



Técnicas genómicas simplificados para la detección de enfermedades de cultivos de agricultura

Willy M. Maurer, Hansel Lopez, Marianny Williams, Yasmeri Mena

Instituto Especializado de Estudios Superiores Loyola (IEESL), San Cristóbal, República Dominicana

Instituto Politécnico Loyola, Tecnicos de Agronomía en formación (5AGP): Juleiny Rocío Vasquez, Angelina Jiménez, Naschly Salazar, Mabel Pérez, Harolin Faña, Dulce María Asencio, Florangy Michel, Karen Martínez, Amy Heredia, Silvia Benítez, Sebastián Casanova, Juan Rosario, Melany García, Ashley Calderon, Eli Marit Corporán, Dawling Tejeda, Jomar Arias, Eimmy Medina

Existen varios problemas de enfermedades fungosas y bacterianas en los cultivos.

Las pruebas actuales para identificarlos:

- Muy exactas
- Son **costosas**
- No están disponibles localmente
- Toman **mucho tiempo**

En los “*Laboratorios de BioCiencias*” del IEESL se realizan, desde hace varios años, diferentes procesos de genómica que son en su mayoría **complejos y consumen tiempo**.

El uso de **tecnología “Smart”** ha eficientizado los procesos de genómica en tiempo, costo y calidad.

¿Que es tecnologia smart en el laboratorio?

Usar la tecnología de punta para aplicar a la mejora continua, reduciendo costos y tiempo.

Ejemplos de “smart” en genómica:

- Uso de PCR, conectado al tablet o teléfono vía Bluetooth, con una reducción de un 75% en el costo de inversión y 50% de **energía**
- Sistema de **electroforesis** con **80% menos** TBE, **luz azul (no UV)**, visualización permanente y transformador integrado con un parte de **costo** de un sistema tradicional, **sin el uso de** bromuro de etidio
- Reactivos pre-dosificados, como las **tabletas** de agarosa con TBE buffer y tinción de ácido nucleico



Genomic sequencer

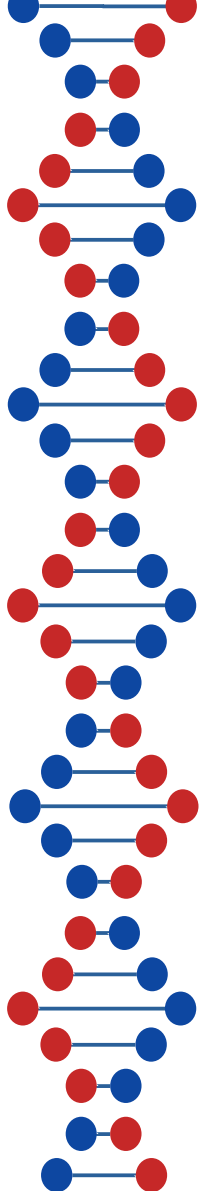


Electroforesis



PCR

¡No es una promoción, sino una reducción en los costos de laboratorio!



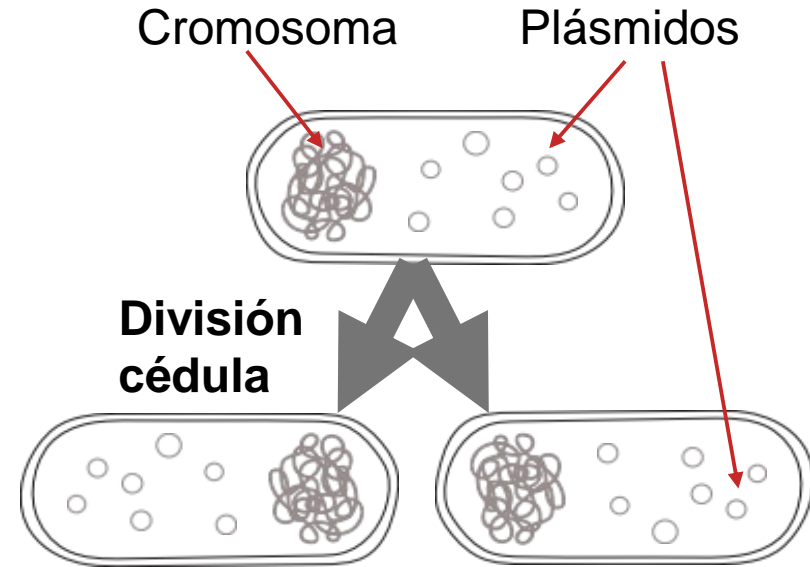
El objetivo es establecer y desarrollar procesos simplificados para la detección de enfermedades agrícolas.

