



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Diseño y evaluación de reacciones isotérmicas caseras para la detección de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con miras a un futuro uso en terreno”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Felipe Andrés Navarro Martínez

Director del Seminario de Título: Fernán Federici Noé

Profesora Patrocinante: Inmaculada Vaca Cerezo

Mayo 2022

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el

Sr Felipe Andrés Navarro Martínez

“Diseño y evaluación de reacciones isotérmicas caseras para la detección de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con miras a un futuro uso en terreno”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: Fernán Federici Noé

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: Andrés Marcoleta

Evaluador: Gastón Higuera

Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



Nací a fines de abril del 1999, en Santiago.

Hice mi enseñanza básica y media en un colegio en Peñalolén, donde descubrí a grandes amigos, mi amor por la biología y mi pasión por querer participar, organizar y ayudar en todo.

En 2017 entré a Ingeniería en Biotecnología Molecular, una decisión sorprendentemente controversial que me hizo ver que la ciencia es capaz de transformar realidades, si se utiliza para algo más que publicaciones altamente especializadas. Entre medio empecé a conocerme, dejé la carne, pasé risas y penas en el campus, fui ayudante, organicé y participé de varias instancias estudiantiles, tomé un montón de ramos extra e hice excelentes amigos.

En 2020, me fui de intercambio a UC Berkeley, oportunidad que agradezco eternamente por todo lo aprendido y disfrutado, compartiendo con amigos de todo el mundo.

Siempre impulsado por sacar a la ciencia del laboratorio y la importancia del conocimiento libre para el progreso y desarrollo tecnológico, entré al Laboratorio de tecnologías libres a realizar el presente trabajo que pueden leer en estas páginas.

Si no me ven haciendo chistes y experimentos en el laboratorio, probablemente estoy en el cine, hablando de superhéroes o ciencia ficción, sacando fotos por ahí, viajando o tratando de sacarle el máximo provecho a la vida.

Para *Nena*.

Para *Ahsoka* y *Alú*.

AGRADECIMIENTOS

A Fernán Federici, por confiar en mí y dirigir el desarrollo de este Seminario de Título con la mejor disposición y siendo una fuente constante de inspiración. A Aníbal, por supervisar el desarrollo de este trabajo, guiarme con sus consejos constantes e ideas dispersas, y por todo el apoyo y motivación durante estos meses. Al Programa Iniciativa Científica Milenio (iBio) por apoyar el desarrollo de esta tesis. Al Laboratorio de Tecnologías Libres, por recibirme con los brazos abiertos y en quienes siempre encontré un consejo y una buena conversación. A Felipe, Javier, Javiera, Séverine y Valentina. Gracias por el apoyo mutuo, las conversaciones, las comidas, las risas, la ayuda a fotografiar tantos tubos y por hacer del lab un lugar amigable y entretenido al que dan ganas de ir día a día. Son realmente sequísimes y espero que lleguen muy lejos.

A mis amigos de la U, a quienes veo convertirse en personas aún más asombrosas que cuando les conocí en los pastos de la Facultad. Especialmente a Gabriel, Fabiana, María José y Sofía, por los carretes que se sentían infinitos, las risas en clases, los momentos afuera de la Biblioteca o en Calama, gracias por enseñarme tanto en tan poco tiempo.

