante se encuentran en este cromosoma (Fig. 1.3.1.1.). Además, la eliminación de una parte del cromosoma 12 no tiene efecto sobre el crecimiento del hongo, pero reduce (¿o pierde?) la patogenicidad, lo que sugiere que esta región lleva un determinante de patogenicidad.

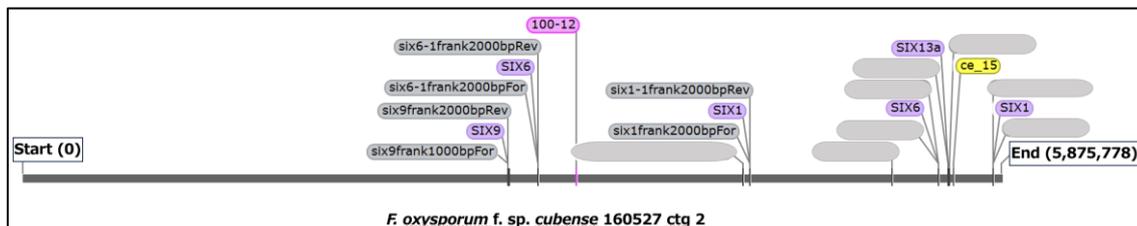


Figura 1.3.1.1 Genes putativos relacionados con patogenicidad en cromosomas accesorios

Tabla 1.3.1.2 Ejemplos de genes utilizados para la identificación precisa de razas de patógenos por métodos de biología molecular y patrones de retención de cada raza

Agente causal de la Marchitez en banano y plátano (<i>F. sp. cubense</i>)	<i>Ce 15</i>	<i>SIX7</i>	<i>SIX8</i>
Raza 1	+	—	—
Raza SR4	+	a	a,b
Raza TR4	+	—	a
Otros hongos diferenciados	—	±	±

1.3.1 Preparación de la solución de ADN molde

1.3.1.1 Control positivo

Una solución de ADN en la que se sintetiza artificialmente un gen objetivo o similar y se usa como control positivo. Añadir 2 ml/solución de reacción a una concentración de 5×10^7 copias/ml.

Para ADN seco, agregue 10µl de "solución de control positivo" al tubo de "control positivo", centrifugue, deje reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, haga un golpeteo, centrifugue y agregue 2 ml/solución de reacción.

1.3.1.2. Extracción de ADN a partir de tejido vegetal

1.3.1.2.1. Kits e instrumentos

- Kit de preparación de plantillas, NipponGene (a temperatura ambiente)
- Micropipeta (200 µl)
- Microchip estéril con filtro (200 µl)
- Microtubo estéril

1.3.1.2.2. Muestreo

En el campo, corte el tallo del plátano a aproximadamente 50 cm sobre el suelo y tome fragmentos de tejido de aproximadamente 1 mm de cada corte utilizando unas pinzas. Si va a llevar el material del campo al laboratorio, corte el tallo del plátano en un tubo de ensayo de aproximadamente 15 cm y, si es posible, guárdelo en refrigeración durante el transporte. Dado que el corte se oxidará y se volverá marrón, se debe hacer un nuevo corte en el laboratorio. Mientras toma los fragmentos de tejido, observe y registre cualquier cambio en el color del corte oxidado (1.2).

1.3.1.2.3. Extracción de ADN

Si el propósito es simplemente determinar si la planta está infectada con el hongo de la enfermedad de Marchitez en banano y plátano, solo es necesario realizar la extracción de ADN siguiendo el siguiente protocolo. No es necesario medir la concentración ni otros parámetros.

Tomar 100 µl de Solución de Extracción (ES) en un tubo de PCR.

Sumergir una muestra de tejido vegetal de aproximadamente 1 mm³ en la ES dentro del tubo de PCR.

Calentar a 95°C durante 10 minutos.

Enfriar sobre hielo durante 2 minutos.

El ADN extraído puede utilizarse como solución de ADN.