Se realiza la **transformación bacteriana**, introduciendo nuevos genes en bacterias vivas y observando los cambios fenotípicos resultantes.

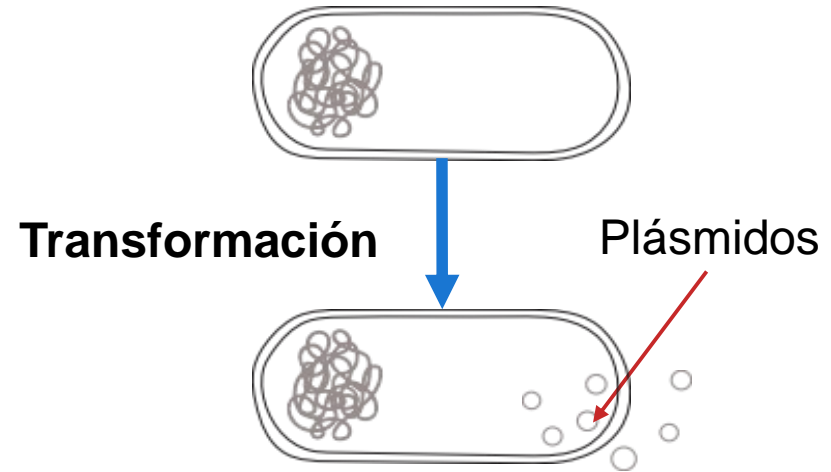
Inicia con una cepa bacteriana blanca y sensible a los antibióticos. Luego, mediante la absorción de CRISPR-plásmido (gen codificado), las bacterias se **tiñen de azul** en medios selectivos de antibióticos.

Se Diseñan genéticamente las bacterias para que sean azules

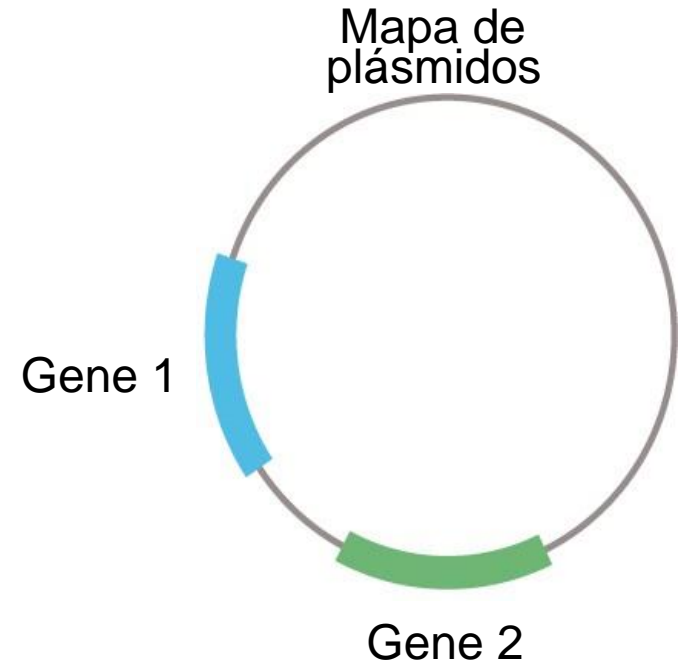
- La mayoría de las bacterias tienen un único **cromosoma** circular.
- A menudo también tienen **plásmidos**, piezas circulares más pequeñas de ADN.
- Los plásmidos se transmiten durante la división celular.



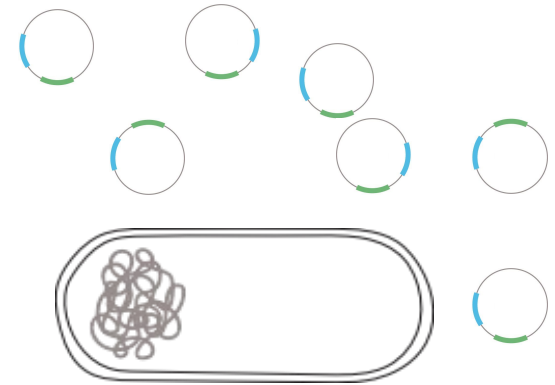
- Las bacterias pueden **recoger nuevo ADN plasmídico** del **medio ambiente**, un proceso llamado transformación.
- Las bacterias pueden **expresar** las proteínas codificadas **por genes en plásmidos**.
- Los **plásmidos** que se encuentran naturalmente en las bacterias tienden a tener al menos un gen que **beneficia a las bacterias**.