A *Sci-hub*. El conocimiento es libre por naturaleza y sólo adquiere sentido al ser compartido. Espero que todes podamos avanzar juntas en esa dirección.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, por quererme, soportarme, apoyarme y alimentarme durante todo este proceso. A mis abuelos, tíos y primas por su energía constante, a mis mascotas por su cariño incondicional, a mi hermana Javiera por ser mi pilar, mi ejemplo a seguir y una fuente de alegría en los días tristes. A mis padres, Alexandra y Héctor, por su amor incondicional y por todas las herramientas que me han entregado durante estos años, sin ustedes no sería nada. Os amo un montón.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Fusariosis del Tomate | 1 |
| 1.2 Detección de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> | 2 |
| 1.3 Amplificación isothermal mediada por loops (LAMP)..... | 4 |
| 1.3.1 Visualización de reacciones LAMP | 8 |
| 1.3.2 Ventajas y limitaciones de reacciones LAMP | 9 |
| 1.4 Implementación en terreno de reacciones LAMP | 10 |
| 1.4.1 Liofilización de preparaciones LAMP..... | 10 |
| 1.4.2 Fabricación de enzimas caseras en el contexto de ciencia colaborativa | 11 |
| 1.5 Objetivo General | 13 |
| 1.6 Objetivos Específicos | 13 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 14 |
| 2.1 Diseño de un control positivo de <i>Fol</i> para su detección molecular..... | 14 |
| 2.2 Clonamiento y Transformación de pLOR-gsix5 en bacterias..... | 15 |
| 2.3 PCR de colonia | 15 |
| 2.4 Obtención y secuenciación del ADN plasmidial..... | 16 |
| 2.5 Diseño y Análisis de Partidores LAMP para <i>Fol</i> | 16 |
| 2.6 Obtención de Ácidos Nucleicos para <i>GMO Detective</i> | 19 |
| 2.7 Obtención y almacenamiento de <i>BstLF</i> polimerasa..... | 19 |
| 2.8 Reacciones LAMP..... | 20 |
| 2.8.1 LAMP QUASR con reactivos caseros | 20 |
| 2.8.2 LAMP Liofilizado con reactivos caseros | 21 |
| 2.8.3 LAMP Colorimétrico | 22 |
| 2.8.4 LAMP de <i>output</i> fluorescente a tiempo real | 23 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS | 24 |
| 3.1 Elección de un gen marcador de <i>Fol</i> y diseño <i>in silico</i> de un control positivo para su detección molecular..... | 24 |
| 3.2 Obtención de un plásmido a usar como control positivo de amplificación..... | 25 |
| 3.3 Evaluación de un set de partidores previamente descrito para la detección de una secuencia conservada de <i>Fol</i> mediante reacciones LAMP-QUASR | 27 |
| 3.4 Diseño y testeo de tres sets de partidores LAMP para <i>six5</i> | 30 |
| 3.5 Liofilización de preparaciones LAMP <i>GMO Detective</i> con reactivos caseros..... | 35 |
| DISCUSIÓN..... | 39 |
| 4.1 Diseño de un control positivo para <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> | 39 |
| 4.2 Detección de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> con reacciones LAMP | 40 |
| 4.3 Hacia una detección molecular accesible en terreno..... | 44 |
| 4.4 Ciencia abierta como una herramienta para el desarrollo sostenible | 47 |
| CONCLUSIONES | 49 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 50 |
| ANEXO | 56 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla I: Set de partidores LAMP diseñados para el gen <i>six5</i> de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>f. sp. lycopersici</i> | 18 |
| Tabla II: Resumen de resultados al rehidratar preparaciones LAMP <i>GMO Detective</i> previamente liofilizadas..... | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Esquema de partidores de reacciones LAMP | 5 |
| Figura 2: Esquema de pasos iniciales de una reacción LAMP | 7 |
| Figura 3: Esquema de liofilización de reacciones LAMP | 22 |
| Figura 4: PCR de colonia de transformación de pL0R-gsix5..... | 26 |
| Figura 5: Reacciones LAMP-QUASR para la detección de <i>six5</i> | 27 |
| Figura 6: Reacciones LAMP <i>Fol</i> a distintas condiciones | 29 |
| Figura 7: Testeo de sets 1-3 en reacciones LAMP colorimétricas para <i>Fol</i> | 31 |
| Figura 8: LAMP fluorescente a tiempo real utilizando los sets 1-3 para la detección de la secuencia <i>six5</i> de <i>Fol</i> | 33 |
| Figura 9: Testeo del set 3 en reacciones LAMP colorimétricas para <i>Fol</i> | 34 |
| Figura 10: Reacciones <i>GMO Detective</i> caseras con ADN extraído de alimentos..... | 35 |
| Figura 11: Reacciones <i>GMO Detective</i> liofilizadas y almacenadas durante 2 meses... | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS

35S: Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), en general un promotor fuerte en plantas.

BHQ1: Black Hole Quencher®-1

BIP: Partidor interno en dirección *backward* (*Backward Inner Primer*)

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales

***Bst*LF:** Fragmento largo de la ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus*

CTI: Ciencia, Tecnología e Innovación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

dNTP: desoxirribonucleótido

f. sp.: *forma specialis*

FAM: Molécula de fluoresceína

FIP: Partidor interno en dirección *forward* (*Forward Inner Primer*)

Fol: *Fusarium oxysporum forma specialis lycopersici*

GMO: Organismo Genéticamente Modificado

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por asas o “loops” (*Loop-mediated isothermal Amplification*)

LB: Partidor del *loop* en dirección *backward* (*Loop Backward Primer*)

LF: Partidor del *loop* en dirección *forward* (*Loop Forward Primer*)

NOT: Control negativo sin templado (*NO-Templado*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QUASR: Quenching de la señal de reporteros no incorporados en la amplificación (*Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters*)

