



Métodos Moleculares na detecção de patógenos em sementes e mudas

Daiana Bampi

14 de setembro de 2023

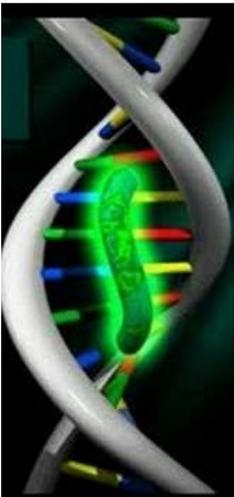
Métodos Moleculares

Ferramentas:

- ✓ Reação em cadeia da polimerase (PCR)
 - ✓ RT-PCR
 - ✓ Nested-PCR
 - ✓ PCR multiplex
 - ✓ PCR quantitativa em tempo real (qPCR)
 - ✓ PCR digital
 - ✓ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Outras Ferramentas:

- ✓ Hibridização
 - ✓ Southern blot, Northern blot, Western blot, Dot blot
 - ✓ Microarranjos



Quais os desafios que os métodos moleculares buscam resolver ?

- ✓ Insegurança na identificação de alguns patógenos

Stenocarpella maydis



Imagem: Siqueira, 2013



Imagem: Almeida, 2009

Stenocarpella macrospora



Imagens: Siqueira, 2013



Imagem: Almeida, 2009

✓ Necessidade de rapidez nos resultados: EX.; *Stenocarpella* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*



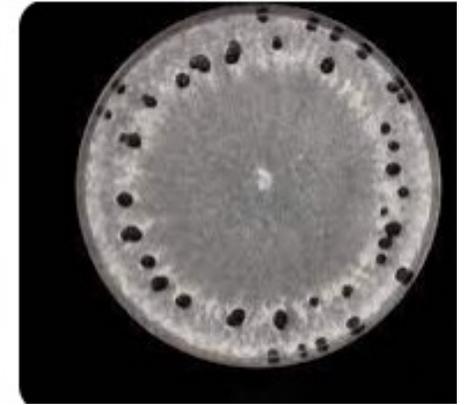
Imagem: Siqueira, 2013



Imagem: Almeida, 2009



Pavlovic et al. 2014



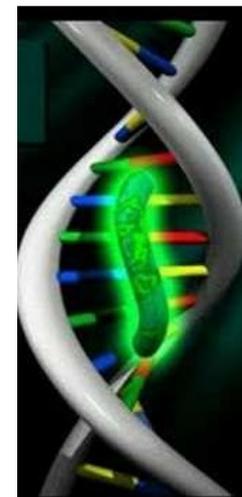
✓ Crescimento de organismos saprófitas mais rápido que o patógeno alvo



Diagnóstico Molecular de Fitopatógenos

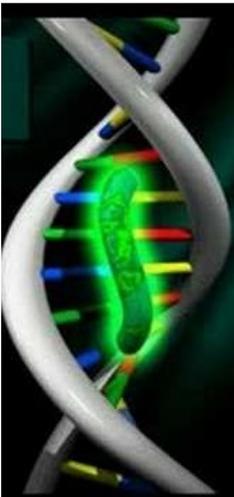
Benefícios:

- ✓ Diagnóstico confiável – tomada de decisões
- ✓ Agilidade na diagnose – estratégia de prevenção
- ✓ Avaliação de um grande n° de amostras em curto período de tempo
- ✓ Estratégias de prevenção contra novas introduções
- ✓ Patógenos quarentenários – elevar eficiência e rapidez na inspeção
- ✓ Globalização dos mercados de produtos agrícolas
- ✓ Manejo de doenças



Padronização de protocolos

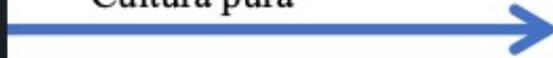
- ✓ Protocolos eficientes e reprodutíveis
- ✓ Extração de materiais com presença de:
 - ✓ Compostos inibitórios – comprometer a detecção
 - ✓ Polissacarídeos, compostos fenólicos, óleos, látex



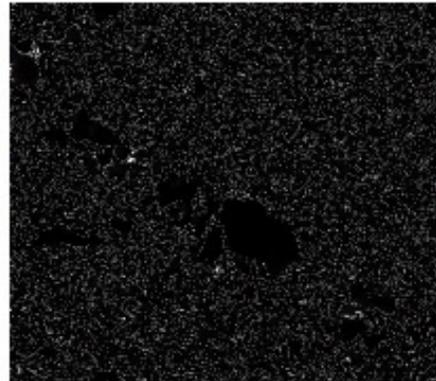
Desafios na análise sanitária de sementes por PCR



Cultura pura



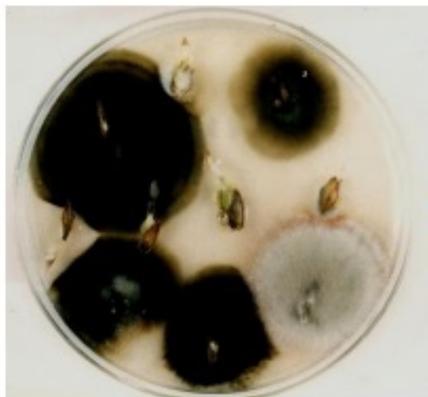
Sensibilidade elevada



Semente infectada
não incubada



Baixa sensibilidade relativa



Semente infectada

após incubação [Bio-PCR]



Aumento da sensibilidade

Desafios na análise sanitária de sementes por PCR

BIO-PCR

- ✓ Aumenta a biomassa de patógenos para a detecção
- ✓ EX.: Incubação de sementes por um período de 24 a 48 horas



Vantagens:

- ✓ detecção de células viáveis

Desvantagens:

- ✓ Aumento do tempo para diagnose
- ✓ Crescimento de outros microorganismos que podem interferir na detecção do organismo alvo

Preparo da amostra para análise molecular

Extração de ácidos nucleicos (DNA/RNA)

✓ Protocolos caseiros:

- ✓ Extração de DNA – CTAB – (Doyle & Doyle)
- ✓ Extração de DNA – Dellaporta
- ✓ Extração de RNA – TRIZOL

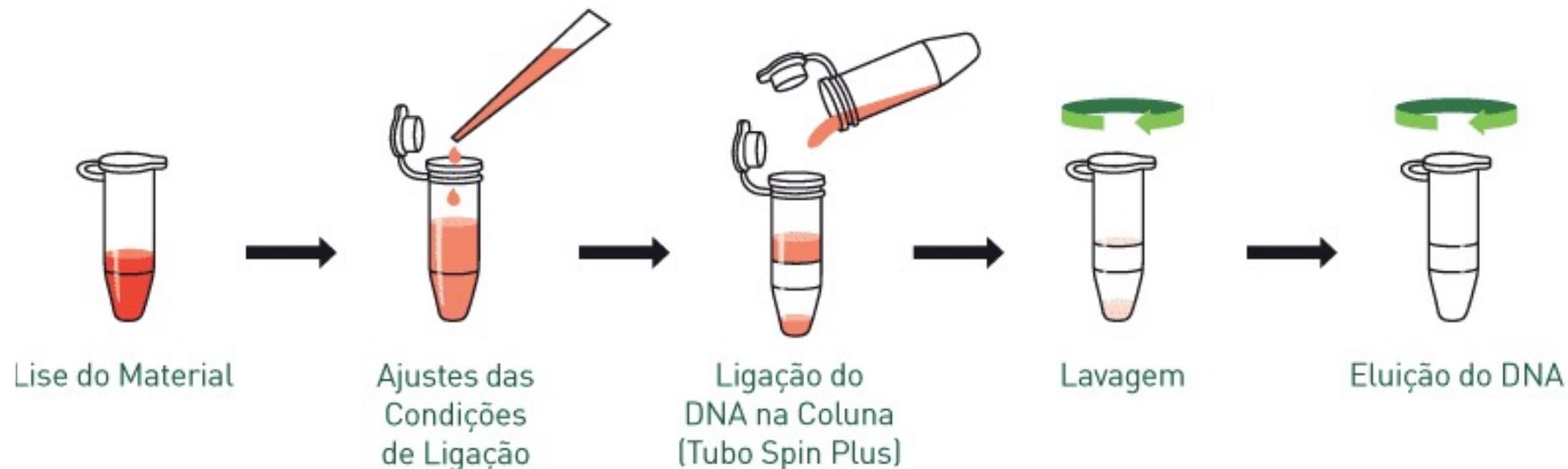
✓ Uso de kits comerciais:

- ✓ DNeasy e RNeasy Plant System – Qiagen
- ✓ Dneasy Power Soil Pro – Qiagen
- ✓ Soil DNA Kit - Omega
- ✓ Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega
- ✓ PureLink DNA/RNA Mini Kit - Invitrogen



Preparo da amostra para análise molecular - Extração

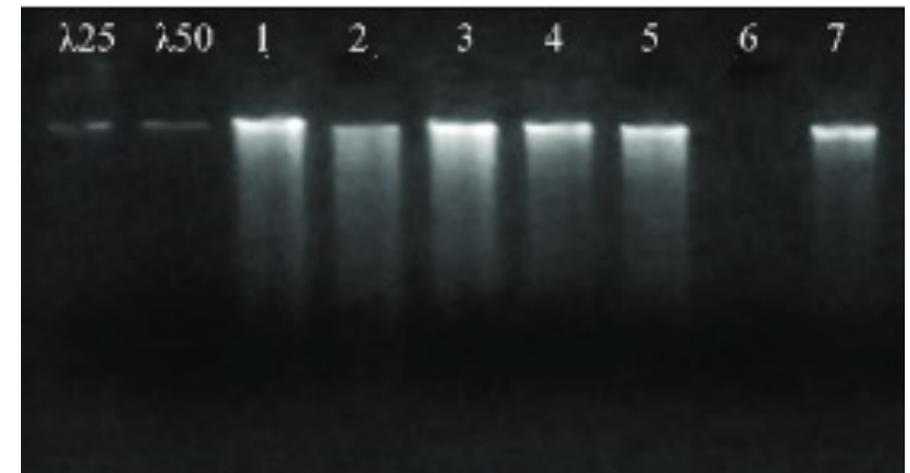
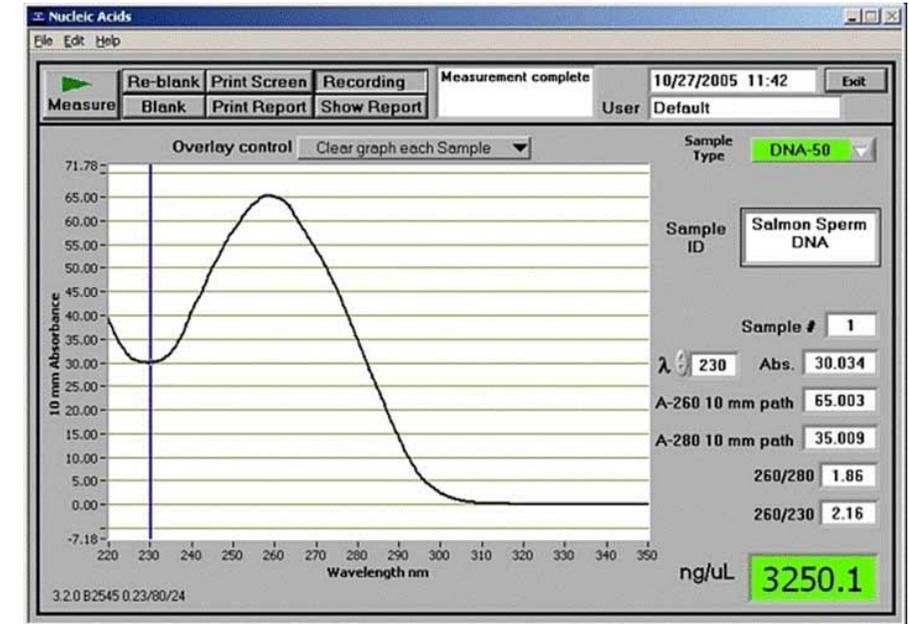
- **Etapa de Lise** – lise (quebra) da célula para expor o DNA
- **Precipitação** – etanol + sal – moléculas de DNA se agregam
- **Ligação** – uma membrana de sílica retém e concentra o DNA
- **Etapa de Lavagem** – quebrar e emulsionar a gordura e as proteínas que formam a membrana da célula
- **Etapa de Eluição** – por fim ocorre a liberação dos ácidos nucleicos (DNA/ RNA) da membrana



Qualidade da Extração

Quantificação

- ✓ Nanodrop
- ✓ Quantus
- ✓ Gel de agarose

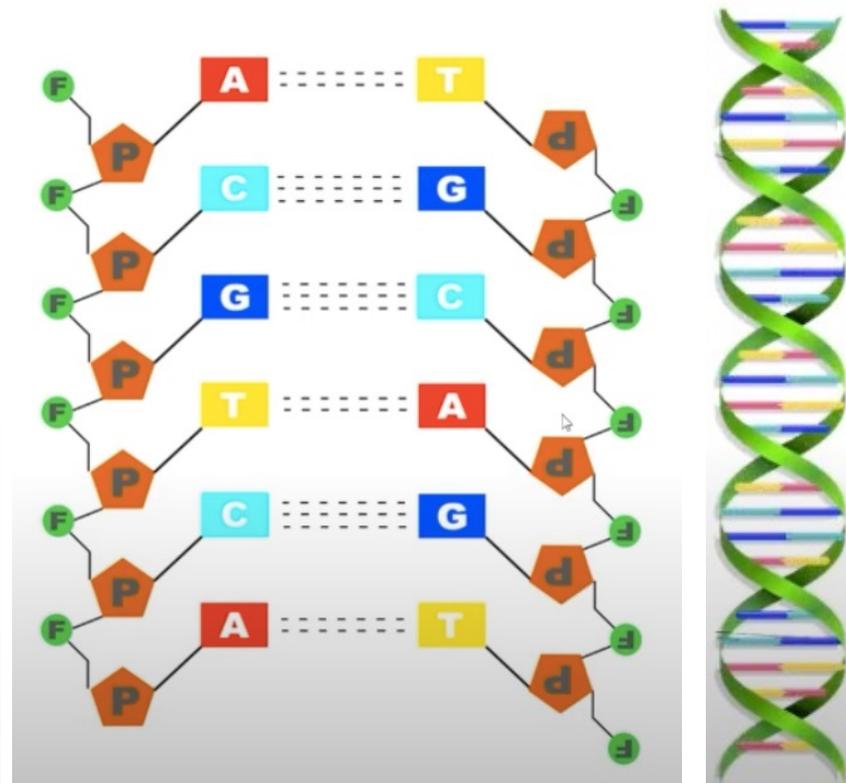
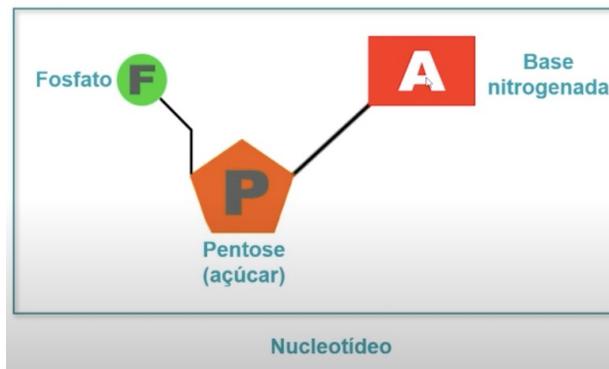
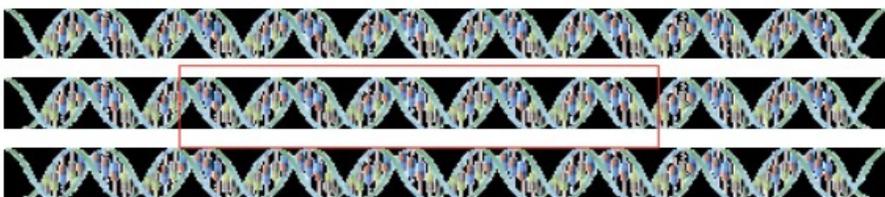


PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

- O que é PCR?