- Los científicos diseñan **plásmidos para introducir genes** específicos en las bacterias.
- Los **plásmidos** diseñados **contienen** al menos un **gen de interés**, que es el gen que se desea introducir en la bacteria.
- El **gen de interés** depende del propósito del experimento.

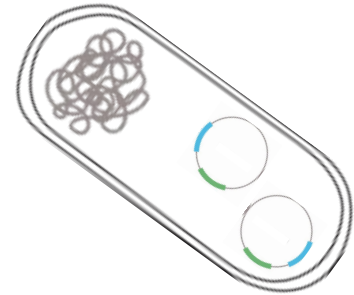


- Para estimular a las bacterias a absorber plásmidos se exponen las células a condiciones que hacen que sea más probable que el ADN ingrese a la célula.
- ***Para esto las células son expuestas al cloruro de calcio***



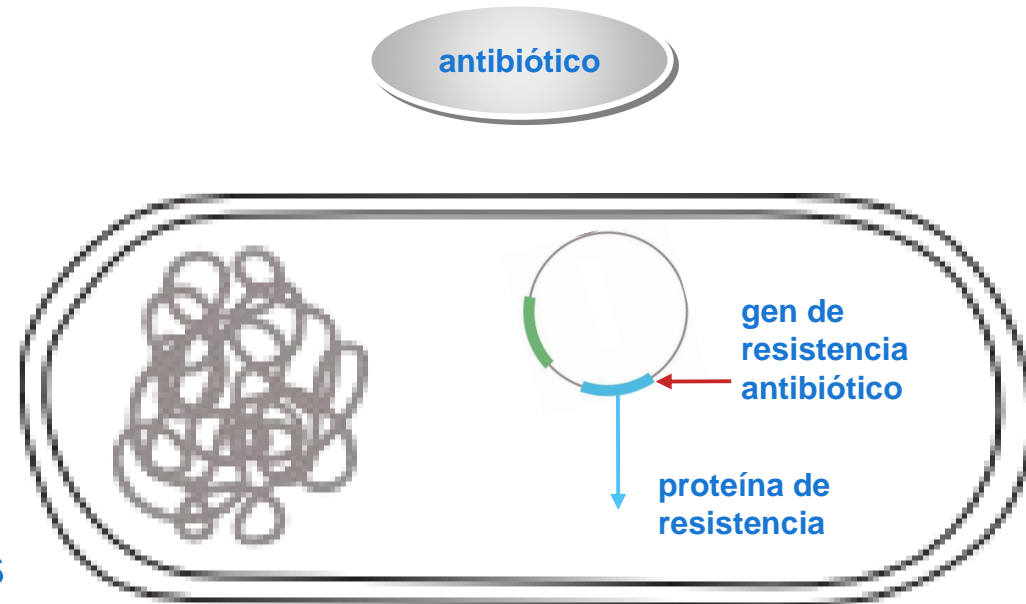
Bacteria + CaCl₂

- Se necesita una forma de aislar sólo las bacterias que se transformaron con éxito.



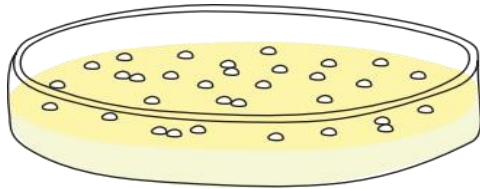
Selección con antibióticos

- La ciencia utiliza **antibióticos para seleccionar** las bacterias que se transformaron con éxito.
- El **plásmido porta un gen de resistencia** a los antibióticos.
- Sólo **sobreviven las bacterias con el plásmido**.



Bacterias en crecimiento en placas.

Después de una transformación, las bacterias se esparcen sobre agar nutritivo y se les permite replicarse. Hay tres resultados posibles.



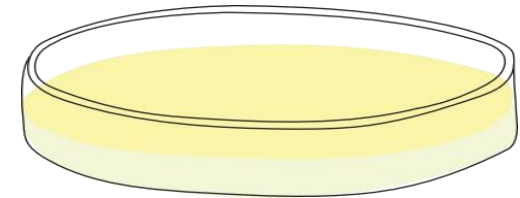
Placa con Colonias

Todas las células de una colonia son genéticamente idénticas porque provienen de una sola célula bacteriana que se dividió muchas veces.