RT-LAMP: LAMP de transcripción reversa

SARS-CoV-2: Coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

six: gen codificante de la proteína SIX (secretada en xilema)

T_m: Temperatura de denaturación térmica

UV: Ultravioleta

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

El tomate es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial, cuyo rendimiento se ve fuertemente afectado por enfermedades como la marchitez causada por el hongo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (Fol)*. Ante la falta de un método de control efectivo contra el patógeno, su detección temprana en suelo es vital para la agricultura. En este contexto, la amplificación isotermal mediada por *loops* (LAMP) se presenta como una herramienta relevante para una detección molecular de *Fol* que sea específica, rápida, fácil y con el potencial de ser aplicable en terreno sin la necesidad de un termociclador.

En el presente Seminario de Título, se trabajó en el desarrollo de un método LAMP para detección de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (Fol)*. Se validó experimentalmente un set de partidores para la detección de *Fol* a partir de reacciones isotermas LAMP preparadas con reactivos caseros y enzimas expresadas de manera local. Para esto, se diseñó un control positivo de reacción en base a una región conservada del gen *six5*, un factor de virulencia conservado y específico para *Fol*, la cual fue clonada en un plásmido y transformada en bacterias competentes, desde las cuales obtener una dilución de ADN plasmidial útil como control positivo.

Para la validación del control en reacciones isotermas se utilizó, en primera instancia, un conjunto de partidores previamente descrito en la literatura. Sin embargo, la repetida amplificación inespecífica de los controles negativos llevó al diseño y validación experimental de tres nuevos conjuntos de partidores mediante reacciones LAMP colorimétricas y un LAMP a tiempo real. Los resultados obtenidos permitieron validar al set tres como el mejor conjunto de partidores para la detección del gen *six5* de *Fol* en reacciones isotermas preparadas con reactivos y enzimas locales.

Junto con lo anterior, se comprobó que preparaciones de reacciones isotermas preparadas de manera local pueden ser liofilizadas y almacenadas hasta dos meses a temperatura ambiente de manera estable sin pérdida de actividad, lo que fue evaluado mediante reacciones LAMP *GMO Detective* que detectan la presencia transgénica del promotor 35S desde muestras de alimentos. Se debe considerar que, para la obtención de estos resultados, se utilizó una enzima sin glicerol como estabilizante y que tanto el *buffer* isotermal como el $MgSO_4$ fueron añadidos en la etapa de rehidratación de la reacción.

Este trabajo demuestra la estabilidad y robustez que presentan reacciones LAMP caseras en su formato liofilizado, una característica clave para un posible uso como herramienta diagnóstica de patógenos agroecológicos *in situ*. A corto plazo, se espera evaluar la detección específica de *Fol* desde muestras de campo, utilizando los partidores validados en este Seminario con los protocolos de preparación de LAMP liofilizado.

Además, el uso de enzimas y reactivos de producción local en este trabajo busca inspirar a otros grupos a sumarse al desarrollo colaborativo de herramientas moleculares abiertas que permitan, a largo plazo, avanzar hacia un modelo de desarrollo sustentable basado en el libre conocimiento y la independencia tecnológica a escala local.

ABSTRACT

Tomato is one of the most important crops worldwide, whose yield is strongly affected by its susceptibility to diseases such as tomato wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (Fol)*. In the absence of an effective control method against this pathogen, its early detection in soil is vital for agriculture. In this context, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) offers itself as a relevant tool for a *Fol*-specific molecular detection that is fast, easy to implement and has the potential to be applicable in the field without the need of a thermal cycler.

In the present thesis, a LAMP method for the detection of *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (Fol)* was developed. A set of LAMP primers was experimentally validated for its use in *Fol* detection in isothermal LAMP reactions prepared with home-made reagents and locally expressed enzymes. To achieve this, a positive control reaction was designed, based on a conserved region of the *six5* gene, a virulence factor specific for *Fol*, which was cloned into a plasmid and transformed into competent bacteria, from which to obtain a dilution of plasmid DNA that can be used as a positive control.

To validate this DNA in isothermal LAMP reactions, a set of previously described primers was used at first. However, repeated unspecific amplification of the negative controls led to the design and experimental validation of three new sets of primers in colorimetric LAMP reactions and a real-time LAMP reaction. The results obtained here allowed the validation of set 3 as the best set of LAMP primers for the detection of the *Fol six5* gene in isothermal reactions prepared with local reagents and enzymes.