A PCR, é uma técnica para fazer muitas cópias de uma região específica do DNA, *in vitro*

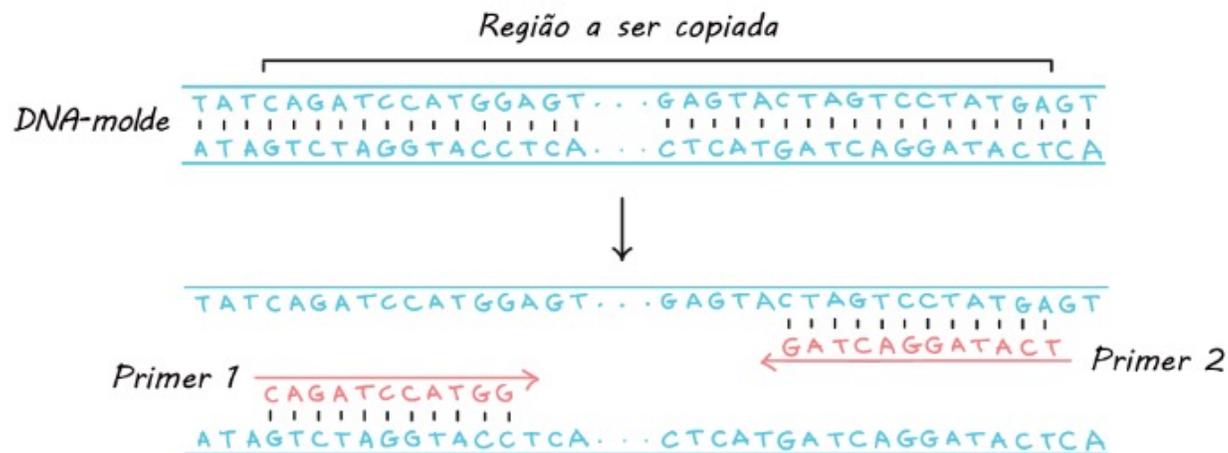
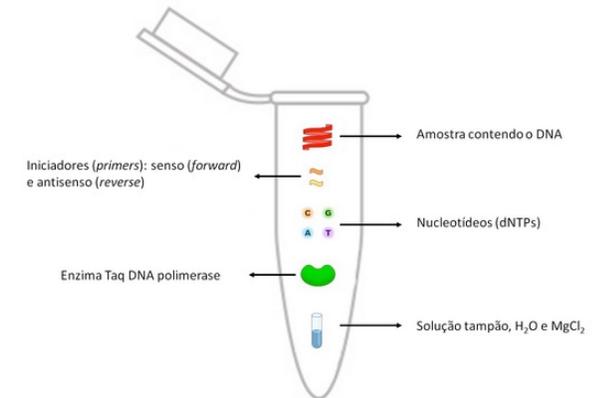
✓ Permitiu identificar, manipular e reproduzir o DNA em grandes quantidades

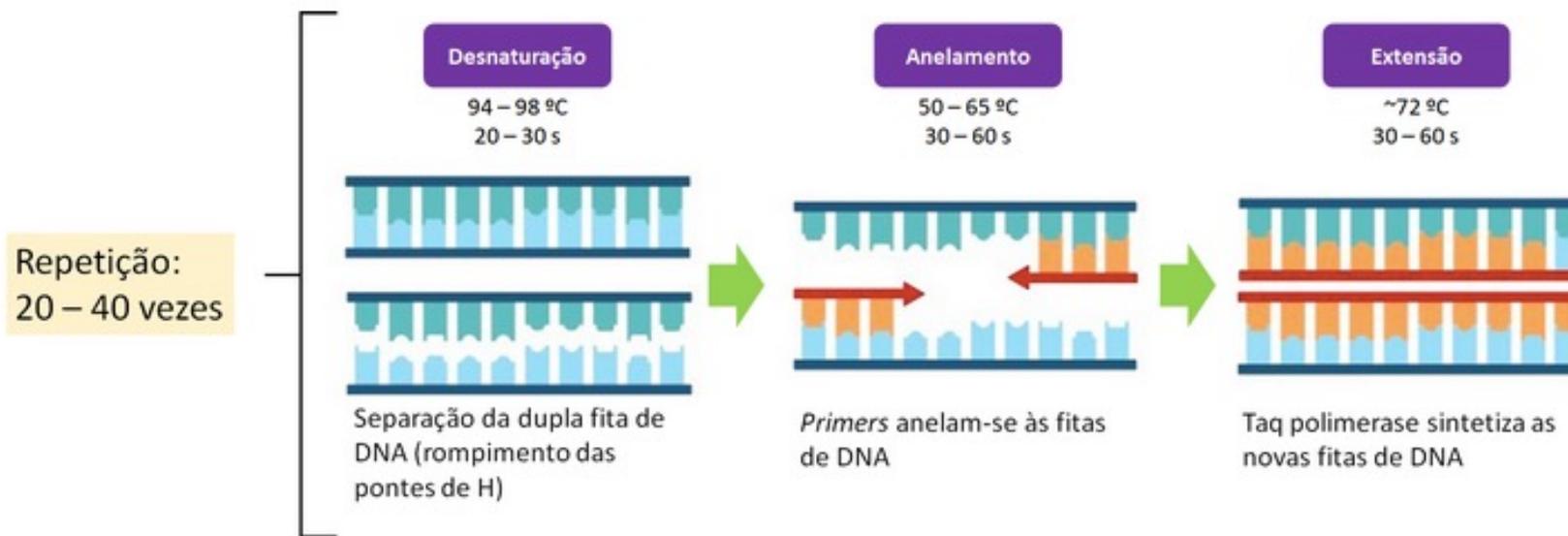
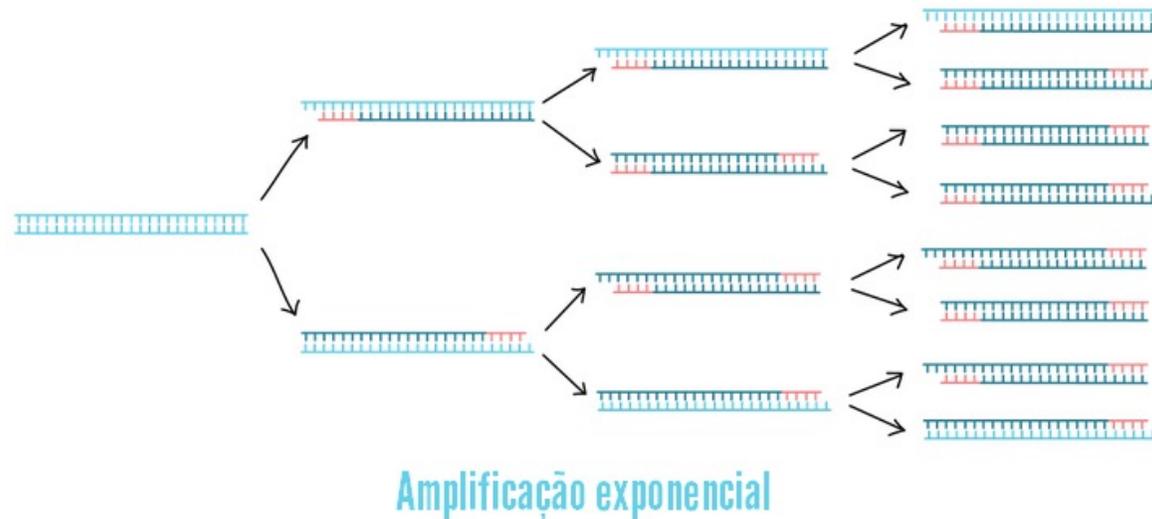
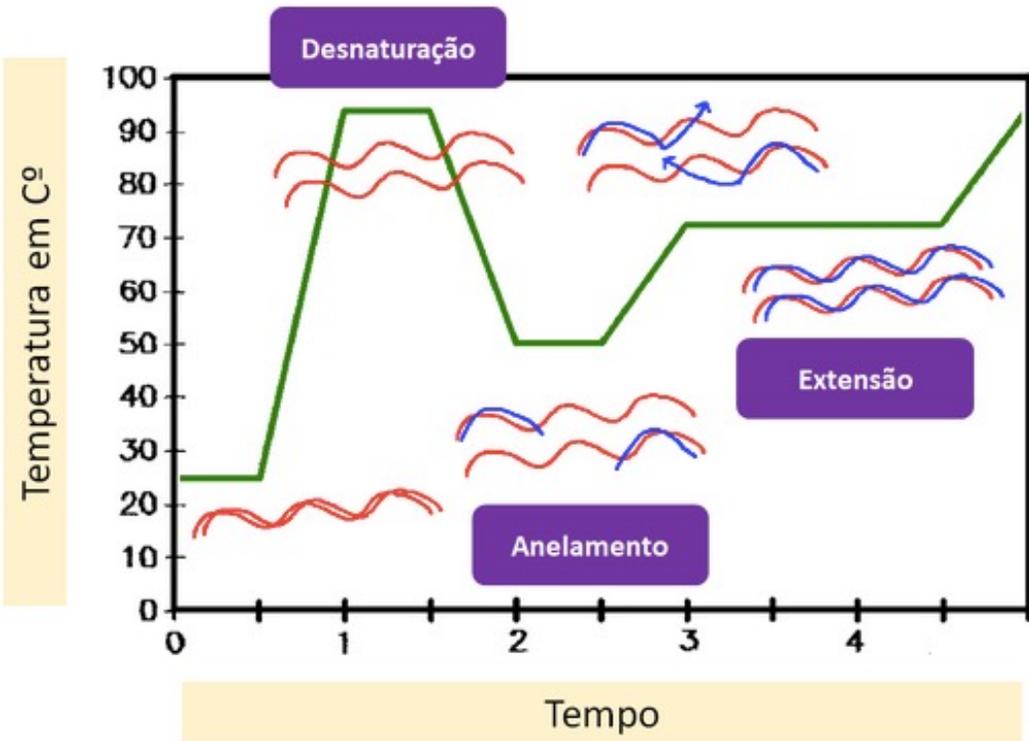


Componentes necessários

- **Componentes necessários**

- Amostra de DNA a ser testada;
- Par de iniciadores (**primers**): senso (*forward*) e antisenso (*reverse*);
- Enzima **Taq DNA polimerase**;
- Nucleotídeos (dNTPs);
- Solução tampão, água e cloreto de magnésio.





Ponto crítico – Condições de Primers

- ✓ Fragmentos curtos de DNA (18-27 nucleotídeos) complementar ao DNA alvo – ponto de partida para síntese de DNA
- ✓ Podem ser :
 - Específicos – única espécie
 - Universais – ITS para fungo e 16S para bactérias
- ✓ Tm: temperatura de melting – cálculo - $Tm = 2x (A+T) + 4x (C+G)$
- ✓ Conter de 40 a 60% de CG
- ✓ Evitar regiões repetidas – TTTTTT, AAAAAA, CGCGCGCG ...

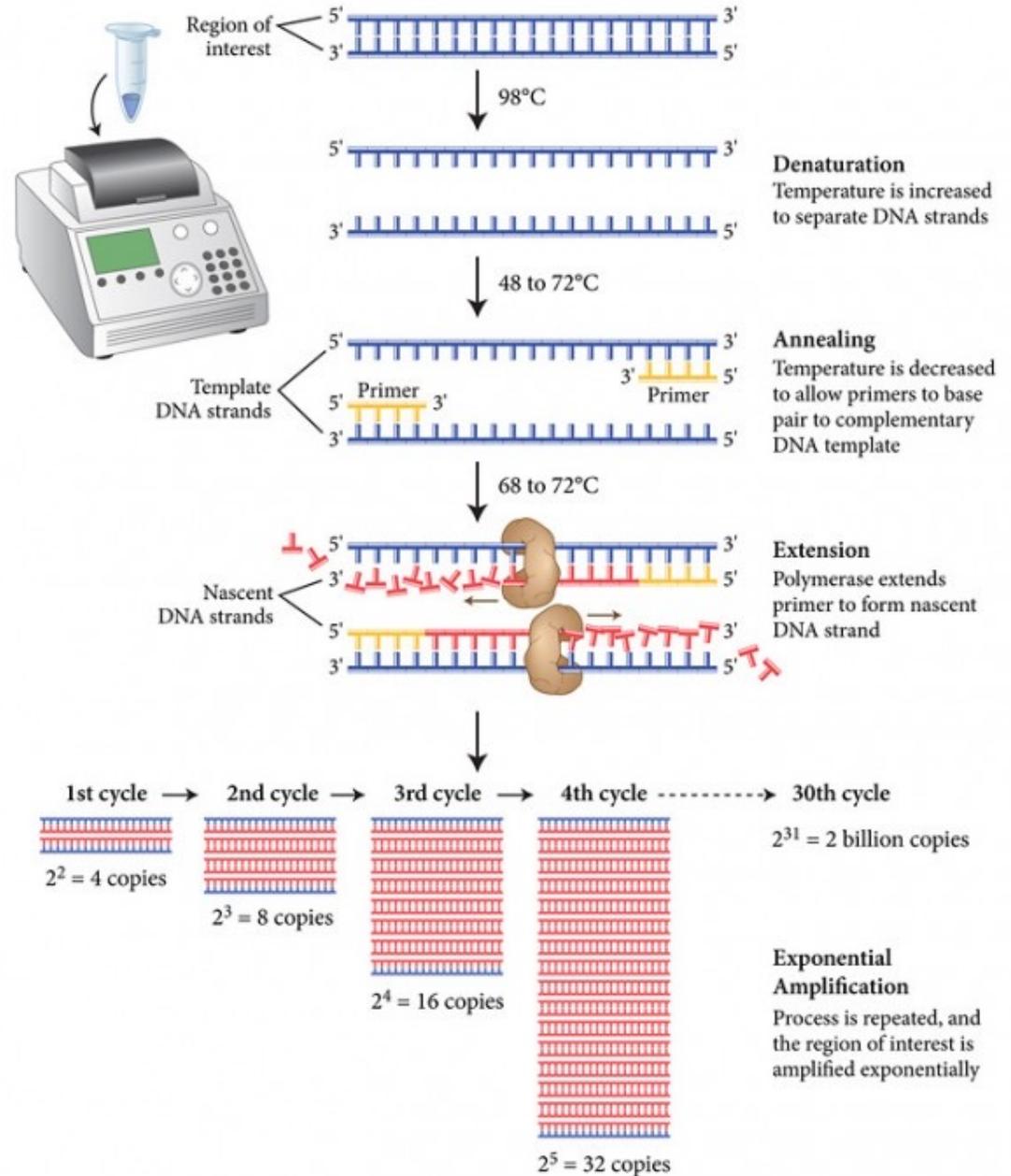


Fatores que afetam a temperatura e tempo de:

1) **Desnaturação:** 94-98 °C – Tempo: quantidade de CG

2) **Anelamento** geralmente 5°C menor que o Tm Temperatura de melting ou Tm

3) **Extensão** - Tamanho do fragmento - Taq = 1 minuto por 1 Kb amplificado

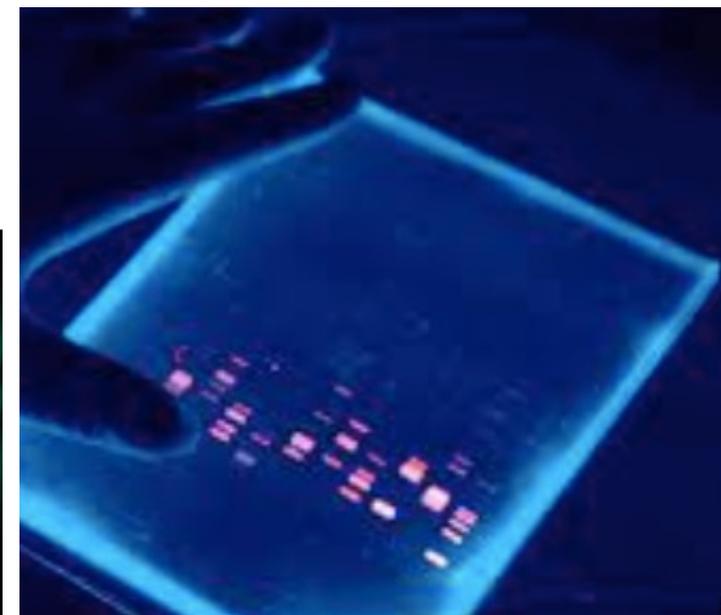
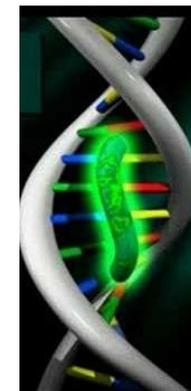
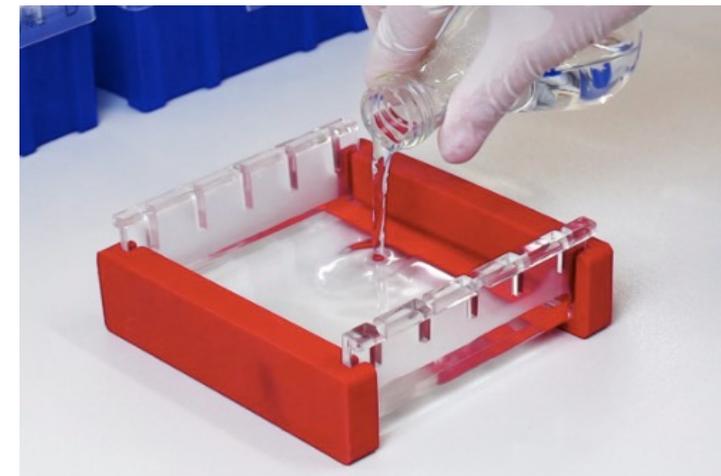


Visualização de Resultado - Amplificação

Gel de agarose (Concentração geralmente 1 %)

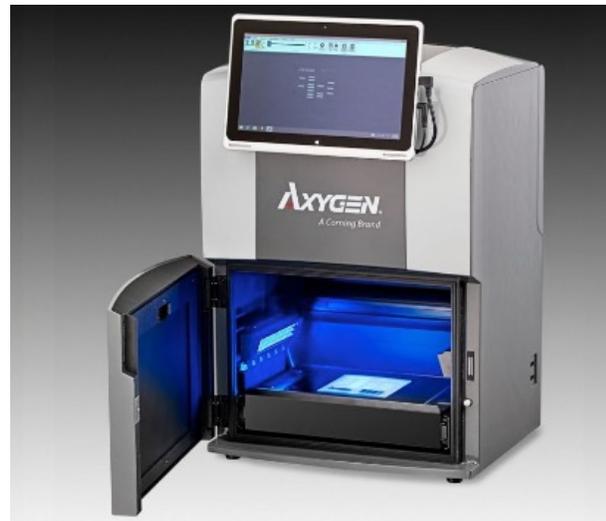
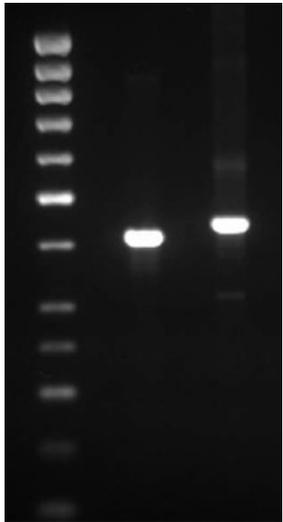
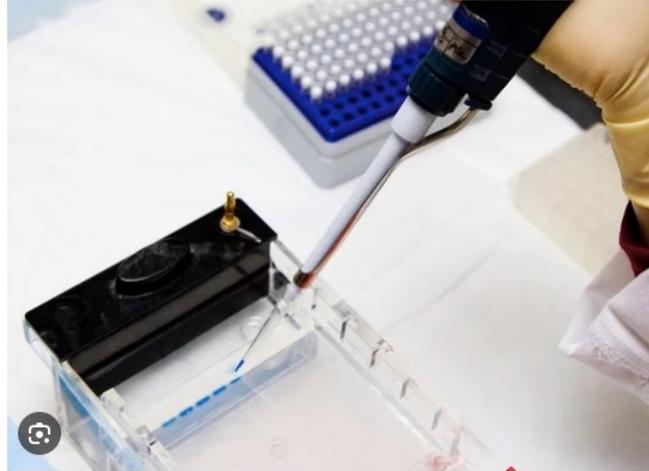
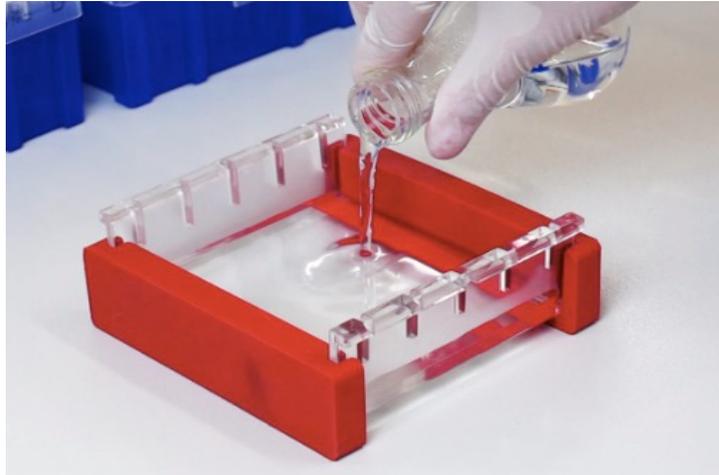
Componentes:

- Agarose
- Tampão: TBE (Tris/Borato/EDTA) ou TAE (Tris/acetato/EDTA)
- Intercalante de DNA: Sybr safe, gel red, brometo de etídio



Resultados

- Gel de agarose



Problemas comuns na PCR

1) Falsos positivos:

- ✓ Contaminação com amplicons – cópias idênticas da sequência nucleotídica do DNA molde
DNA da planta alvo

2) Falsos negativos:

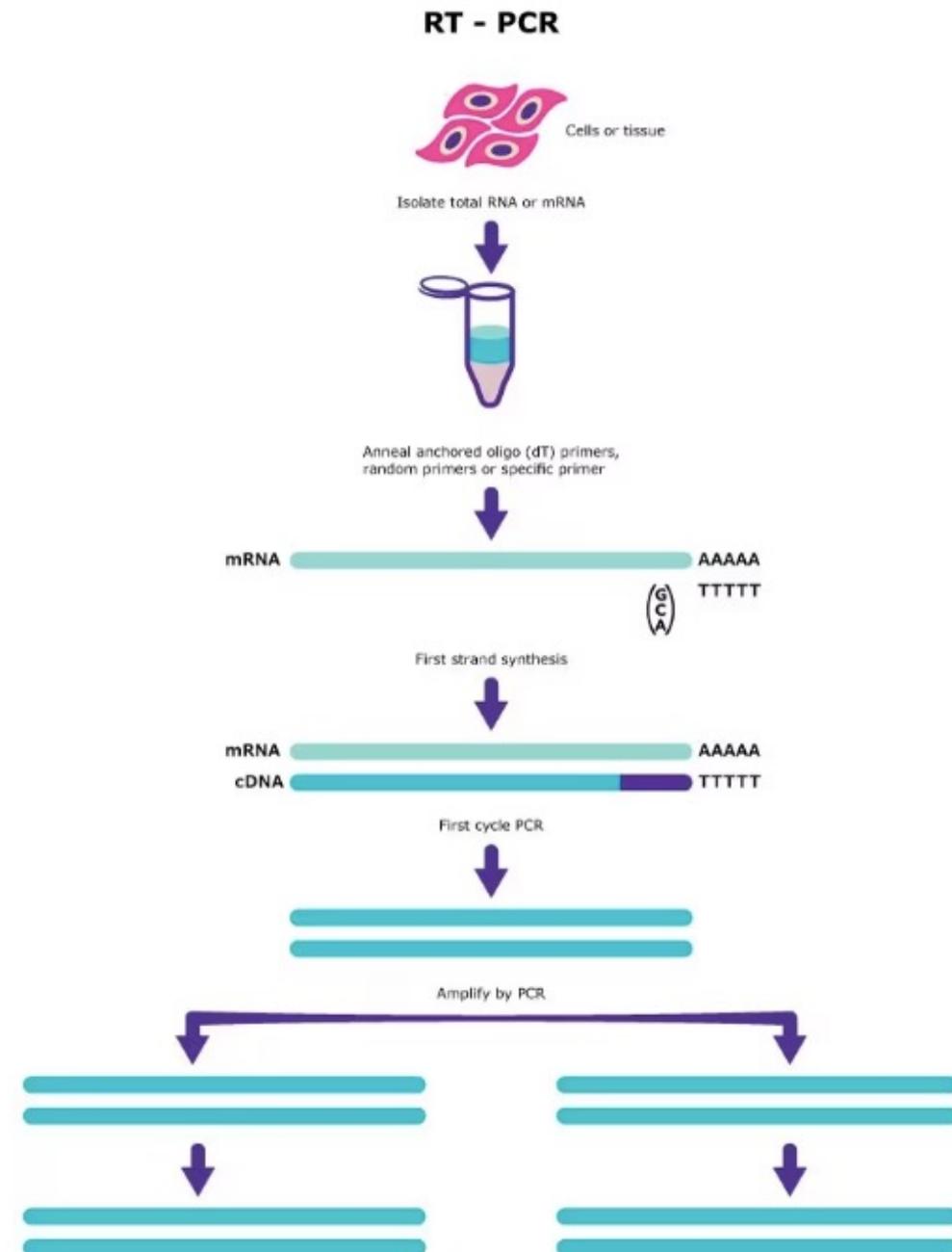
- ✓ DNA degradado
- ✓ Esquecimento de algum reagente
- ✓ Presença de compostos fenólicos na amostra
- ✓ Temperatura de anelamento de primer inadequada
- ✓ Concentração de primers inadequada

Variações da PCR

- ✓ RT-PCR
- ✓ Nested-PCR
- ✓ PCR multiplex
- ✓ PCR quantitativa em tempo real (qPCR)
- ✓ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)
- ✓ PCR digital

RT-PCR

- ✓ Detecção de vírus de RNA
- ✓ Transcrição reversa converte RNA em cDNA – amplificação por PCR
- ✓ Enzima RNA polimerase



RT-PCR

Tomato chlorosis virus



Cimbidium mosaic virus



Orthotospovirus – vira cabeça



Soybean mosaic virus

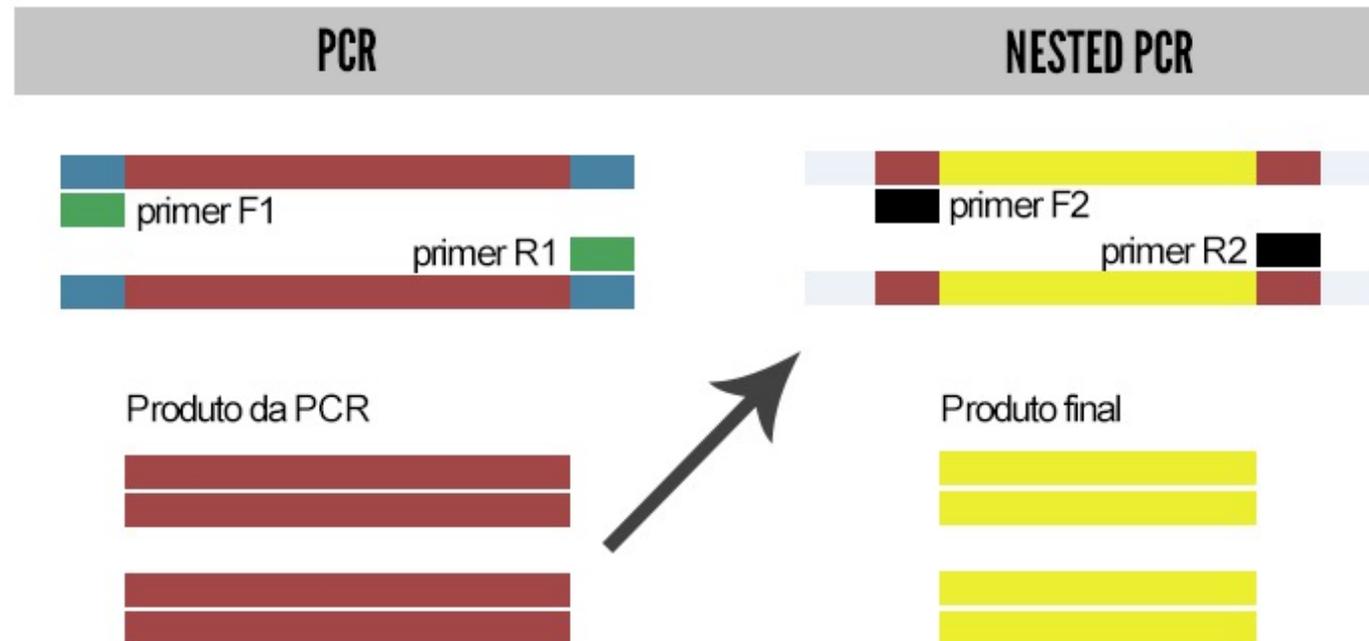


Pepper vein yellow virus



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



Journal of Phytopathology

Short Communication

Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of a Group 16Srl-B Phytoplasma Associated with Sugarcane Yellow Leaf Syndrome in Brazil

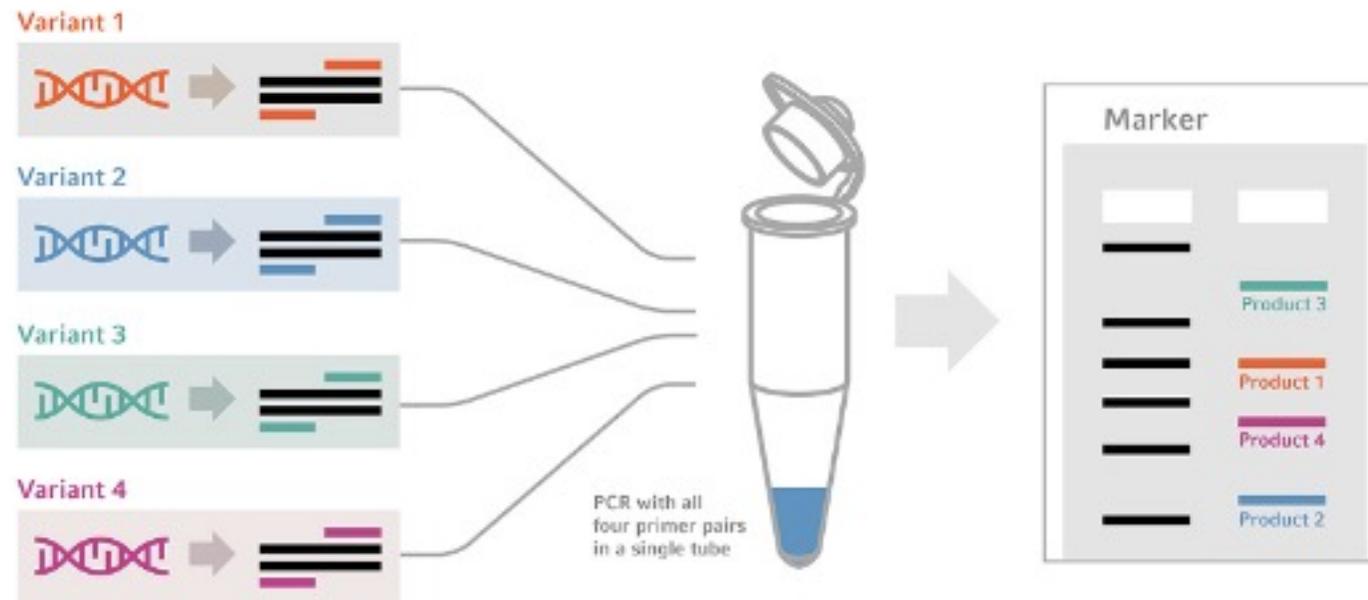
Eliane G. Silva, Ivan P. Bedendo, Marcos V. Casagrande, Vicente A. Moraes

First published: 04 November 2009 | <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01561.x> | Citations: 12

✉ *Department of Entomology and Plant Pathology, University of São Paulo; Sugarcane Technology Center, Piracicaba, São Paulo, Brazil*

PCR Multiplex

- ✓ Amplificação simultânea de múltiplos alvos na mesma reação – múltiplos patógenos na mesma planta – redução de custo
- ✓ Necessário compatibilidade entre iniciadores (*primers*)
- ✓ Diferentes tamanhos de fragmentos para cada alvo



PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

- ✓ Mesmo princípio da PCR Convencional
- ✓ Maior sensibilidade na detecção
- ✓ Além de detectar é possível quantificar o alvo de interesse
- ✓ Utiliza um componente fluorescente
- ✓ Software conectado ao computador



PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

- ✓ Resultados visualizados em tempo real
- ✓ Não há necessidade de gel para visualizar resultado
- ✓ Duas modalidades principais:
 - 1) SYBR
 - 2) TaqMan

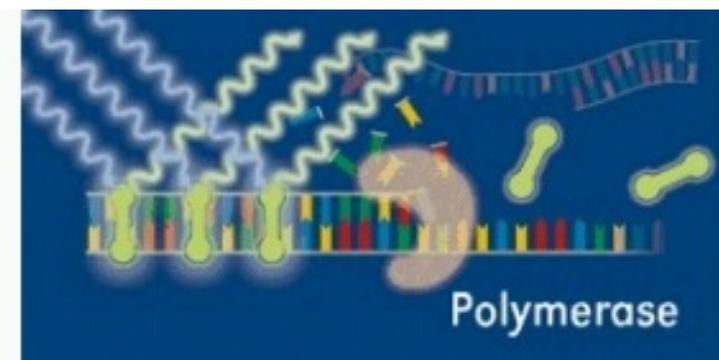
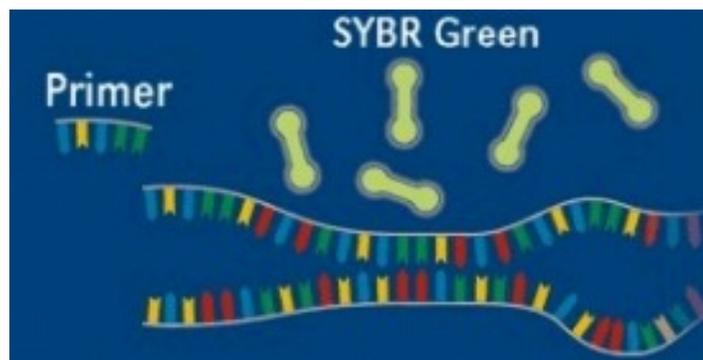


PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

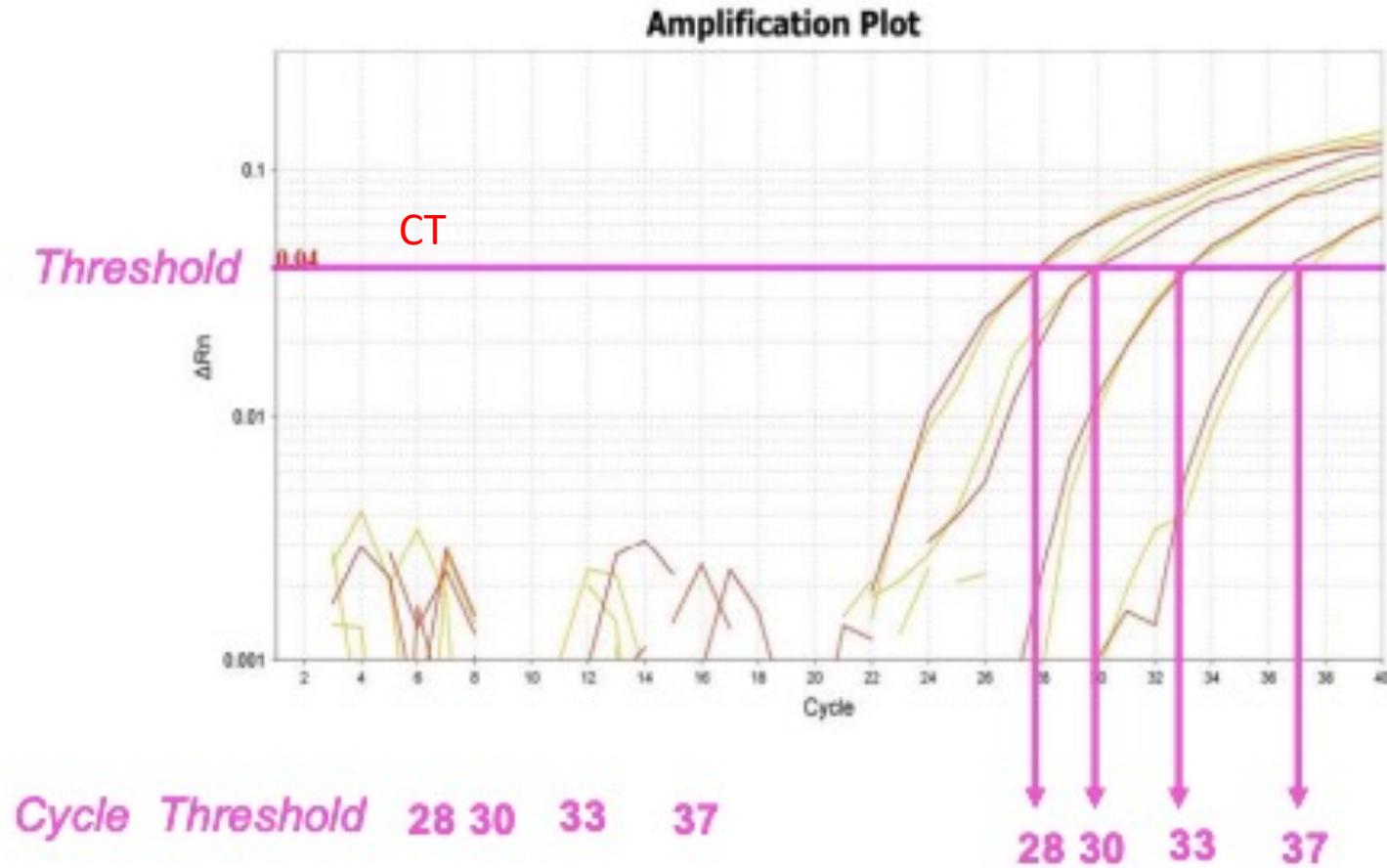
1) SYBRGreen

Componentes da reação

- ✓ DNA
- ✓ dNTPs (nucleotídeos)
- ✓ Primers sintéticos
- ✓ DNA polimerase
- ✓ Água
- ✓ Tampão
- ✓ Mg²⁺
- ✓ **Agente fluorescente**