Placa con Algodón

Si sobreviven demasiadas bacterias, la mayor parte del agar quedará cubierta. no se pueden aislar fácilmente poblaciones de bacterias genéticamente idénticas

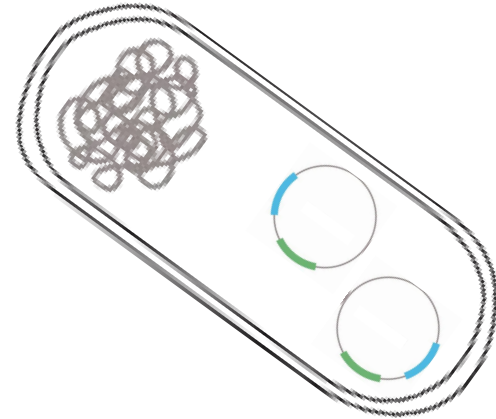


Sin crecimiento

No haya crecimiento bacteriano o todas las bacterias murieron.

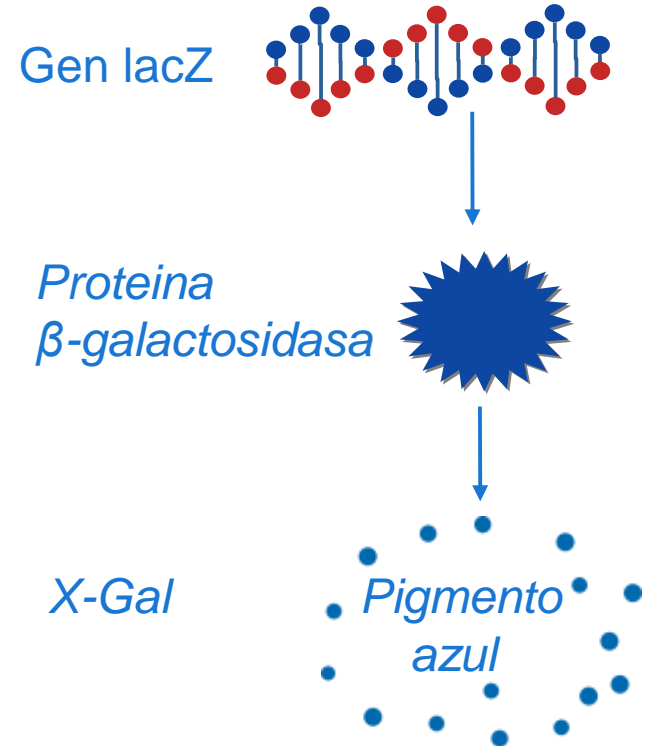
Hacer que las bacterias sean azules con el gen lacZ

- Se realizo con especies más comunes de bacterias de laboratorio, Escherichia coli (*E. coli*). Pero en los proximos experiemntos se usa otros bacterias.
- En condiciones normales, *E. coli* aparece de color blanco cuando se cultiva en agar nutritivo. Las bacterias fueron diseñadas genéticamente para que parezcan azules