Also, it was proven that locally-prepared isothermal reaction mixes can be lyophilized and stored up to two months at room temperature in a stable manner without any loss of

activity, which was evaluated in this case for LAMP *GMO Detective* reactions that detect the transgenic presence of the 35S promoter in food samples. It should be noted that, to obtain these results, a glycerol-free enzyme was used and that both isothermal *buffer* and MgSO₄ were added in the rehydration stage of the reaction.

This work demonstrates the stability and robustness of home-made LAMP reactions in their lyophilized format, a key feature for its future potential use as a diagnostic tool for *in situ* detection of agroecological pathogens. In the short term, *Fol*-specific detection from field samples should be evaluated using the primers validated in this study along with the freeze-dried LAMP preparation protocols.

In addition, the use of locally-produced enzymes and reagents in this Seminar aims to inspire other groups to join the collaborative development of open molecular tools that will allow, in the long term, to advance towards a sustainable development model based on open knowledge and technological independence at a local scale.

INTRODUCCIÓN

1.1 Fusariosis del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la especie hortícola más cultivada en el mundo, donde su cultivo alcanza una producción anual que supera los 175 millones de toneladas desde el año 2015 y con un consumo per cápita que se espera siga creciendo en los próximos años (Muñoz, 2021). Su amplio uso en distintas preparaciones culinarias, su alto valor nutricional, y su versatilidad de crecimiento en distintos tipos de suelos hacen que el tomate sea cultivado en distintas partes del mundo, donde China, India y Estados Unidos destacan como los mayores productores a nivel mundial (Flaño, 2013). Chile, por su parte, es el segundo productor de tomate del hemisferio sur, con un cultivo de alrededor de 13 mil hectáreas al año 2020 a lo largo de todo el país, pero principalmente focalizado en las regiones de O'Higgins y del Maule (Muñoz, 2021).

Los bajos rendimientos de este cultivo de gran relevancia económica y cultural suelen ser atribuibles a su susceptibilidad a infecciones por diversos tipos de microorganismos. En este contexto, la marchitez por *Fusarium* destaca por ser una de las enfermedades más frecuentes y devastadoras a nivel mundial, capaz de provocar pérdidas de hasta un 60 a 70% del cultivo de tomate, sea este en campo abierto o en invernadero (Nirmaladevi y col., 2016; Srinivas y col., 2019).

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (*Fol*), el cual, en su modo de vida biotrófico, infecta las raíces de la planta y progresa intracelularmente en forma de micelio hasta invadir el xilema (Singh y col., 2017). El colapso del sistema vascular de la planta de tomate lleva a los síntomas más frecuentes de la infección, como lo son el amarillamiento de las hojas, la caída lateral del tallo y el empardecimiento y marchitamiento de los tejidos, lo que puede causar necrosis e incluso

la muerte del organismo completo (Bawa, 2016). Es justamente en este tejido vascular muerto donde el hongo, en su modo de vida necrotrófico (McGovern, 2015), forma las esporas que posteriormente libera en forma de microconidia, macroconidia y clamidosporas que permanecen en el suelo de manera indefinida (Srinivas y col., 2019). Esto adquiere mayor relevancia si se considera que *Fol* se encuentra ampliamente distribuido a lo largo del planeta, tanto en el hemisferio norte como en gran parte del hemisferio sur, incluyendo Chile (Figura S1 Anexo) (CABI, 2022). Pese al gran riesgo que presenta el avance de este hongo, a la fecha no existe algún tratamiento efectivo y universal para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

Los métodos actuales de control de *Fol* se basan en el uso de fungicidas químicos o prácticas complejas como la desinfección o esterilización total del suelo (Bawa, 2016), las cuales poseen efectos desconocidos sobre el microbioma del suelo. Si bien existen estudios prometedores del uso de microorganismos para el biocontrol del patógeno (de Lamo & Takken, 2020; Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013), aún ninguno de ellos ha sido lo suficientemente efectivo para su uso masivo en suelo. Por tanto, la detección temprana de *Fol* en suelo es vital para frenar el avance del patógeno y reducir las enormes pérdidas que este genera en los cultivos de tomate a nivel mundial.

1.2 Detección de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (*Fol*) corresponde a una *forma specialis* (*f.sp.*) del hongo *Fusarium oxysporum*, es decir, un conjunto de cepas morfológicamente similares y específicamente adaptadas para infectar a su hospedero (Herrera Cid, 2017). La mayoría de la detección de *Fusarium* se lleva a cabo mediante pruebas basadas en las diferencias morfológicas de cada especie, observables en distintos medios de cultivo (Herrera Cid, 2017). Sin embargo, las distintas *formas specialis* de *F. oxysporum* son

indiferenciables morfológicamente, por lo que su identificación y discriminación requiere de pruebas de inoculación en distintos hospederos a fin de determinar a cuál de ellos es susceptible una determinada muestra (Balogun, 2007). Una especie de “prueba y error” que vuelve al proceso de detección lento y laborioso.