Resultado qPCR



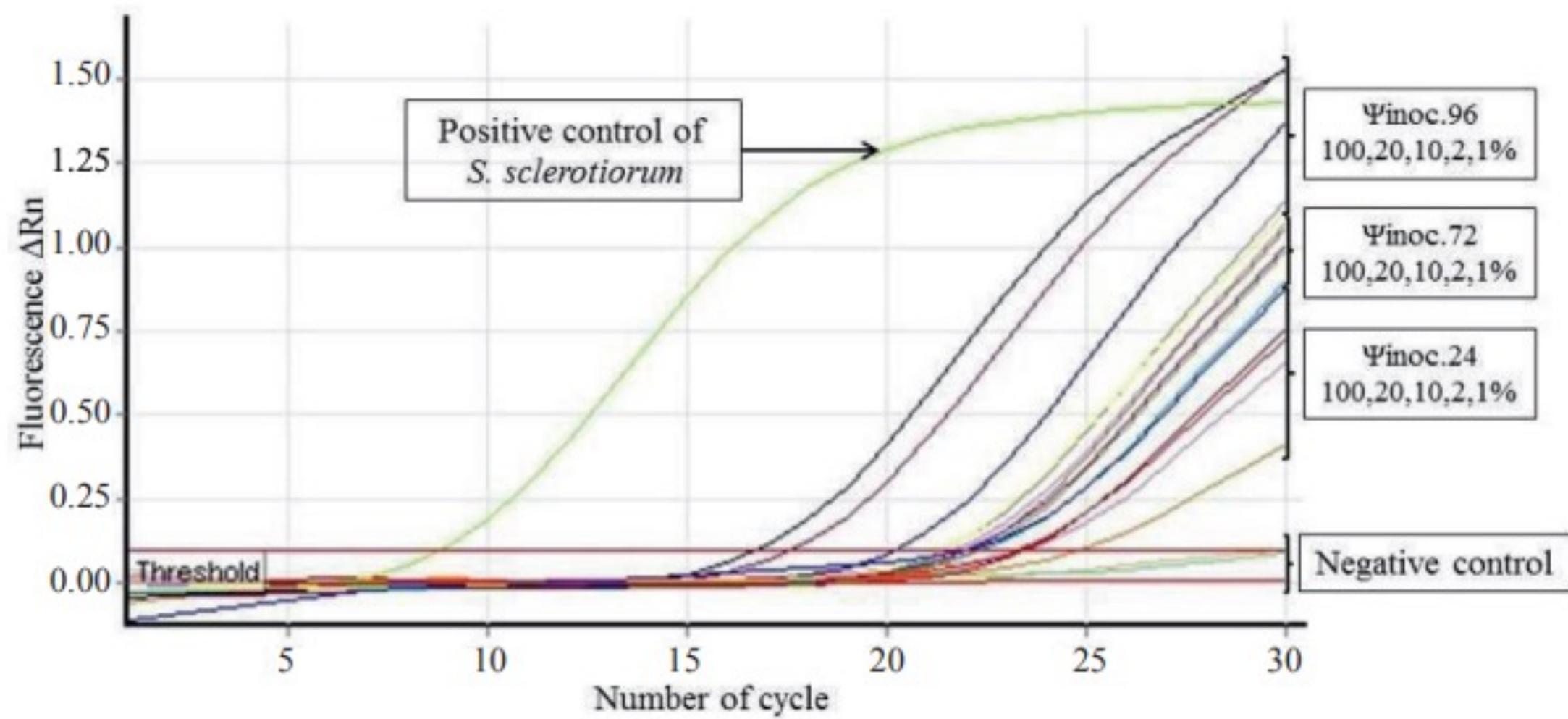
CT menor = maior concentração ou número de cópias iniciais

Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques¹

Luana da Silva Botelho², Ellen Noly Barrocas^{3*},
José da Cruz Machado⁴, Rayana de Sá Martins⁵

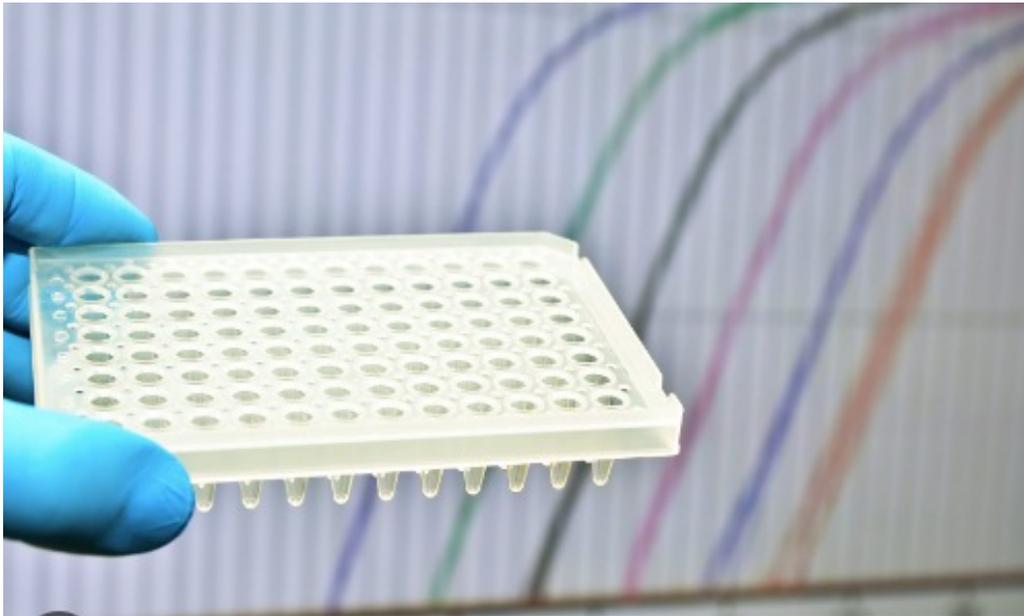
ABSTRACT - *Sclerotinia sclerotiorum*, the etiological agent of the “white mould” in soybean, is responsible for severe losses in this crop and soil contamination. The introduction and dissemination of the disease can be made through the use of seed lots contaminated with sclerotia and by seeds infected by mycelium. Therefore, seed health quality is one aspect to be monitored by means of health testing before sowing time. In this study conventional and quantitative PCR techniques were used to assess their viability to detect *S. sclerotiorum* in artificially and naturally infected soybean seed samples. For that, seeds were inoculated by osmotic conditioning technique for 0, 24, 48 and 72 hours of contact of the seed with the fungal colony and mixed with healthy seeds generating incidence levels of 1, 2, 10, 20 and 100% for each incubation time. The cPCR was sensitive to detect *S. sclerotiorum* in samples with at least incidence 1% inoculated for 72 hours while the qPCR detected the pathogen in all incidence/inoculum potential combinations. The conventional PCR was able to detect 0.25% of the incidence of *S. sclerotiorum* in soybean seed lots naturally infected added a preincubation step.

Index terms: seed healthy, molecular detection, seed borne pathogen, white mould.



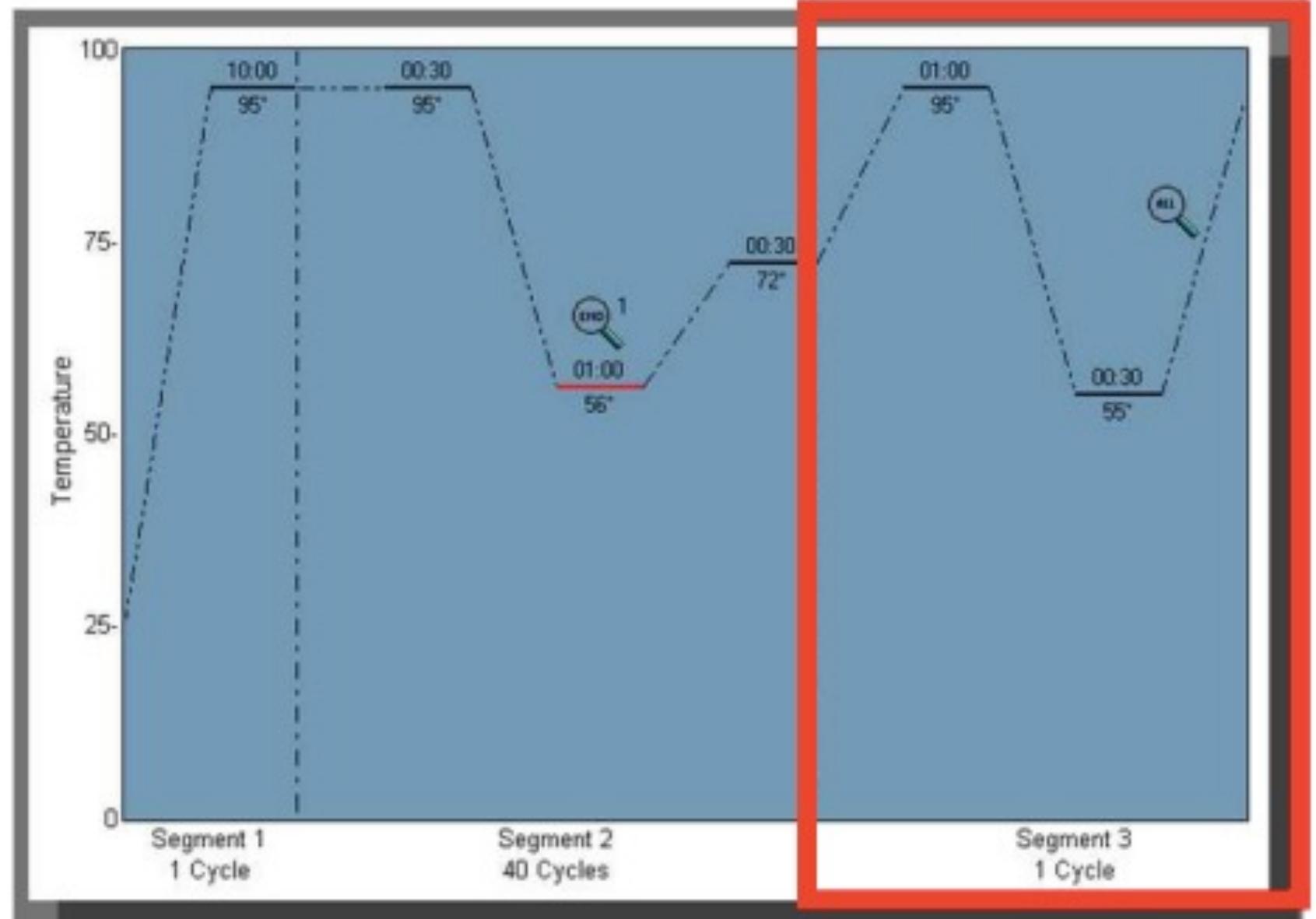
PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

- ✓ SYBRGreen realizado em duplicata ou triplicata
- ✓ Fragmentos menores

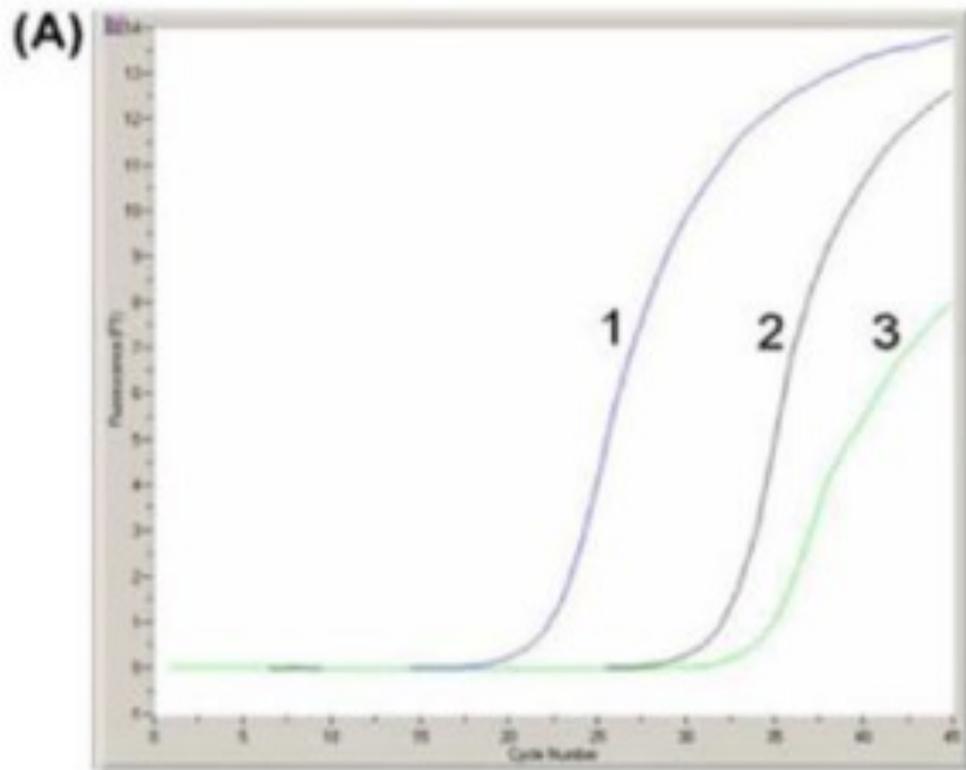


PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

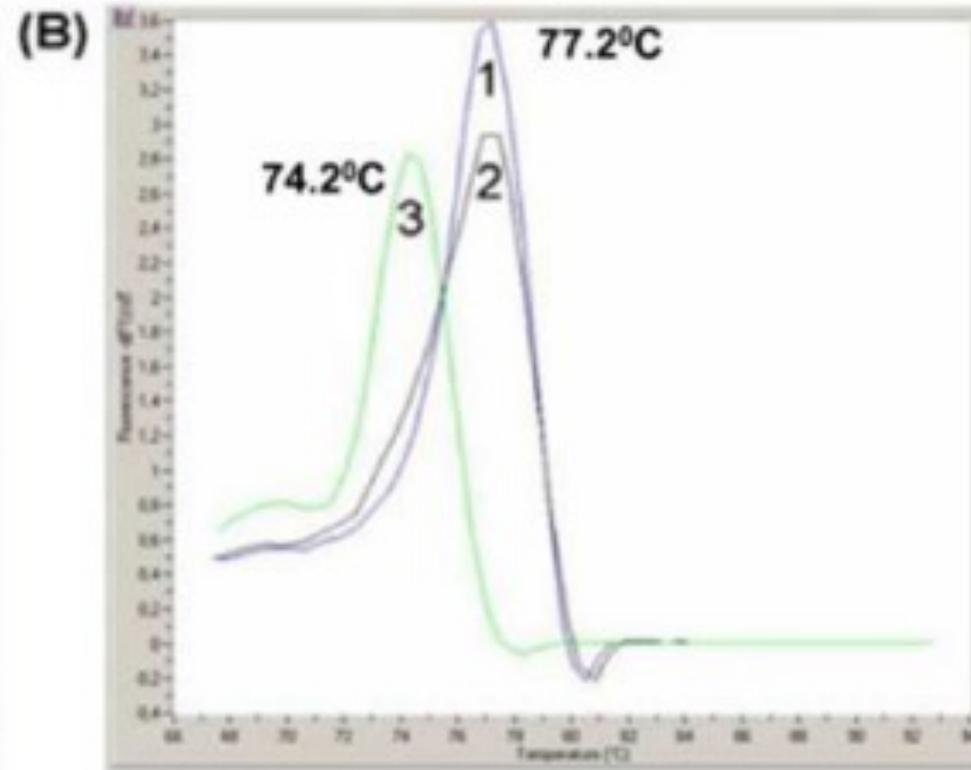
- Curva de dissociação (melting curve): permite verificar a especificidade do produto amplificado.



- Curva de dissociação (melting curve).



Amplification plot



Dissociation plot

- **Temperatura de melting (T_m):** temperatura na qual a metade do produto de PCR está dissociado e a outra metade está hibridado. Depende do conteúdo em guanina e citosina (G+C) e do tamanho de fragmento.