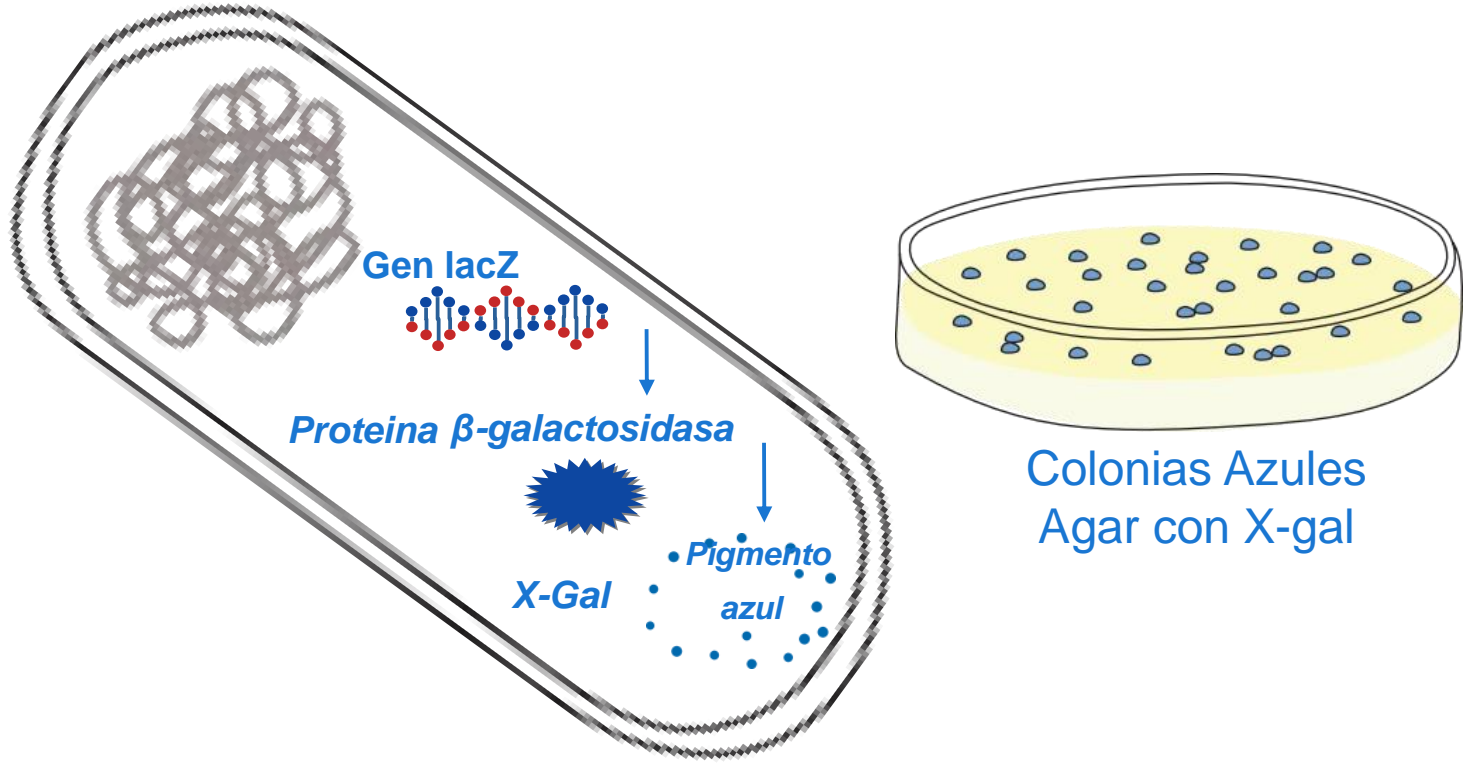


Hacer que las bacterias sean azules con el gen lacZ

- El gen lacZ codifica la proteína β -galactosidasa.
- La β -galactosidasa puede descomponer una sustancia química llamada X-Gal para producir un pigmento azul.
- Agregará X-Gal a algunas de sus placas de agar nutritivo.