En este contexto, el uso de herramientas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos se presenta como una interesante alternativa para una detección más rápida, específica y sensible de este hongo patógeno (Lievens y col., 2008). Para la detección molecular de *Fol*, debe considerarse que gran parte su genoma es conservado al de otras *formas specialis* de *F. oxysporum* que infectan a otros tipos de organismos (Jangir y col., 2021). Esto obliga a la identificación de genes o factores de virulencia de *Fol* involucrados en la interacción específica del hongo con la planta de tomate para lograr una correcta detección del patógeno.

En el caso de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, se ha descrito que los genes *six* codifican para una serie de proteínas, ricas en cisteína, que son secretadas al xilema de la planta y las cuáles actúan como importantes factores de virulencia de *Fol* (Jangir y col., 2021). De este modo, se ha visto que la presencia o ausencia de ciertos genes *six* determina la especificidad del patógeno a su planta hospedero, lo que ha permitido la clasificación de *Fol* en tres razas con diferencias en patogenicidad que se explican en diferencias en sus genes *six* (Lievens y col., 2009).

Si bien las tres razas comparten casi la totalidad del genoma y los mismos genes *six*, estas se diferencian en que el gen *six4* sólo está presente en la raza 1 de *Fol*, mientras que las razas 2 y 3 se diferencian entre sí en que esta última presenta una serie de mutaciones puntuales en el gen *six3* que le permiten evadir mecanismos de resistencia

de algunas plantas (Ayukawa y col., 2016; Jangir y col., 2021). Sin embargo, la distribución cosmopolita de las tres razas de *Fol* (CABI, 2022), incluyendo la presencia de todas ellas en suelo nacional (Herrera Cid, 2017) hace necesario considerar regiones conservadas a las tres razas del hongo patógeno para el diseño de herramientas moleculares de detección con el fin de evitar falsos negativos.

Dentro de los genes *six*, se ha descrito que *six1*, *six2*, *six3* y *six5* se pueden utilizar para determinar la presencia específica de una *forma specialis* del tipo *lycopersici* (Lievens y col., 2009), por lo que, si se quiere una detección regiones específicas para esta subespecie de *Fusarium oxysporum* que además no varíen entre las razas 1, 2 y 3, los genes *six2* y *six5* se presentan como buenos candidatos a evaluar para la detección molecular de *Fol*.

1.3 Amplificación isoterma mediada por loops (LAMP)

Desde su invención, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus técnicas derivadas, como el *q-RT-PCR*, han sido las herramientas moleculares más utilizadas para la amplificación de ácidos nucleicos, siendo consideradas el *gold-standard* para la detección de secuencias específicas de ADN o ARN (Alekseenko y col., 2021; Murphy & Bustin, 2009). Si bien el PCR y sus técnicas derivadas son muy eficaces y confiables, su ejecución e interpretación requiere de instrumentos sofisticados y personal técnico calificado, lo que aún limita y dificulta la aplicación de estas técnicas en entornos de bajos recursos, o en zonas rurales (Fang y col., 2008; Wang y col., 2022)

Una atractiva alternativa a las técnicas de PCR convencionales son las reacciones de amplificación isoterma mediada por asas o “*loops*” (LAMP, por sus siglas en inglés), las que destacan por su rapidez, costo-efectividad y su simpleza (Notomi y col., 2000). Esta

cualidad isoterma proviene del uso de la enzima ADN polimerasa *BstLF* con alta actividad de desplazamiento de hebra 5' a 3', que permite separar la doble hebra de ADN y realizar la síntesis de ADN sin requerir de una denaturación previa, a una temperatura constante cercana a los 65°C (Xu y col., 2013). La incubación isoterma de la técnica LAMP permite su implementación en terreno sin la necesidad de un termociclador (Wong y col., 2018).