1.3.1.3. Extracción de ADN a partir del cuerpo del hongo

Sin completar

1.3.2. Identificación específica del hongo de la enfermedad de Marchitez en banano y plátano y sus razas mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

1.3.3. Identificación específica del hongo de la enfermedad de Marchitez en banano y plátano y sus razas mediante la técnica LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification -Amplificación Isotérmica Mediante Bucle)

La técnica LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) es una tecnología de amplificación de genes desarrollada por Takano y otros en el 2014. Utilizando cebadores (primer set) específicos para el gen objetivo, permite amplificar fragmentos de ADN deseados y distinguir de manera específica entre patógenos y otros organismos al dirigirse a genes característicos del patógeno. Esto permite realizar un diagnóstico específico y distinguir rápidamente si el patógeno está presente, sin la necesidad de llevar a cabo pruebas de inoculación prolongadas (X.X.X.). Como resultado, se puede responder rápidamente ante una situación de infección.

El método LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) es una técnica molecular utilizada comúnmente en biología, que difiere del método PCR (1.3.2.) en su mecanismo de amplificación. Mientras que el PCR utiliza dos cebadores, el LAMP utiliza un conjunto de cebadores dirigidos a seis secuencias específicas de bases. Este conjunto de cebadores está diseñado de manera que los productos generados forman bucles y se autoanillan, permitiendo que estos actúen como plantillas y cebadores al

mismo tiempo. Esto es posible gracias a la enzima de síntesis de ADN que puede sintetizar nuevas cadenas mientras desenrolla las dobles hebras, lo que permite una reacción explosiva de amplificación.

El LAMP tiene tres ventajas significativas. En primer lugar, no requiere equipos especializados. Al usar una enzima de amplificación de ADN que funciona alrededor de 60°C y cebadores diseñados para autotemplarse, la amplificación de la secuencia objetivo se puede lograr de manera simple y rápida sin la necesidad de dispositivos como termocicladores. La segunda ventaja es la simplificación de la operación. Combinando con intercalantes de fluorescencia o sondas de fluorescencia, es posible confirmar la amplificación a través del cambio de color o turbidez, lo que evita la necesidad de operaciones como electroforesis o tinción. Además, debido a la alta eficiencia de amplificación, es menos susceptible a inhibidores y permite la amplificación incluso de ADN genómico no purificado como molde. La tercera ventaja es su alta especificidad. El conjunto de cebadores que apuntan a seis regiones específicas confiere una alta especificidad, lo que lo hace adecuado para la detección específica.

*Sin embargo, es importante tener en cuenta que en el LAMP, debido a la explosiva amplificación del ADN, si se produce una contaminación, puede conducir a situaciones difíciles de resolver. Por lo tanto, es necesario realizar las operaciones experimentales con extremo cuidado utilizando filtros y chips para evitar la contaminación.

1.3.3.1. Conjunto de cebadores para LAMP

El conjunto de cebadores utilizado para la identificación específica se diseña para apuntar a regiones genómicas que son específicamente conservadas por la raza que se desea identificar, como se muestra en el ejemplo en la Tabla 1.3.1.2. Normalmente, se crean aproximadamente tres juegos de cebadores para una región genómica objetivo, y luego se selecciona el conjunto con menor cruzamiento y mayor velocidad y sensibilidad de reacción para su uso. Para mayor información consulte el sitio web de NipponGene.

1.3.3.2. Preparación de la mezcla de reacción

1.3.3.2.1. Para el uso de reactivos líquidos

1.3.3.2.2. Para el uso de reactivos secos

1.3.3.2.2.1. Kits e instrumentos

DryADD LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye), NipponGene (temperatura ambiente)

Conjunto de cebadores para LAMP (por ejemplo: FOC, SIX7, SIX8), NipponGene (temperatura ambiente)

ADN molde (extraído según el procedimiento 1.3.1.2)

Micropipetas (200 µl, 20 µl, 2 µl)

Microchip estéril con filtro (200 µl, 20 µl, 2 µl)

Microtubo estéril

Bloque térmico (mini8Thermal Cycler, miniPCR) o termociclador

1.3.3.2.2.2. Preparación de la mezcla de reacción

Siguiendo la Tabla 1.3.3.2., coloque cada reactivo necesario (excepto la muestra de ADN) en el microtubo estéril utilizando las micropipetas y mezcle bien invirtiendo. Después de la mezcla, centrifugue brevemente y coloque el tubo sobre hielo.