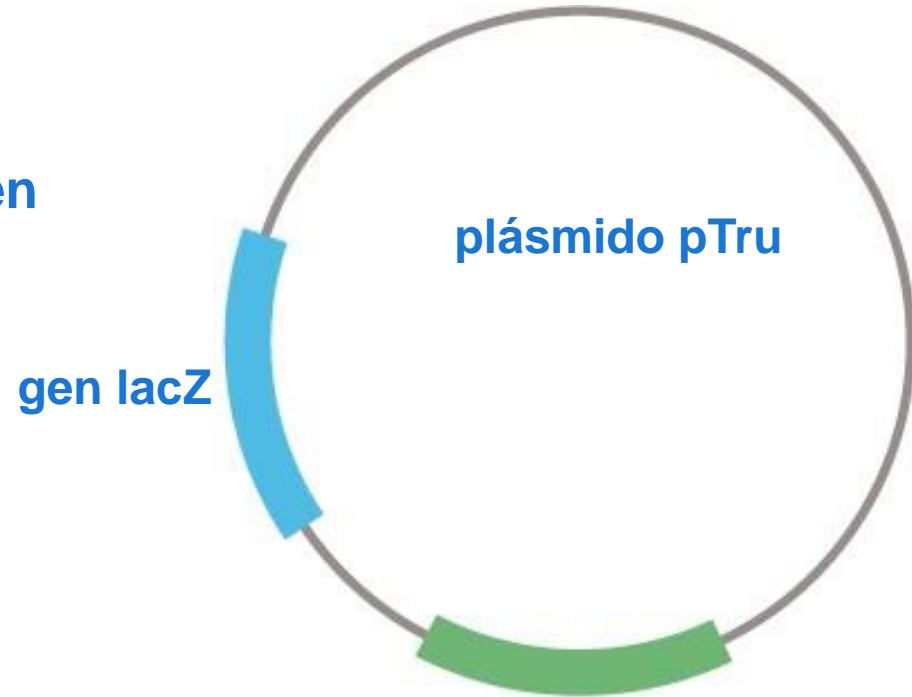


Hacer que las bacterias sean azules con el gen lacZ



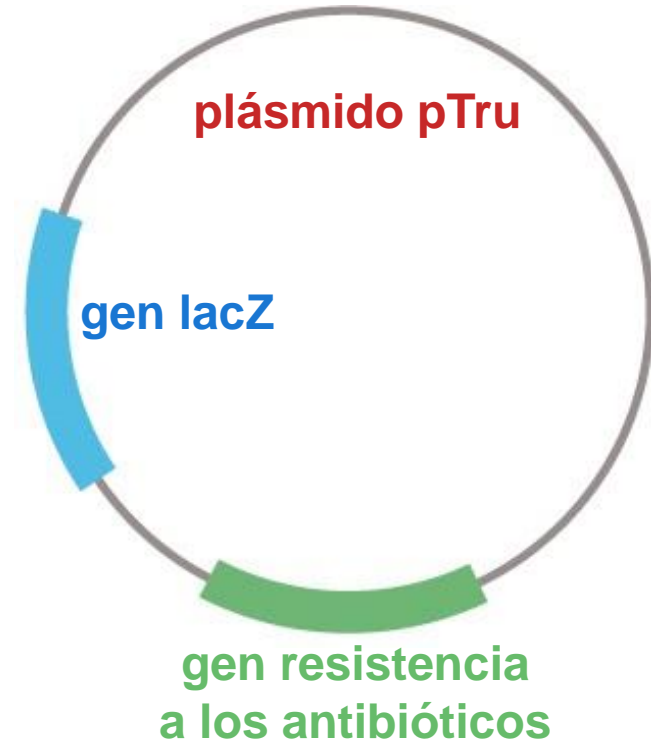
El plásmido pTru

- El gen de interés que está introduciendo en la bacteria es el **gen lacZ**. Recuerde, su objetivo es modificar genéticamente las bacterias para que sean **azules**.
- La enzima **β -galactosidasa** codificada por el gen lacZ permite a las bacterias descomponer **X-Gal** para crear un pigmento **azul**.



El plásmido pTru

- El plásmido también contiene un **gen de resistencia a los antibióticos**, antibiótico carbenicilina. Así sólo podrán crecer las bacterias que hayan absorbido el plásmido pTru.

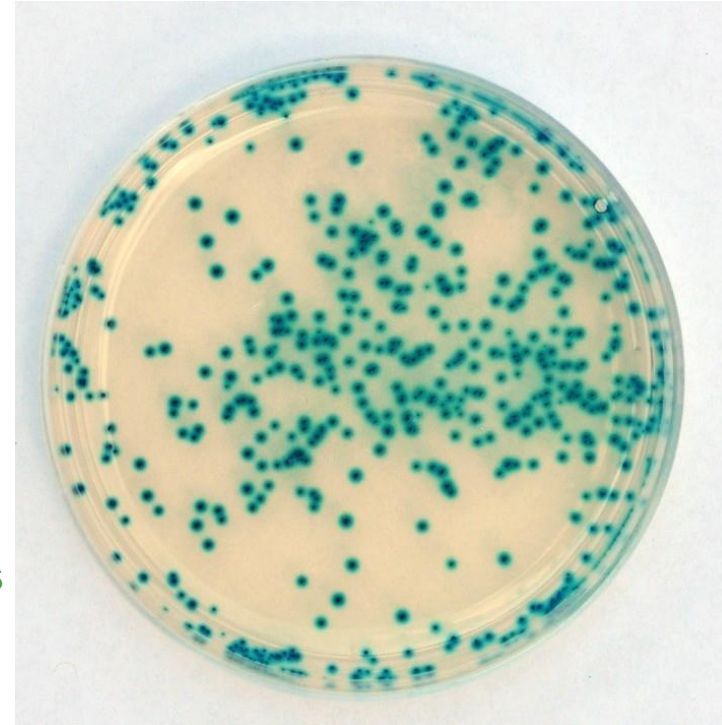


Resultados

Las células transformadas con pTru en placas agar & carbenicilin & X-Gal (CarbX) formaran colonias de E.coli azules.

- El pTru porta el gen lacZ, por lo que se expresará la proteína β -galactosidasa.
- La β -galactosidasa descompone la X-Gal en las placas y produce un pigmento azul
- El pTru proporciona resistencia con la carbenicilina. Sólo las células transformadas pueden crecer en presencia del antibiótico carbenicilina.
- La transformación es poco frecuente, por este pocas células absorben el plásmido. Estas células forman colonias (divididos).