LAMP es una reacción que utiliza cuatro (o seis) partidores que se unen a seis (u ocho) regiones de una secuencia de interés, para realizar una amplificación altamente específica (Wong y col., 2018). F3 y B3 corresponden a partidores externos involucrados en el desplazamiento de hebras al inicio de la reacción. Los partidores internos FIP y BIP se componen de dos regiones (F2 y F1c, o B2 y B1c, respectivamente) que permiten la formación de horquillas o *loops* en la reacción. Los otros dos partidores, LF y LB, también llamados partidores del *loop*, son secuencias (cuya adición a la reacción es opcional) diseñadas para unirse a estas horquillas y así aumentar la especificidad y velocidad de la reacción (Parida y col., 2008). La ubicación relativa de cada partidor en relación con una secuencia templado se presenta en la Figura 1.

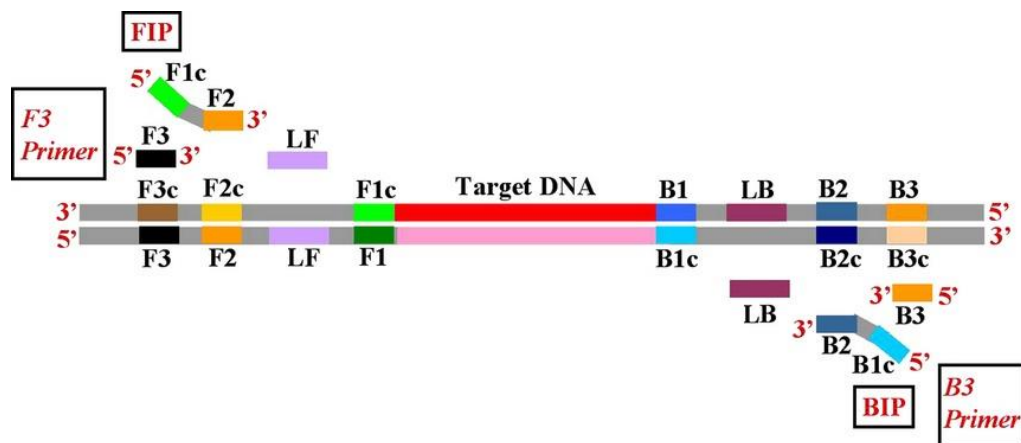


Figura 1: Esquema de partidores de reacciones LAMP. Se detallan los primers F3, FIP (F1c y F2), B3, BIP (B1c y B2), LF y LB, junto con la ubicación de cada uno de ellos en una secuencia de ADN templado a amplificar mediante reacciones isotérmicas (LAMP). Imagen adaptada de Xu y col (2013).

A modo de ejemplo, se explica lo que ocurre una vez que el partidor FIP se une en su extremo 3' a la región F2 de una hebra templado de ADN (Figura 2.1). Desde esta región, FIP inicia la síntesis de una hebra complementaria (Figura 2.2). A su vez, el partidor F3 se une a la región F3c (río arriba de la región F2 donde se unió FIP), e inicia la síntesis de una hebra complementaria que desplaza la hebra sintetizada previamente con el partidor FIP (Figura 2.3). Esta hebra simple que ha sido liberada sirve como templado para una síntesis de ADN iniciada por BIP (Figura 2.4) cuyo producto es posteriormente desplazado por una síntesis iniciada por la unión del partidor B3 a B3c, de manera análoga a lo ocurrido con FIP y F3. La hebra proveniente de la síntesis iniciada por BIP forma una estructura de “mancuerna” (Figura 2.5), debido a los horquillas generadas por la interacción entre F1-F1c y B1-B1c en cada extremo (Eiken Genome Site, 2005; Parida y col., 2008).

Esta estructura de mancuerna sirve como templado para la síntesis exponencial de ADN (Figura S2 Anexo), ya que sirve como punto de partida para la amplificación mediada tanto por los partidores FIP-BIP; los partidores LF-LB; y por los mismos productos de reacción que se van generando (Tomita y col., 2008). Esta rápida amplificación genera múltiples fragmentos de ADN como productos, de distintos tamaños y estructuras, que se puede visualizar como una escalera o *ladder* en un gel de agarosa (Fang y col., 2008).