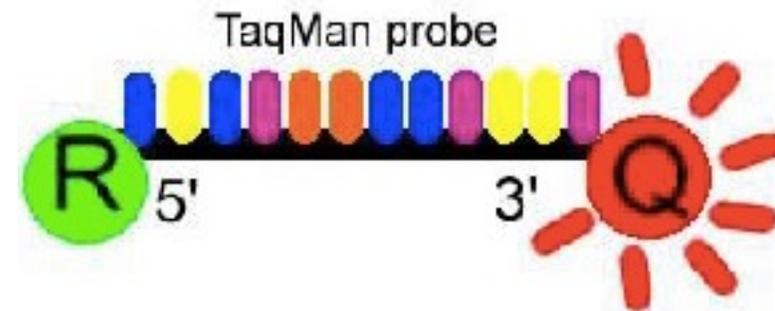
PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

2) TaqMan

Componentes da reação

- ✓ DNA
- ✓ dNTPs(nucleotídeos)
- ✓ Primers sintéticos
- ✓ DNA polimerase
- ✓ Água
- ✓ Tampão
- ✓ Mg²⁺
- ✓ Agente fluorescente
- ✓ Sonda

Sonda: Fragmento de aproximadamente 27 pares de bases,

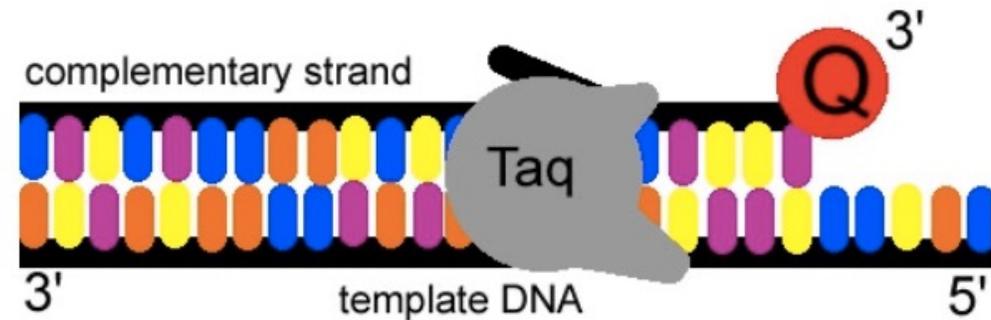
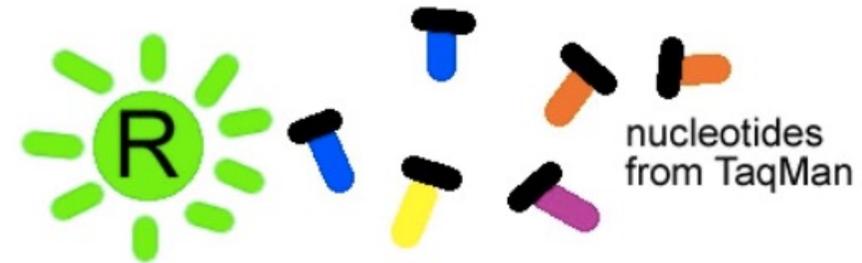
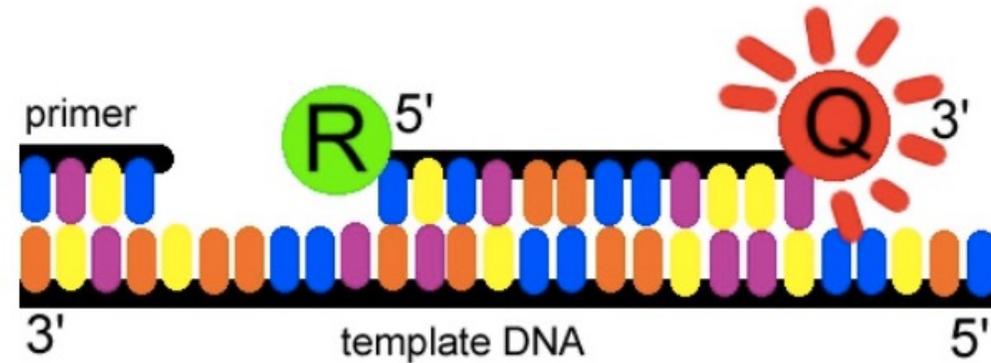


R = repórter – emite fluorescência
Q = quencher – Inibe o repórter

PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

2) TaqMan

R = repórter – emite fluorescência
Q = quencher – Inibe o repórter

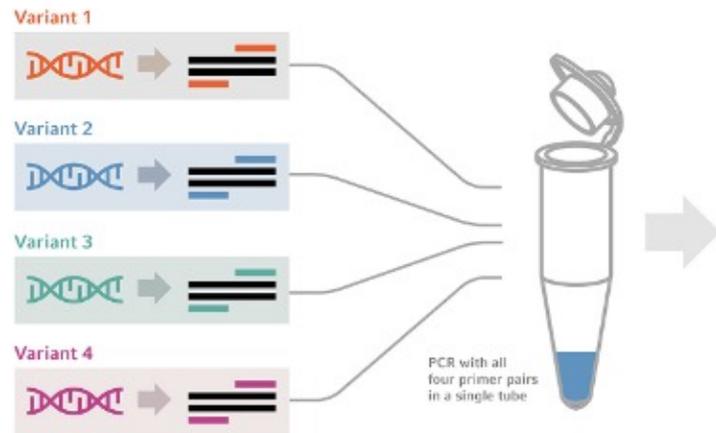


PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

2) TaqMan

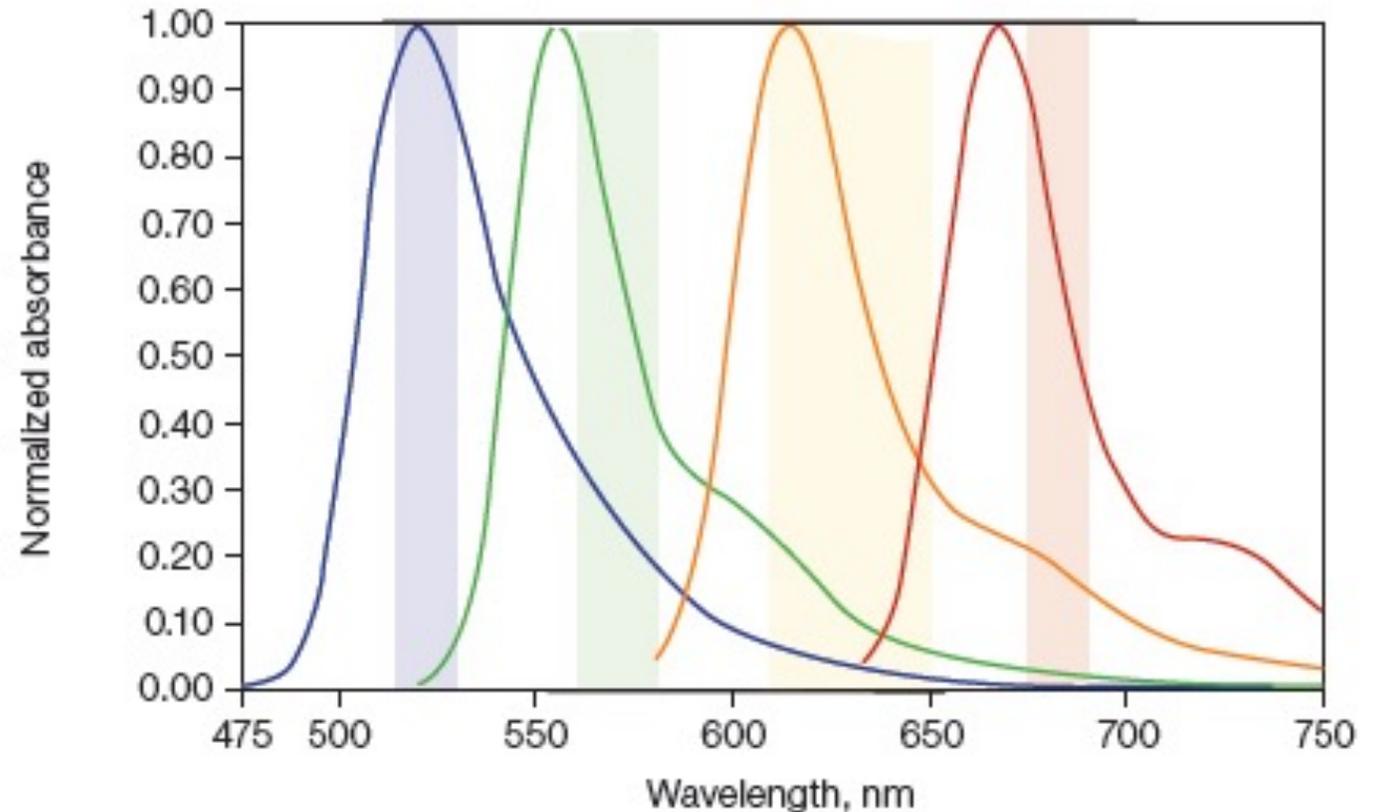
Vantagens

- ✓ Podem ser testados vários alvos em uma mesma reação



Detection

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

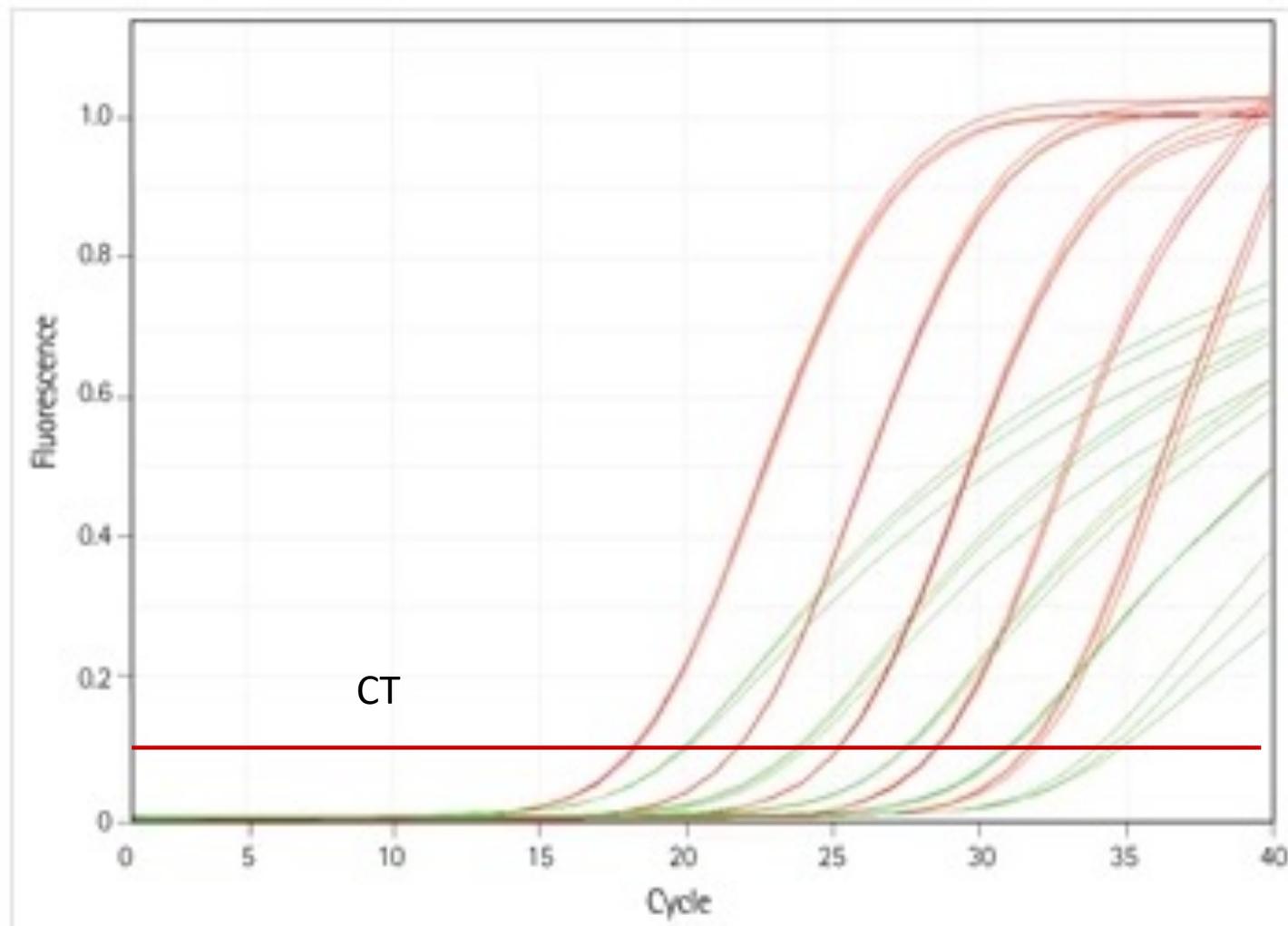


PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

2) TaqMan

Vantagens

- ✓ Maior especificidade na detecção
- ✓ Não há necessidade de realizar triplicatas
- ✓ Baixo custo – economia de reagentes e placas

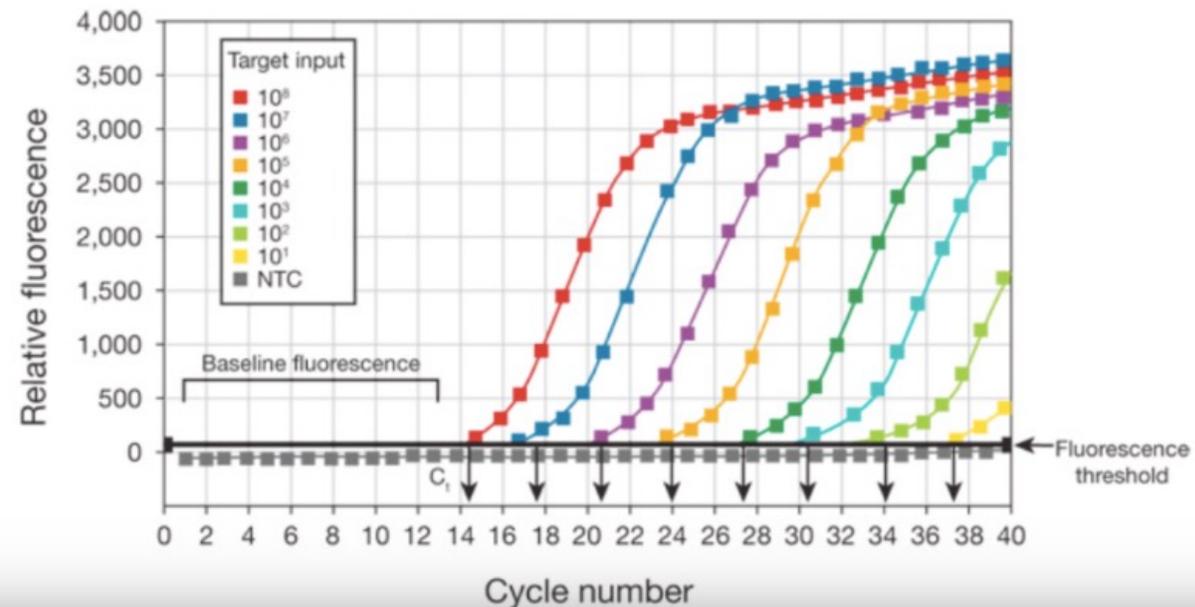
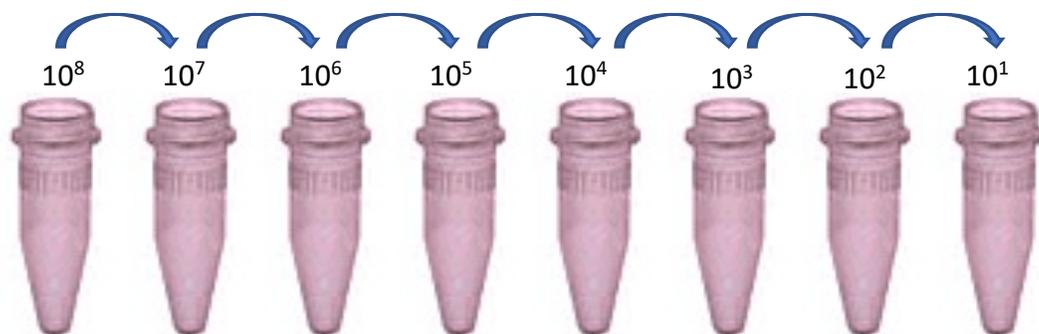


Quantificação relativa : método CT comparativo

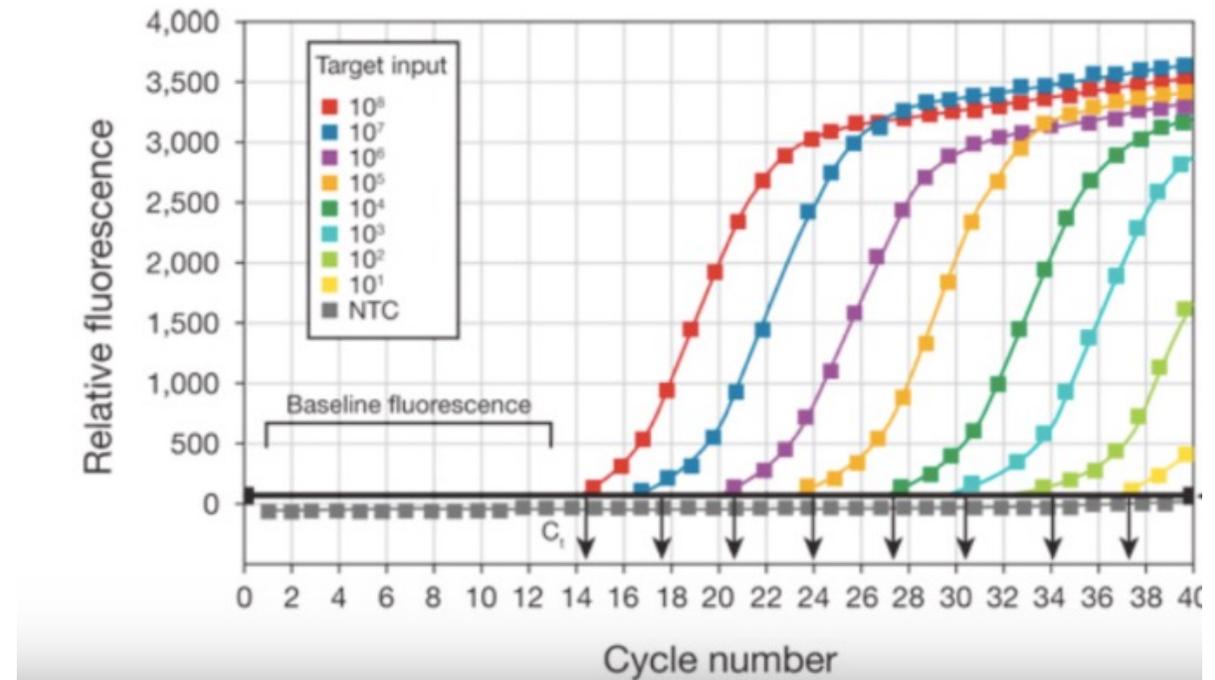
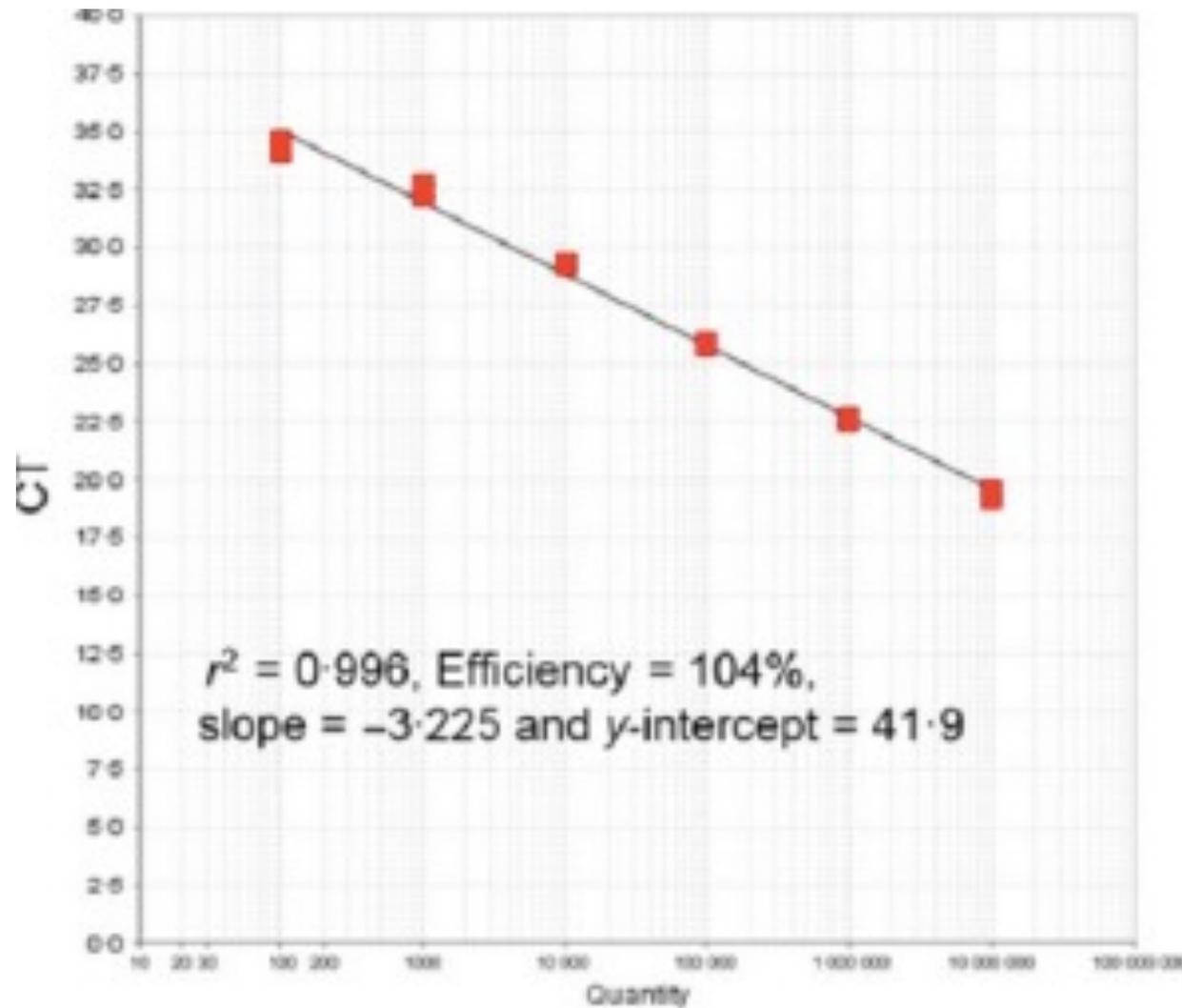
Quantificação absoluta – Curva de quantificação