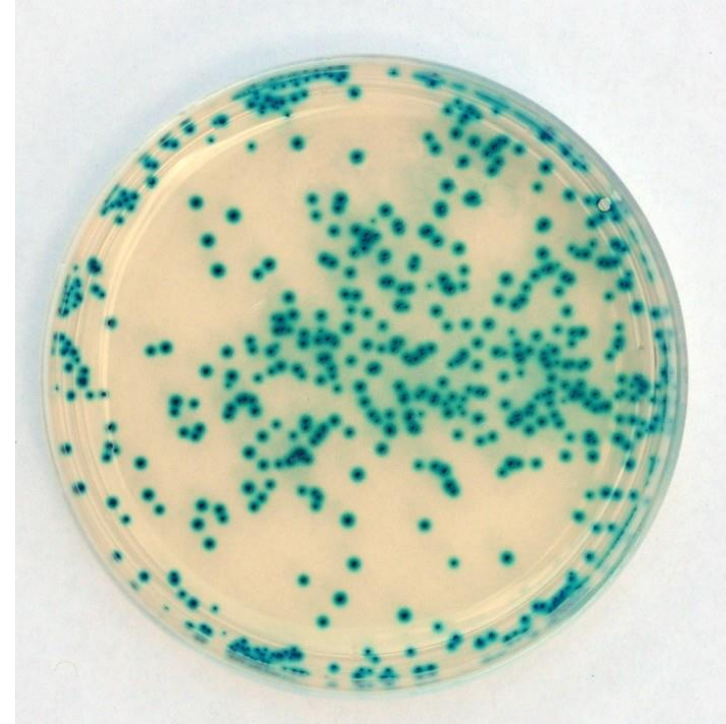
agar & carbenicilin & X-Gal & plasmid pTru



Los próximos pasos:

- Realizar este conocimiento a **otros bacterias de interés de agricultura**, como una método, fácil aplicable para el usuario.
- Una vez preparada la placa petri, el **usuario solo debe aplicar** el contaminante con un hisopo en la superficie, dejar entre 6 y 24 horas incubando y ver el resultado, **(Con color = con enfermedad, sin color = sin enfermedad)**

agar & carbenicilin & X-Gal & plasmid pTru

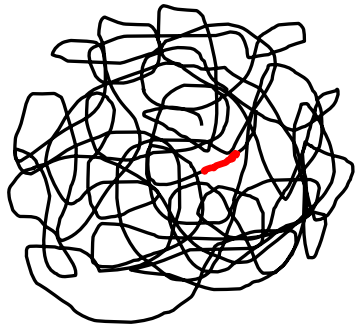


Tenemos más: qPCR

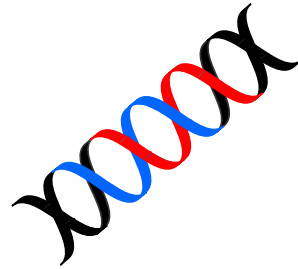
Polymerase Chain Reaction (PCR) / Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR quantitative PCR / PCR cuantitativo

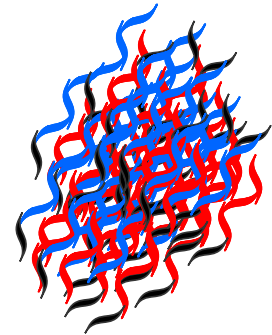
Polymerase Chain Reaction (PCR) (reacción en cadena de la polimerasa)



Una prueba de ADN complejo



Una región de interes



ADN amplificado millones de veces

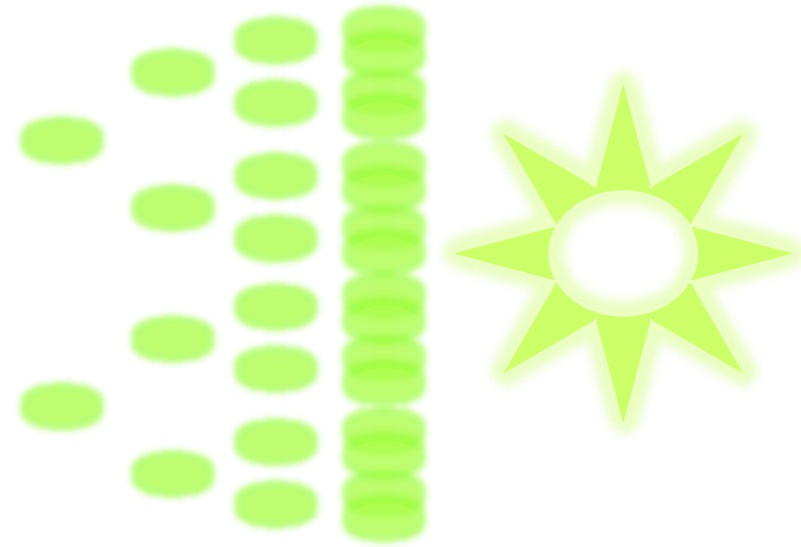
Un proceso que identifica y copia (amplifica) un fragmento específico de ADN en una muestra biológica.

