

RESUMEN

La detección adecuada de virus vegetales permite controlar la dispersión de enfermedades, establecer medidas de prevención y reducir las pérdidas económicas. El diagnóstico mediante amplificación de ácidos nucleicos es reconocido por su alta sensibilidad y especificidad. La amplificación dependiente de helicasa termofílica (tHDA) es una técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que no requiere ciclos de temperatura, ya que realiza la separación de la doble cadena de ADN usando la enzima helicasa. En la presente investigación se desarrolló un método de detección de ácidos nucleicos basado en fluorescencia para diagnosticar los virus vegetales RRV, HPV y HVX usando tHDA con self-quenched primers. En primer lugar, se diseñaron seis parejas de primers de acuerdo a los parámetros de diseño de tHDA y self-quenched primers. En segundo lugar, se realizó un gradiente de temperatura de 60 a 70°C. En tercer lugar, se optimizó la reacción evaluando las concentraciones de primers 0.15 y 0.2 μM y de MgSO_4 4 y 4.5 mM. Por último, se determinó la sensibilidad de la técnica mediante medición cuantitativa de fluorescencia en tiempo real y electroforesis en gel de agarosa al 2% obteniendo un límite de detección de 0.0001 ng de ADN plasmídico con las secuencias diana de RRV y HPV. No hubo amplificación con ninguno de los primers de HVX, lo que se atribuye a un mayor contenido de G-C en los productos de amplificación. Los resultados del estudio muestran que los self-quenched primers pueden ser usados en tHDA para una detección sensible de virus vegetales.

Palabras clave: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA, DISEÑO DE PRIMERS, VIRUS VEGETALES.