Passos para construção da curva

- ✓ Reação de PCR convencional com o par de Primers alvo
- ✓ Purificação do produto de PCR
- ✓ Quantificação do produto purificado
- ✓ Cálculo para diluição do produto estipulando a maior concentração de interesse
- ✓ Diluições seriadas



qPCR – Curva de quantificação



Received: 15 August 2018

Revised: 7 February 2019

Accepted: 12 February 2019

DOI: 10.1111/jph.12796

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Journal of
Phytopathology

Quick and accurate detection of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phomopsis* spp. in soybean seeds using qPCR and seed-soaking method

Juliana Ramiro^{1*} | Maisa Ciampi-Guillard^{1*}  | Danielle Gregório Gomes Caldas² | Maria Heloísa Duarte de Moraes¹ | Marina Coan Goldoni Barbieri¹ | Wagner Vicente Pereira³ | Nelson Sidnei Massola Jr.¹ 

qPCR – Exemplos práticos

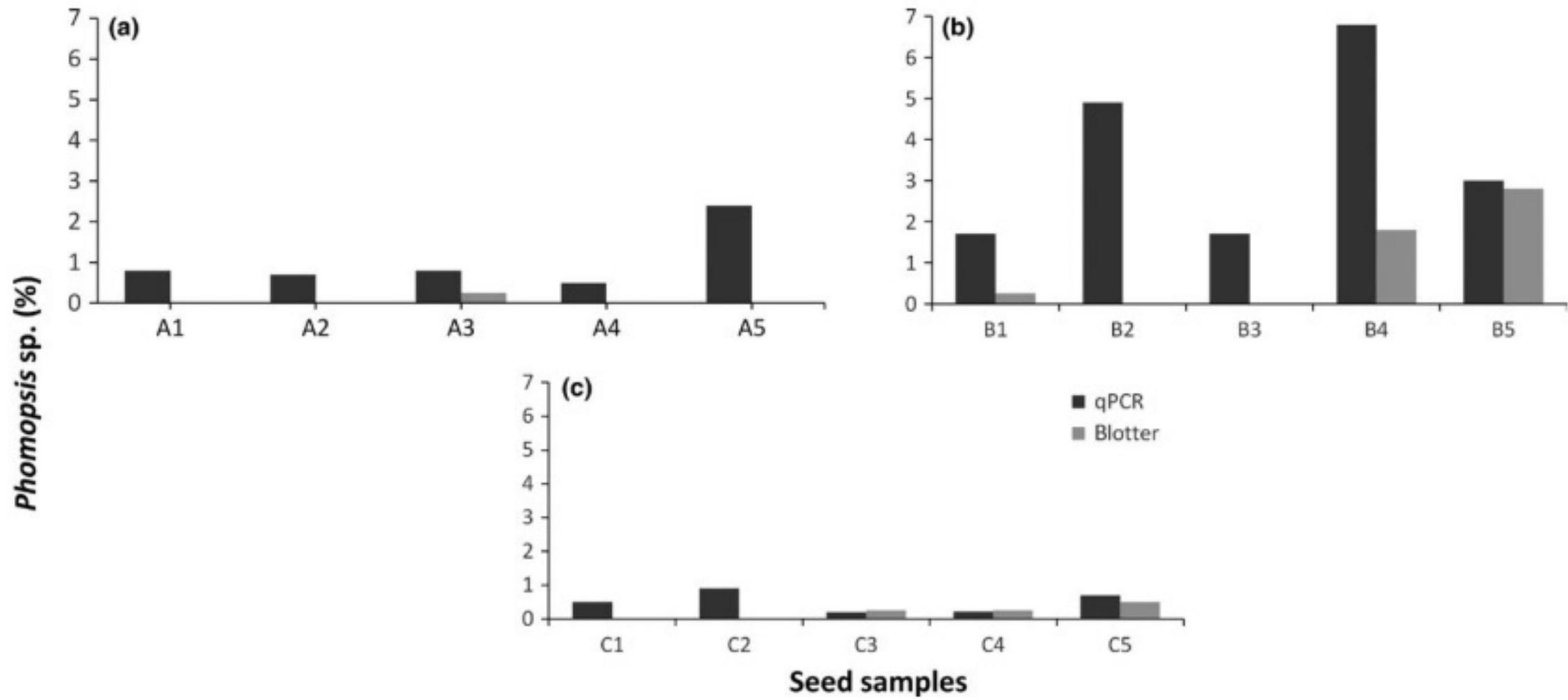


FIGURE 2 Comparative incidence of *Phomopsis* spp. in naturally infected soybean seed samples from the states of Goiás (a), Minas Gerais (b) and Paraná (c) evaluated by two detection methods: qPCR (in dark grey) and blotter test (in light grey)

Plant Disease • 2020 • 104:3002-3009 • <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0231-RE>

*e-Xtra**

Multiplex qPCR Assay for Direct Detection and Quantification of *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, and *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean Seeds

Maísa Ciampi-Guillardi, Juliana Ramiro, Maria Heloisa Duarte de Moraes, Marina Coan Goldoni Barbieri, and Nelson S. Massola Jr.†

Department of Plant Pathology and Nematology, ESALQ, University of São Paulo, Piracicaba/SP, Brazil

qPCR – Exemplos práticos

Table 1. Primers and TaqMan probes used for qPCR detection of pathogenic fungi in soybean seeds

Primers and probes	Sequence (5' - 3')	Target	Reference
ColT-F6	TTGAGACCAAGTAC GCTGTATGTATCAC	<i>Colletotrichum truncatum</i>	This study
ColT-R5	TTCTGCCTCACATCGAACTCTC		
ColT-P	HEX-CAGCCTTCG/ZEN/ACTCTCGTTGGAAAA-IABkFQ	<i>Corynespora cassiicola</i>	This study
Cory-F1	AACTCAACACCATGACGCACAT		
Cory-R6	CAGGCAGGCAGGACAAGAAAATTTG		
Cory-P	6-FAM-CCAATTTTG/ZEN/CATCGCCAGCC-IABkFQ	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Chen et al. (2010)
TY-F	ATATAACGCTACTCTCTCTGTTC		
TY-R	AGCCAACCTTTCGGAGATTTG		
TY-P	Cy5-CGAGAACTC/ZEN/TGACGAGACCTTCTGTA-IABkFQ	<i>Glycine max</i>	Soares et al. (2014)
Lectin-F	TCCACCCCATCCACATTT		
Lectin-R	GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA		
Lectin-TMP	TAMRA-AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG-IAbRQSp		

qPCR – Exemplos práticos

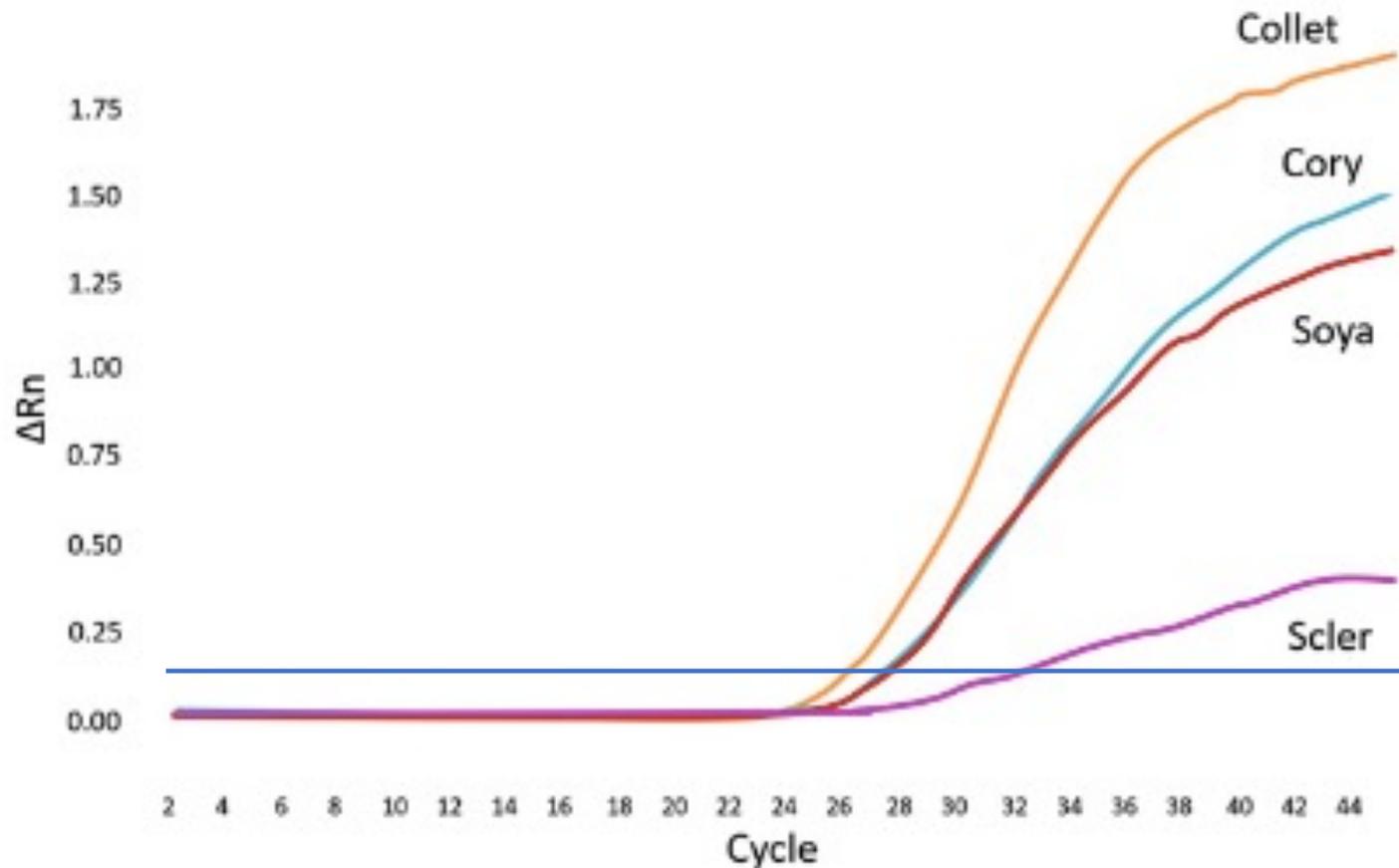
Table 4. Multiplex qPCR detection of *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, and *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed samples from five Brazilian states^a

Origin of soybean seed samples	N	<i>C. truncatum</i>		<i>C. cassiicola</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
		Mean C _T	qPCR +	Mean C _T	qPCR +	Mean C _T	qPCR +
Goiás	30	36.44	(16/30)	35.73	(4/30)	36.94	(8/30)
Minas Gerais	16	36.91	(8/16)	36.68	(2/16)	38.21	(9/16)
Paraná	20	38.06	(6/20)	38.30	(2/20)	39.90	(7/20)
Rio Grande do Sul	3	36.41	(1/3)	34.25	(1/3)	38.72	(1/3)
Mato Grosso	12	40.66	(1/12)	38.45	(5/12)	39.90	(2/12)
Total	81		32		14		27

^a Samples with threshold cycle (C_T) values below the limit of detection (estimated for each fungus) were considered positive.

qPCR – Exemplos práticos

✓ Detecção por qPCR triplex – Taqman – sondas fluorescentes



Necessário:

- ✓ Teste de sensibilidade e eficiência
- ✓ Teste de especificidade

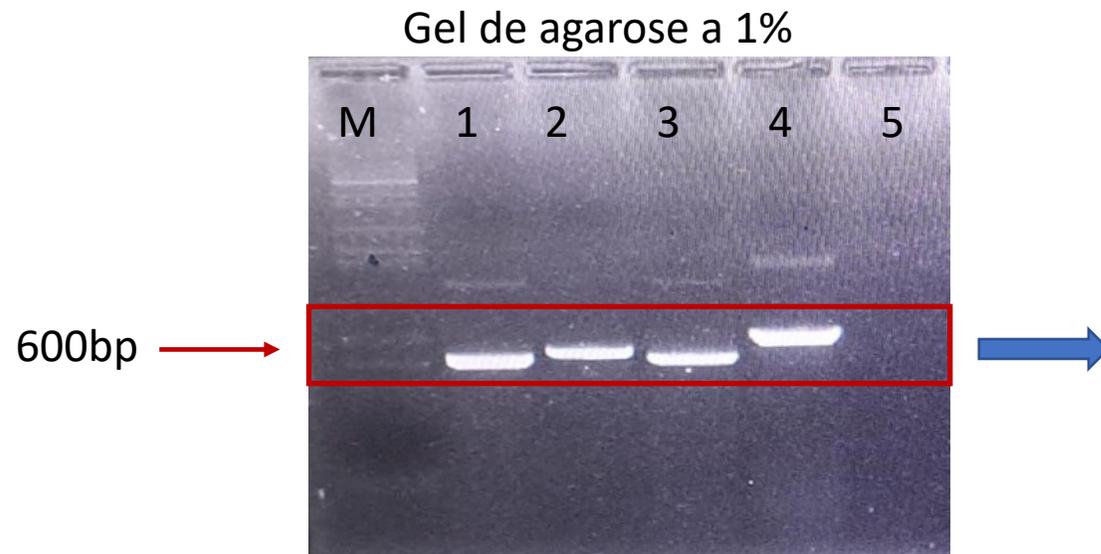
Resultado - Aula Prática

✓ **Extração de DNA e PCR com primer universal ITS1/ITS4**

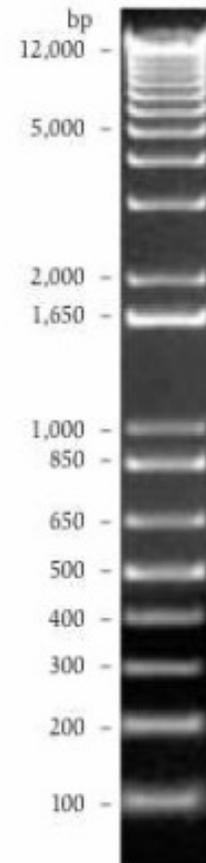
✓ **Amostras:**

1. Colônia isolada de *Fusarium* sp.
 2. Colônia isolada de *Macrophomina phaseolina*
 3. Semente de milho pré-incubada com crescimento de *Fusarium* sp.
 4. Semente de soja sem incubação com sintomas de mancha purpura
 5. Controle negativo – água livre de DNase
- M. Marcador de tamanho molecular – 1 kb plus

1 kb plus - padrão de tamanho molecular



Todas as amostras mostraram resultado positivo, porém a confirmação deve ser feita com sequenciamento do produto do PCR



Resultado - Aula Prática

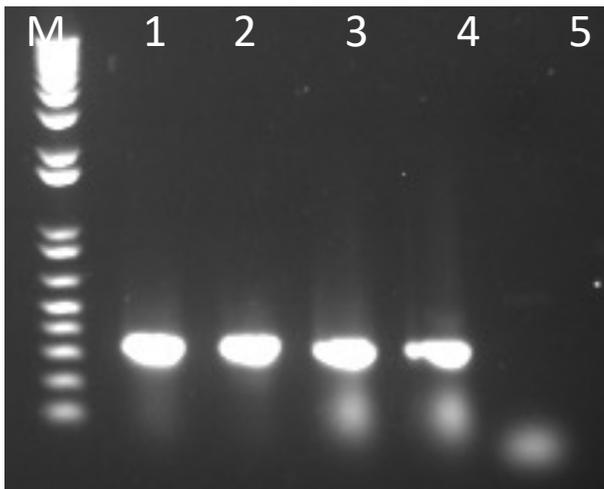
Extração de DNA e PCR com primer universal FF390/ FFR1 (18S rRNA)