Tabla 1.3.3.2. Composición de la solución de reacción por tubo de reacción

Nombre del reactivo	Cantidad (μ l)
ddWater	15.5
LTV Dissolve Solution	2.5
10 \times LAMP Primer Mix	5.0
Total	23

1.3.3.3. Reacción

En caso de utilizar reactivos secos, realizar la reacción de la siguiente manera:

Añadir 23 μ l de la solución de reacción preparada en el paso 1.3.3.2.2. a cada tubo de LAMP Mater Mix, disolver y centrifugar.

Añadir 2 μ l de la muestra preparada en el paso 1.3.1.2.3., control positivo (1.3.1.1.) o control negativo (agua estéril RO) a cada tubo, y centrifugar.

Añadir 20 μ l de aceite mineral. No es necesario si se utiliza un termociclador.

Calentar a alrededor de 64.5 $^{\circ}$ C durante aproximadamente 30 minutos (hasta 1 hora).

Enfriar sobre hielo.

Observar los resultados.

1.3.3.4. Observación de los resultados

Existen dos métodos de observación: la observación visual y la observación mediante radiación ultravioleta (UV). En la observación visual, si el resultado es negativo, el color de la solución de reacción no cambia y permanece amarillo. En cambio, si es positivo, cambia a un verde claro (Figura 1.3.3.2).

Al aplicar radiación ultravioleta (395 nm, vs-fl01jp, Vansky), en caso de ser positivo, se observará fluorescencia, lo que hace que las diferencias sean más evidentes en comparación con la observación visual (Figura 1.3.3.3).

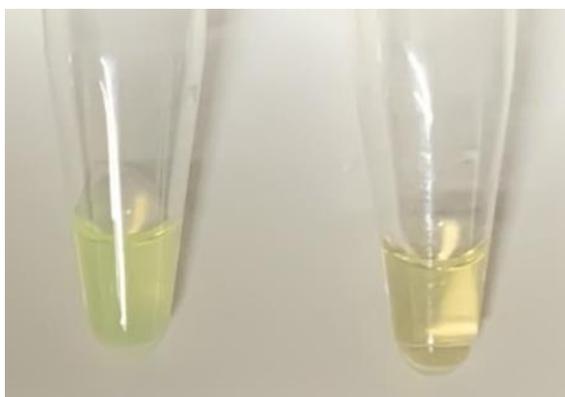


Figura 1.3.3.2. Observación visual (Izquierda: Positivo, Derecha: Negativo)

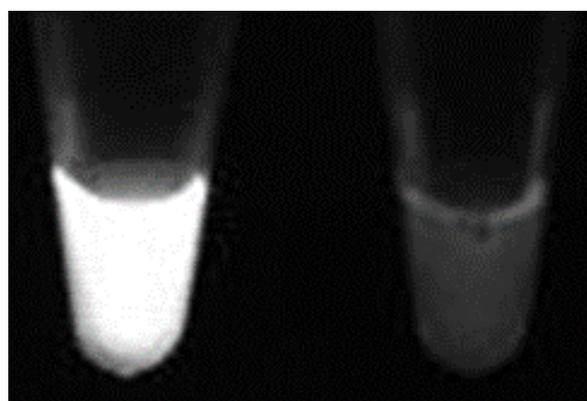


Figura 1.3.3.3. Observación mediante radiación ultravioleta (Izquierda: Positivo, Derecha: Negativo)