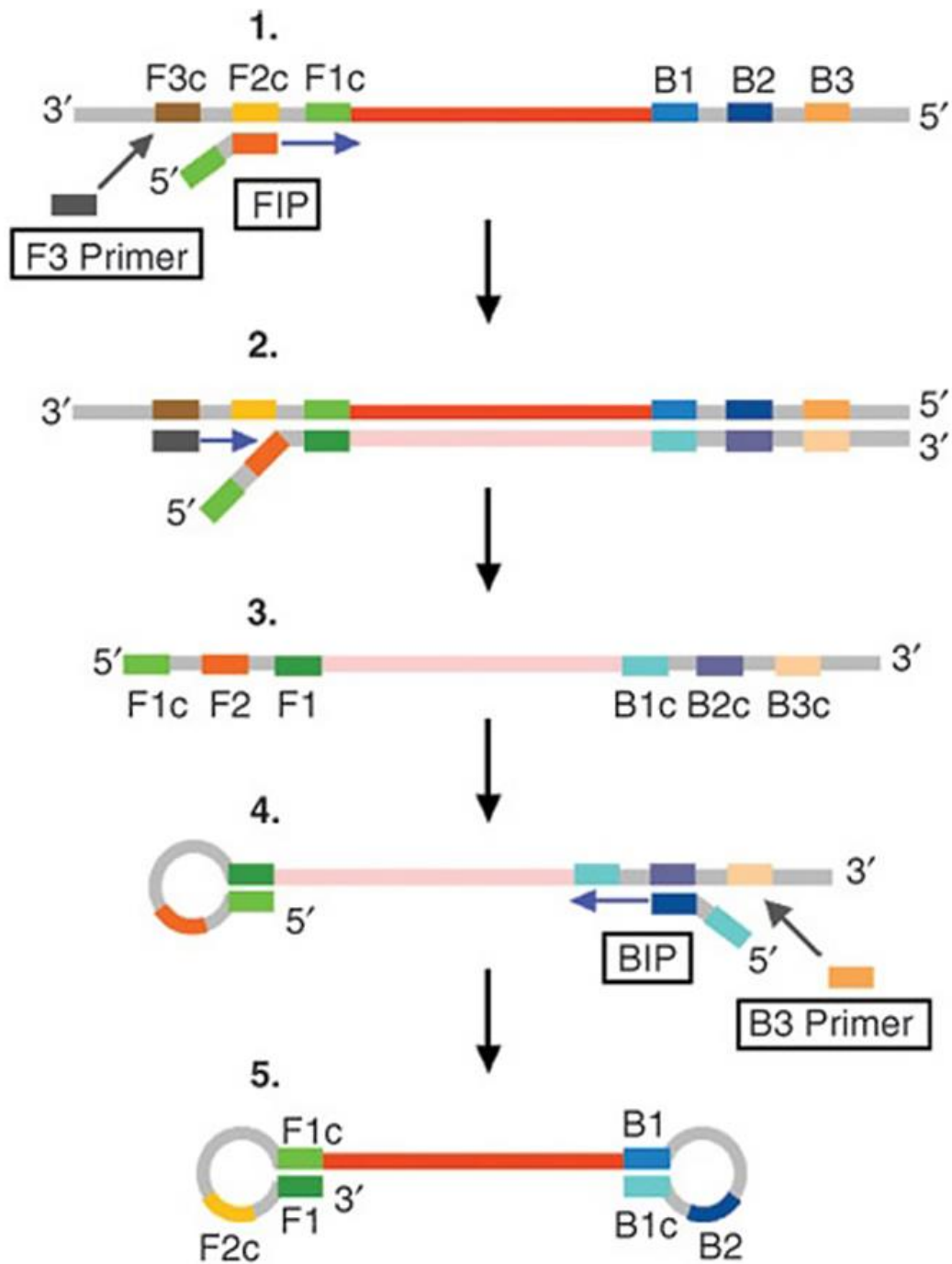


Figura 2: Esquema de pasos iniciales de una reacción LAMP. La síntesis de ADN iniciada a partir de FIP procede de la siguiente manera: La región F2 de FIP se une a la región F2c en el ADN templado (paso 1) e inicia la síntesis de ADN. El partidor F3 se une a la región F3c de la secuencia templado y se produce la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra (paso 2). La hebra de ADN elongada a partir del FIP es desplazada y liberada. Esta hebra simple (paso 3) forma una horquilla en su extremo 5' (paso 4). Ocurre una nueva síntesis de ADN utilizando esta hebra como molde, junto con los partidores BIP y B3, de la misma manera descrita anteriormente, para obtener una estructura de "mancuerna" con horquillas en ambos extremos (paso 5). Imagen y descripción extraída de Tomita y col. (2008).

1.3.1 Visualización de reacciones LAMP

Debido a que una reacción LAMP genera tal cantidad de amplificación que es incluso observable a simple vista, la mayoría de los métodos de visualización utilizados son técnicas de punto final, como el uso de agentes intercalantes fluorescentes, indicadores colorimétricos o electroforesis en gel de agarosa, aunque este último suele estar asociado a altos riesgos de contaminación (Panno y col., 2020).