✓ Amostras:

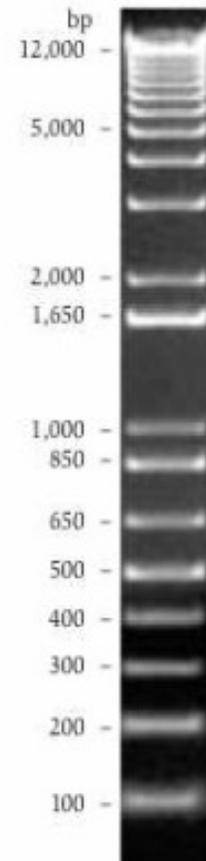
1. Colônia isolada de *Fusarium* sp.
 2. Colônia isolada de *Macrophomina phaseolina*
 3. Semente de milho pré-incubada com crescimento de *Fusarium* sp.
 4. Semente de soja sem incubação com sintomas de mancha purpura
 5. Controle negativo – água livre de DNase
- M. Marcador de tamanho molecular – 1 kb plus

1 kb plus - padrão de tamanho molecular

Gel de agarose a 1%

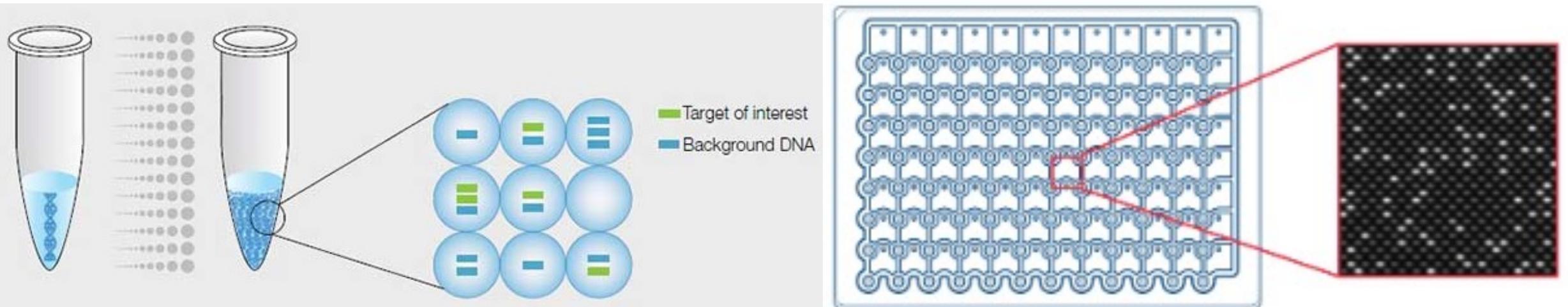


Todas as amostras mostraram resultado positivo, porém a confirmação deve ser feita com sequenciamento do produto do PCR

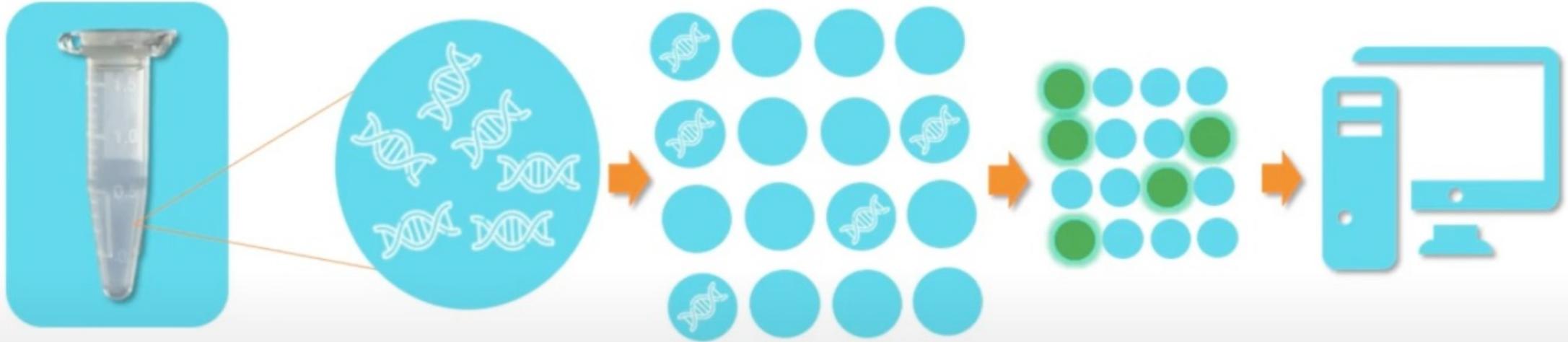


PCR Digital

- ✓ Utiliza o mesmo princípio da qPCR
- ✓ Utilizado para detecção e quantificação de alvos específicos
- ✓ Quantifica eventos raros
- ✓ Não há necessidade de curva padrão
- ✓ Capacidade de multiplex – até 5 alvos
- ✓ A amostra é particionada em micro compartimentos individuais



PCR Digital

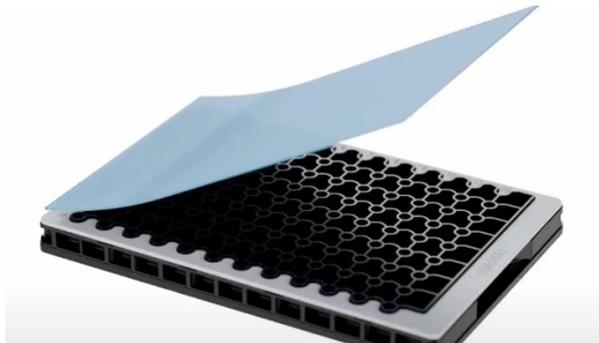


Amostra original +
ingredientes da qPCR

Particionamento +
PCR

Detecção de
fluorescência

Quantificação absoluta
(distribuição de Poisson)



	1	2	3
A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Analyze per

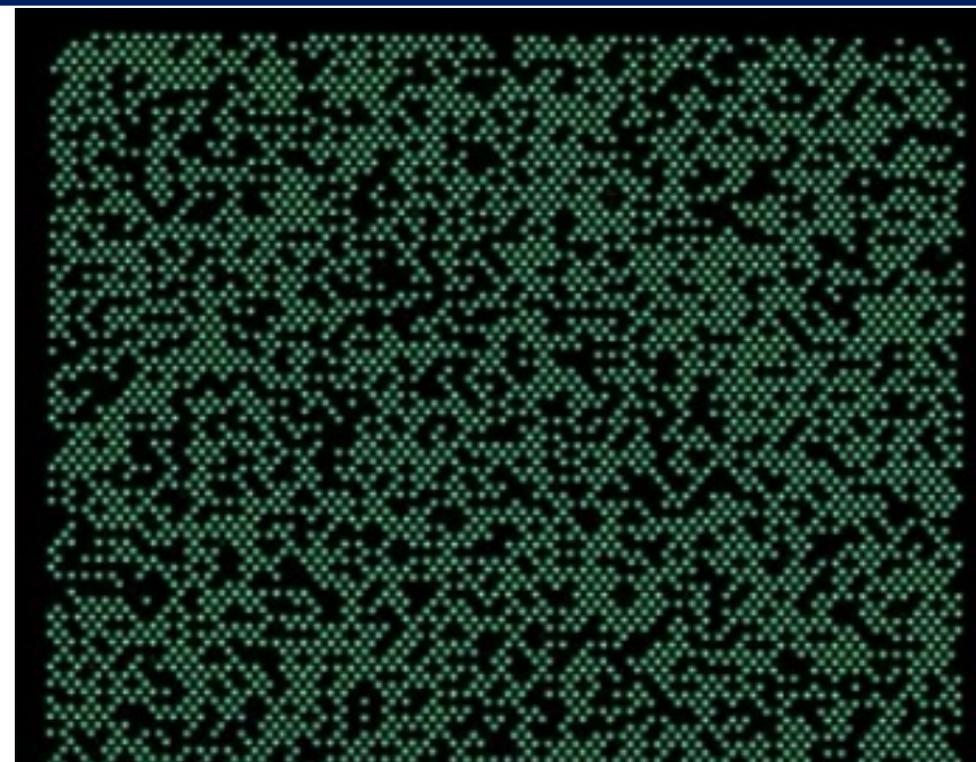
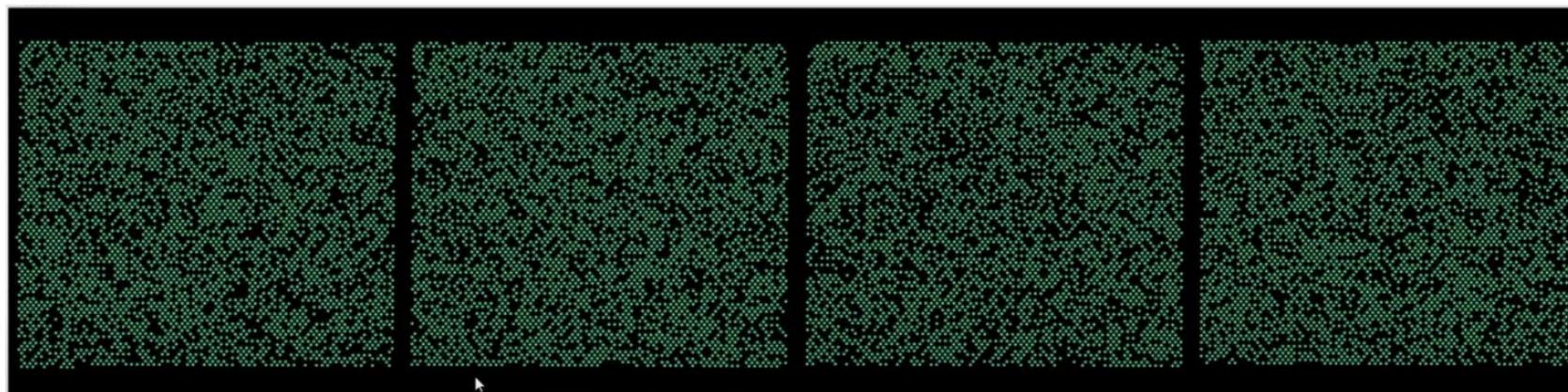
Select targets
 Alvo x (● Yellow) ▼

Select all Unselect all Group as hyperwell Ungroup hyperwell

List Signalmap Heatmap Histogram 1D Scatterplot 2D Scatterplot Concentration diagram

● Yellow

	1	2	3
A			
B			



26 mil partições
 Pontos verdes – emissão de
 Fluorescência

Problemas:

✓ Limite de partículas detectadas

Nanoplacas de 96 amostras: 8,5 mil partições

Nanoplacas de 24 amostras : 8,5 ou 26 mil partições



RESEARCH ARTICLE

Comparison of Droplet Digital PCR and Quantitative PCR Assays for Quantitative Detection of *Xanthomonas citri* Subsp. *citri*

Yun Zhao[☯], Qingyan Xia[☯], Youping Yin, Zhongkang Wang*

School of Life Science, Chongqing University, Chongqing, 400030, China

☯ These authors contributed equally to this work.

* w-zk@163.com

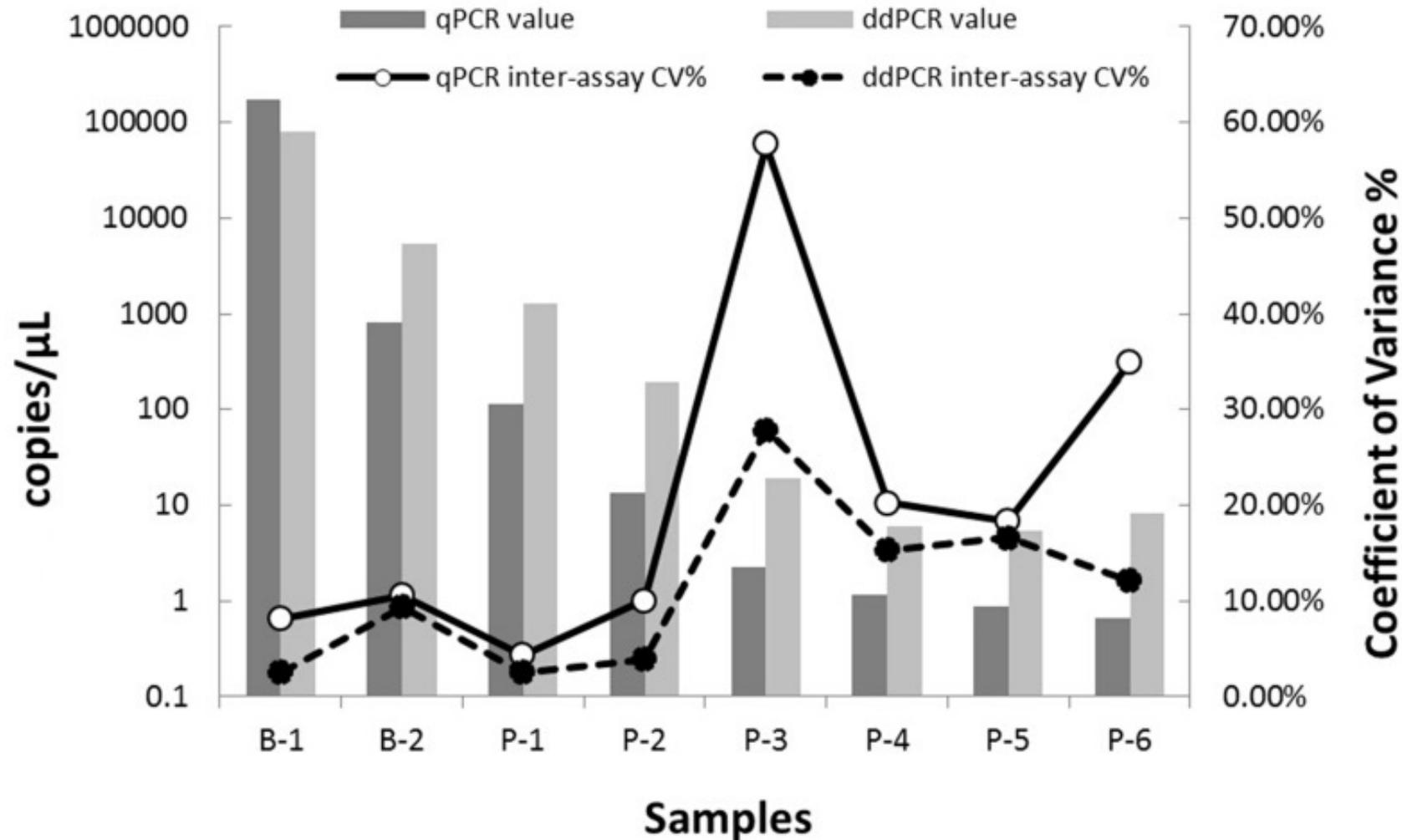


Fig 5. Inter-assay CV% of the qPCR and ddPCR assays. Samples B-1 and B-2 are bacterial suspensions in high concentration. Samples P-1–P-6 are positive plasmid DNA; among them, P-1 and P-2 are of high concentration and P-3–P-6 are of low concentration. Histograms indicate the average copy number of each sample in log₁₀ scale. Lines show the trend of variation of CV of the qPCR and ddPCR assays with repeated tests of diverse sample concentrations. The ddPCR assay is more precise compared to the qPCR assay for quantification of *Xcc*, especially for low target concentrations (numerical data supporting Fig 5 are given in [S3 Table](#)).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

- ✓ Alta especificidade, eficiência e rapidez
- ✓ Técnica robusta e de baixo custo
- ✓ Amplificação isotérmica – única temperatura (60 a 65 °C)
- ✓ Não demanda equipamentos complexos – banho maria
- ✓ Menos sensível a inibidores de reação
- ✓ Amplificação por fotometria – alteração na coloração da solução – diagnóstico visual

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Variações da PCR:

✓ Utiliza-se 2 ou 3 pares de primers

Polimerase:

✓ Alta capacidade de deslocamento de fita

✓ Alta atividade de replicação

✓ Bst - *Bacillus stearothermophilus*

Componentes necessários:

- Amostra de DNA a ser testada;
 - Pares de *primers* – 2 ou 3
 - Enzima Bst polimerase;
 - Nucleotídeos (dNTPs);
- Solução tampão, água e cloreto de magnésio.