qPCR utiliza un tinte fluorescente

qPCR utiliza un **tinte fluorescente** que solo emite fluorescencia cuando se une a un ADN bicatenario (ADNbc).

En cada **ciclo** de PCR, se produce cada vez más ADN bicatenario y la fluorescencia se volverá **cada vez más visible**.

Tinta fluorescencia



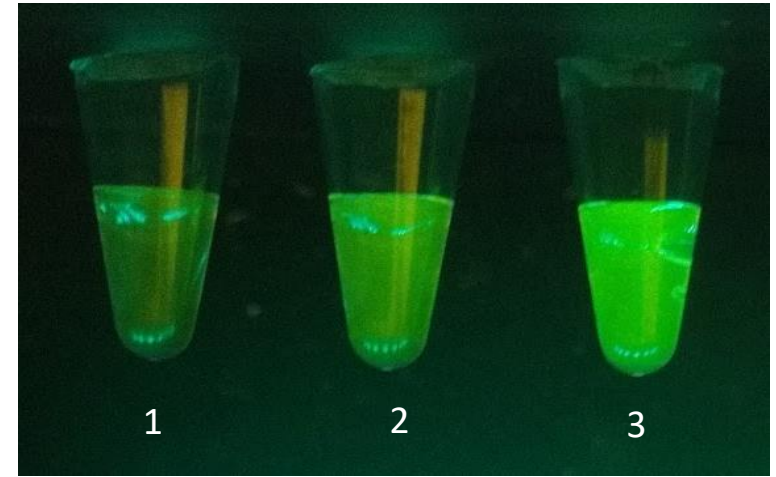
Ciclos del PCR

La qPCR suele ser cara

La qPCR suele realizarse en máquinas que pueden costar decenas de miles de dólares.

Estas máquinas no sólo realizan la PCR, sino que también miden continuamente la fluorescencia utilizando haces de luz finamente calibrados y detectores de fluorescencia de alta precisión.

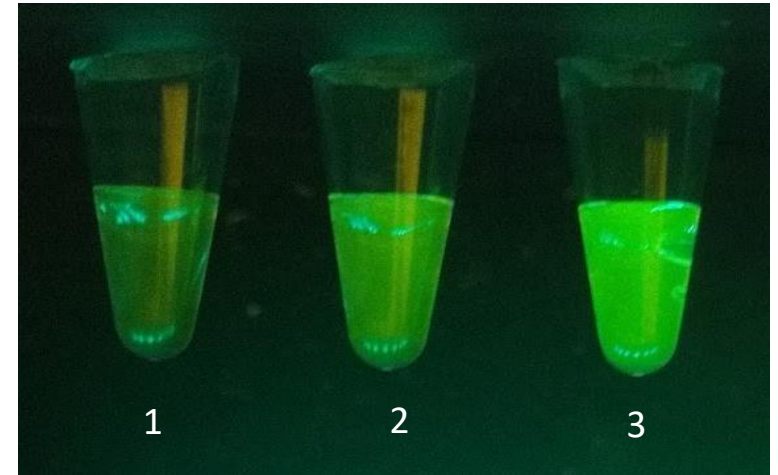
Alternativas económicas pero efectivas para ver qPCR son tus propios ojos.



qPCR con los ojos

Con un protocolo elaborado y conociendo genéticamente nuestras plagas podemos **detectar con exactitud las enfermedades en el campo** con la técnica presentada.

Los **costos son bajos** con el uso de la tecnología “Smart”, y aplicable en laboratorios simples y móviles



Gracias

A Dios, que nos guiá y ayuda en nuestra vida y trabajo

P. José Victoriano, sj, Rector,

Felix Rondón Director de Investigación,

y todos los colegas en Loyola y de mi familia dominicana

Este proyecto es financiado por fondos propios de Loyola