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Primers:

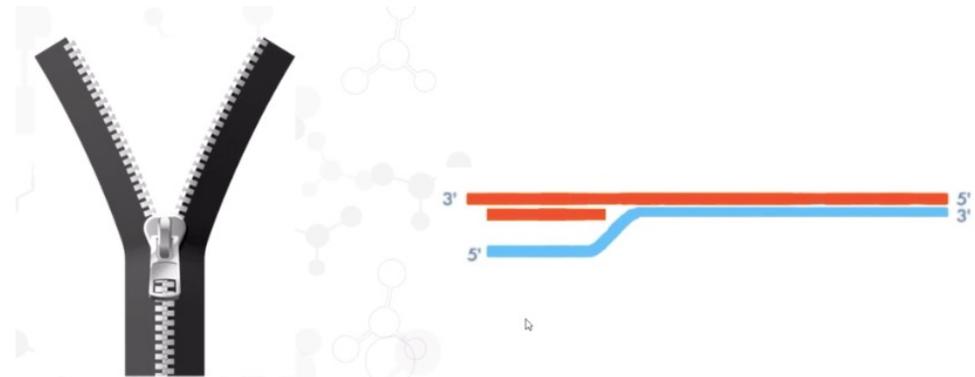
- ✓ 1 par de primers internos (são os mais utilizados)



- ✓ 1 par de primers externos



Bst: capacidade de deslocar a fita de DNA



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

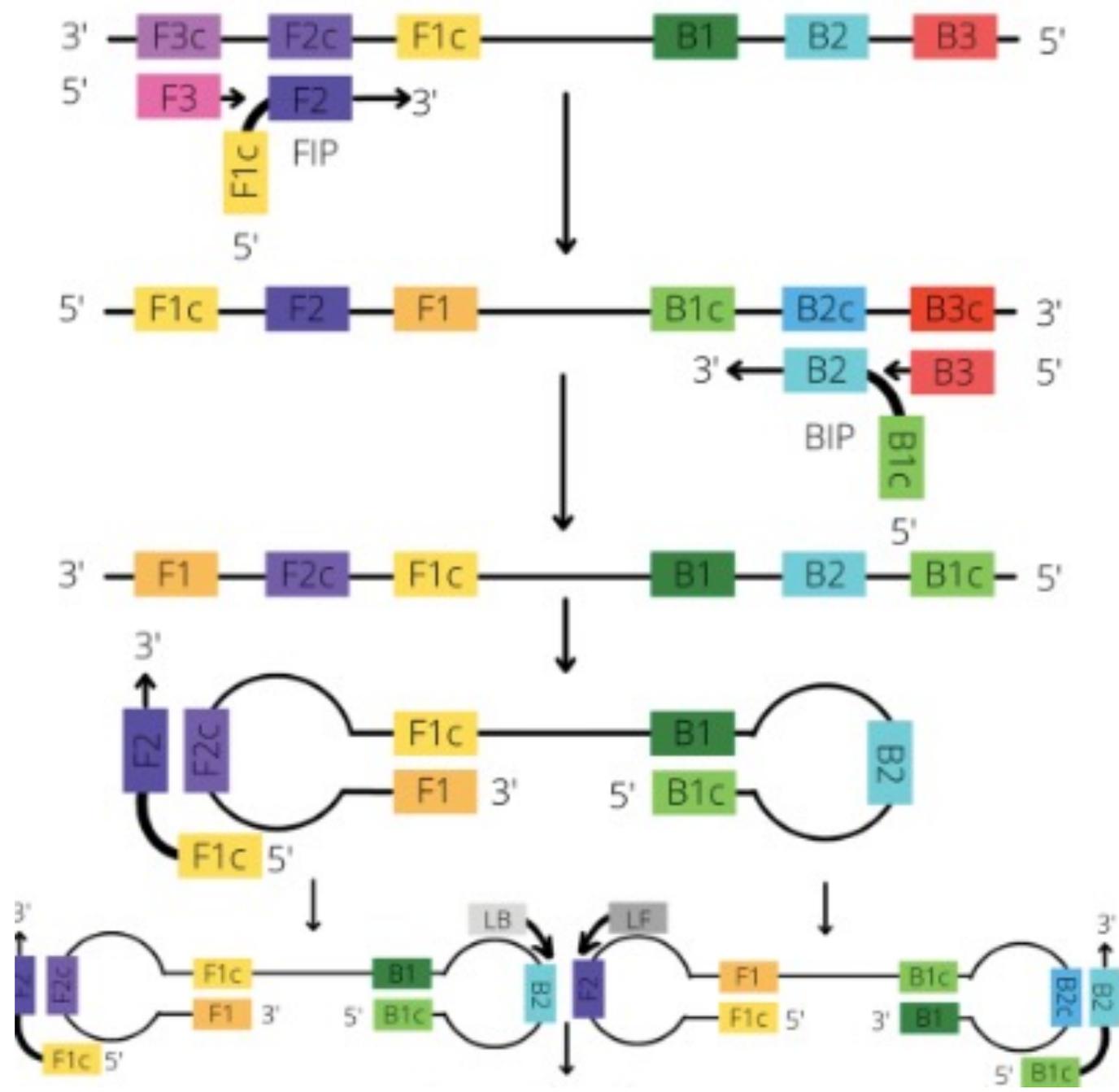
- ✓ Adicionar todos os ingredientes no tubo (ex.: 25 ul)
- ✓ 60 - 65 °C por alguns minutos (15 min a 1 hora)



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Momentos da reação:

- 1) Produção inicial do alvo
- 2) Ciclagem e amplificação
- 3) Elongação e reciclagem



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

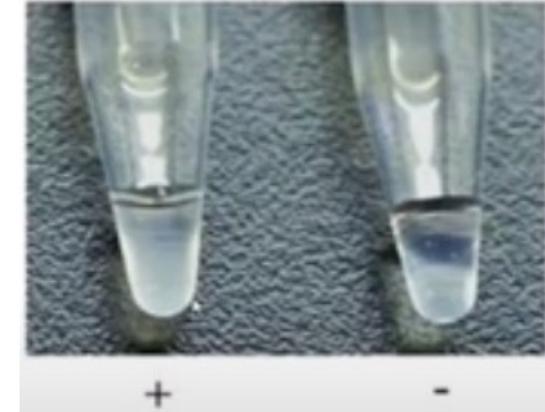
RT-LAMP

- ✓ Vírus de RNA
- ✓ Mesmo raciocínio
- ✓ RNA é o material inicial
- ✓ Necessidade de transcrição reversa antes

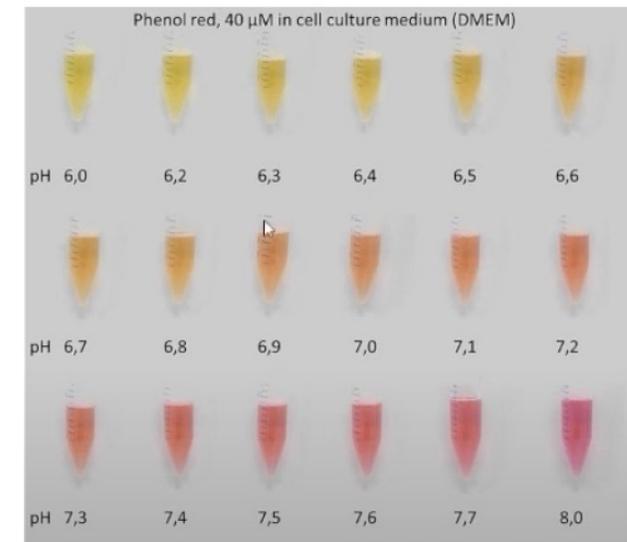
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Detecção do Resultado

✓ Turbidez por acúmulo de pirofosfato →



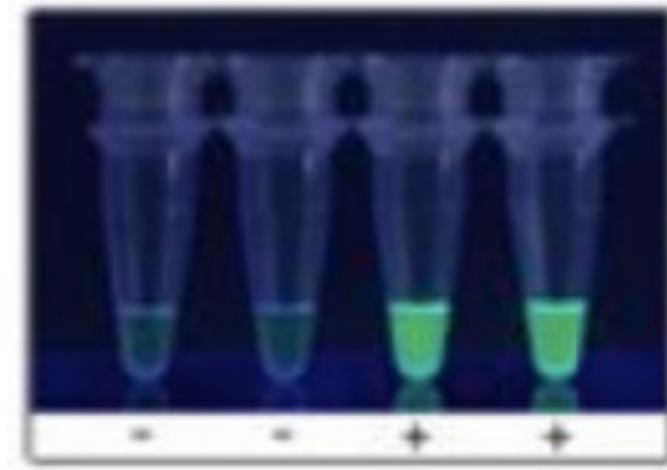
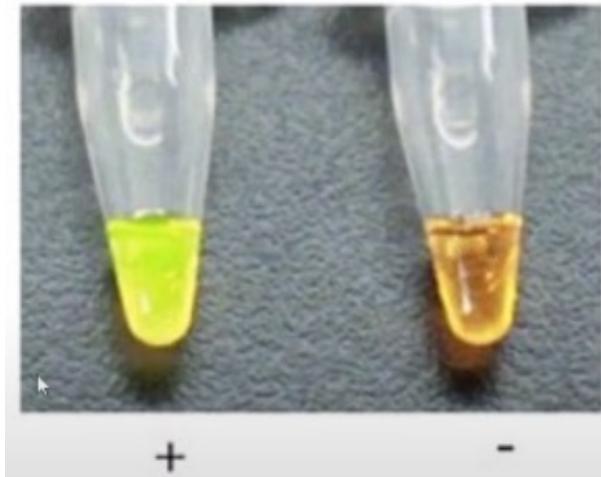
✓ Mudança de coloração por indicador de PH →



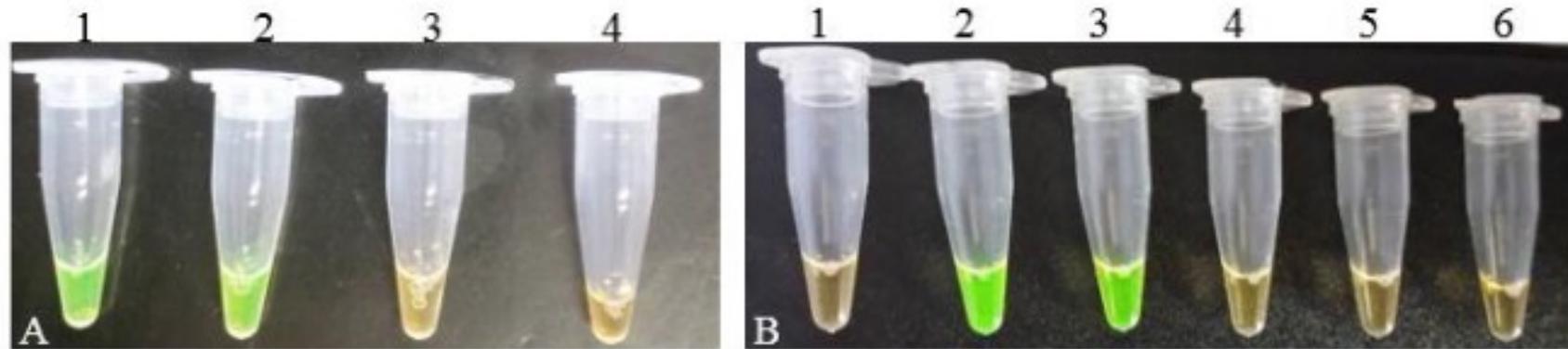
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Detecção do Resultado

- ✓ Agentes fluorescentes - SYBRGREEN



Método de detecção visual utilizando SYBR Green

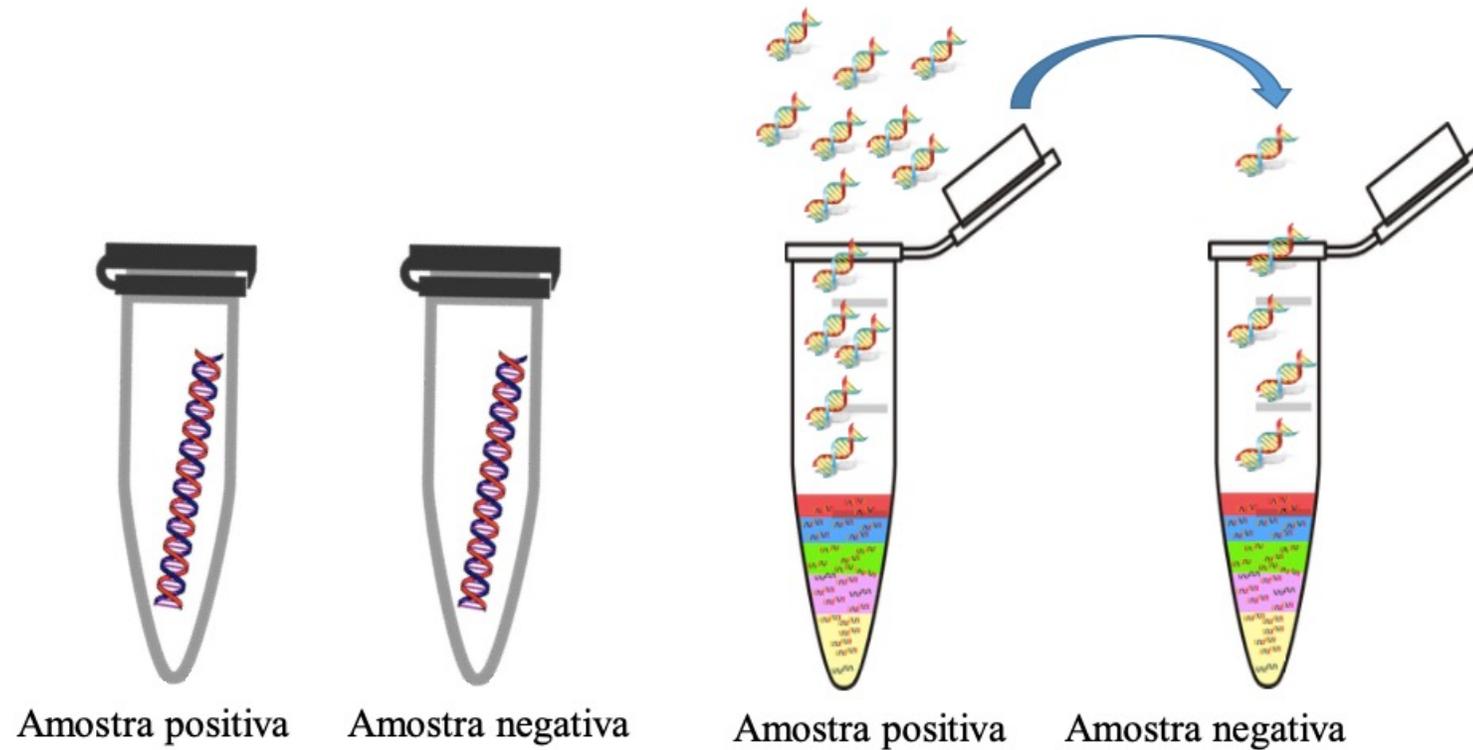


(A) Reação de LAMP para detecção do ToCV. 1: tomateiro infectado; 2: pimentão infectado; 3: tomateiro sadio; 4: água. (B) Reação de LAMP para detecção do ToSRV (1: DNA de um inseto virulífero, 2: RCA de um inseto virulífero, 3: DNA total de tomateiro infectado com ToSRV, 4: inseto avirulífero, 5: tomateiro sadio, 6: água).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

✓ Problemas:

Contaminação cruzada da amostra



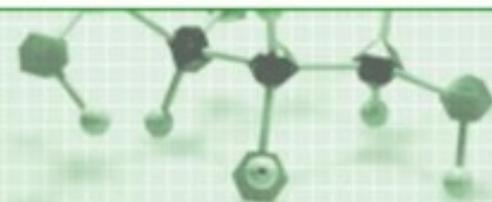
PrimerExplorer >>

Features and operating environment for the LAMP primer designing software [PrimerExplorer]

Queries >>

For inquiries, please contact us by e-mail.

PrimerExplorer is a primer designing software specifically for LAMP, a novel gene amplification method.



PrimerExplorer V4 →

Please click for software information

New version with enhanced operability

PrimerExplorer V5 →

Please click for software information

Artigos relacionados com Fitopatologia

Journal of
Phytopathology

J Phytopathol

ORIGINAL ARTICLE

Rapid Detection of *Tomato chlorosis virus* from Infected Plant and Whitefly by One-step Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification

Miriam Karwitha^{1,2}, Zhi-Ke Feng¹, Yan Shen¹, Walter Essendi², Wen-Na Zhang¹, Jin-Yu Li¹ and Xiao-Rong Tao¹



Plant Pathology & Microbiology

Almasi et al., J Plant Pathol Microb 2013, 4:1
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000153>

Research Article

Open Access

Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus

Mohammad Amin Almasi^{1*}, Mehdi Aghapour Ojaghkandi¹, Ahmad Hemmatabadi², Fatah Hamidi², and Saeedeh Aghaei¹

¹Department of Biotechnology, Research Institute of Physiology and Biotechnology, University of Zanjan, Zanjan, Iran

²Science and Research Branch, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran



ELSEVIER

Journal of Virological Methods

Volume 212, February 2015, Pages 23–29



Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of *Sugarcane mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* in sugarcane

Protocol

Plant Virology Protocols

Volume 1236 of the series Methods in Molecular Biology pp 49-59

Date: 16 September 2014

Detection Methods for Rice Viruses by a Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

Plant Pathol. J. 31(3) : 219-225 (2015)

<http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0044>

pISSN 1598-2254 eISSN 2093-9280

Open Access

The Plant Pathology Journal

©The Korean Society of Plant Pathology

Development of a Rapid Detection Method for *Potato virus X* by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification

June 2005, Volume 89, Number 6

Pages 605-610

<http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0605>

Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA for Detection of *Potato virus Y*

Xianzhou Nie, Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, P.O. Box 20280, 850 Lincoln Road, Fredericton, New Brunswick, E3B 4Z7 Canada

A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene

M. Ghai¹, V. Singh¹, L.A. Martin², S.A. McFarlane², T. van Antwerpen² and R.S. Rutherford^{1,2}

Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review

R. Czajkowski¹, M.C.M. Pérombelon², S. Jafra¹, E. Lojkowska¹, M. Potrykus¹, J.M. van der Wolf³ & W. Sledz¹

Detection of *Pythium aphanidermatum* in tomato using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with species-specific primers

Shiro Fukuta • Reiko Takahashi • Satoru Kuroyanagi •
Noriyuki Miyake • Hirofumi Nagai • Hirofumi Suzuki •
Fujio Hashizume • Tomoko Tsuji • Hiromi Taguchi •
Hideki Watanabe • Koji Kageyama

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

Loop-Mediated Amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* Gene Is Highly Specific

Jarred Yasuhara-Bell, Ryo Kubota, Daniel M. Jenkins, and Anne M. Alvarez

Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues



Authors: Huan Peng; Deliang Peng¹; Xianqi Hu²; Xufeng He; Qiong Wang¹;
WenKun Huang¹ and Wenting He¹

Access this article

Buy US\$ 30,00

Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay to Detect *Fusarium oxysporum*

Chenchen Lu^{1,2}, Tingting Dai^{1,2}, HaiFeng Zhang^{1,2}, YuanChao Wang^{1,2} and XiaoBo Zheng^{1,2}

One-step loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Fusarium fujikuroi* in bakanae disease through *NRPS31*, an important gene in the gibberellic acid bio-synthesis

[S. Y. Zhang](#),¹ [D. J. Dai](#),^{1,2} [H. D. Wang](#),^{1,2} and [C. Q. Zhang](#)^{✉1}



Obrigada!

daianabampi@yahoo.com.br