El uso de indicadores colorimétricos en LAMP se basa en la detección de algún cambio químico generado en la reacción, como la disminución de iones Mg^{+2} en el caso del azul de hidroxinaftol (HNB) (Wong y col., 2018) o la caída de pH generada por la liberación de protones durante la amplificación en el caso de *neutral red*, donde las reacciones cambian de un color amarillo a rosado (Tanner y col., 2015). Asimismo, la adición de agentes intercalantes como *SYBR Green I* o *EvaGreen*, que se unen al ADN de doble hebra y emiten una señal fluorescente, favorece la visualización de los productos de reacción tanto a simple vista como bajo luz UV (Wong y col., 2018). Además, la medición cuantitativa de esta fluorescencia permite también el uso de estos agentes en reacciones LAMP a tiempo real, similares a un qPCR (Panno y col., 2020).

Si bien estos métodos permiten visualizar la amplificación sin la necesidad de abrir los tubos una vez terminada la reacción, todos ellos miden alguna característica indirecta, secundaria a la amplificación de ADN, lo cual los vuelve propensos a entregar falsos positivos producto de amplificación inespecífica (Priye y col., 2017). Para evitar esto, se ha propuesto el uso de la técnica QUASR (*Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters*, por sus siglas en inglés) para una detección LAMP que sea secuencia-específica, basada en la adición de un fluoróforo a uno de los partidores de la reacción que se incorpora al amplicón en caso de una amplificación positiva (Ball y col., 2016).

Junto con este partidor marcado, se añade una pequeña sonda complementaria capaz de disminuir o *quenchear* la fluorescencia de los partidores que no fueron incorporados a un amplicón al finalizar y enfriar la reacción (Figura S3 Anexo). De esta manera, los partidores fluorescentes sólo emiten una señal fluorescente si hay una amplificación específica de la secuencia a detectar.

Un ejemplo del uso de LAMP-QUASR son las reacciones *GMO Detective* (<https://gmodetective.com>), las cuales detectan la presencia del promotor 35S (utilizado comúnmente en la generación de plantas transgénicas (Sánchez, 2020)) y forman parte de un proyecto educativo y de ciencia ciudadana hacia un mayor conocimiento científico en la población sobre la presencia de transgénicos en los alimentos. La técnica QUASR también se utiliza para la detección de SARS-CoV-2 mediante reacciones RT-LAMP (Garneret y col., 2021; Bektaş y col., 2021), capaces de amplificar ARN al añadir una transcriptasa reversa a la reacción LAMP sin que esta pierda su propiedad isotermal.

1.3.2 Ventajas y limitaciones de reacciones LAMP

LAMP presenta un conjunto de ventajas que la vuelve una herramienta atractiva de diagnóstico. A diferencia del PCR, la rapidez de la reacción LAMP permite ya observar resultados positivos alrededor de los 30-35 minutos (Kumar y col., 2021). Además, al ser isotermal es posible su implementación con instrumentos más económicos y accesibles que un termociclador (Poole y col., 2017), como el uso de un calentador de alimentos tipo *sous-vide* (Kellner y col., 2021; Peltzer y col., 2021). Junto con lo anterior, el uso de indicadores colorimétricos o fluorescentes, como los descritos previamente, permite una fácil visualización del resultado de amplificación que favorece aún más su uso en terreno.

Pese a sus ventajas, existen una serie de limitaciones al uso de reacciones LAMP. La alta eficiencia de la reacción también la vuelve propensa a contaminación por arrastre, lo que a menudo conduce a falsos positivos (García-Bernalt Diego y col., 2019). De ocurrir esta contaminación suele ser difícil de degradar y eliminar por completo (Wong y col., 2018), por lo que se debe tener extremo cuidado al momento de llevar a cabo estas reacciones y preferir métodos de visualización que no requieran la apertura de los tubos una vez realizada la amplificación (Ball y col., 2016).

Por otro lado, el diseño de partidores LAMP es un problema complejo. La reacción requiere de 4 a 6 partidores, en cuyo diseño se deben considerar factores tales como la distancia entre ciertas secuencias, su contenido CG, diferencias de T_m , estabilidad en cada extremo, además de considerar posibles interacciones entre partidores (Rockweiler, 2018). Si bien este proceso se realiza con ayuda de *software* especializado y gratuito como la herramienta *PrimerExplorer5*, el uso de múltiples partidores aumenta considerablemente la posibilidad de encontrar dímeros y/o estructuras secundarias estables que amplifiquen incluso en ausencia de templado, dando un falso positivo (D. G. Wang y col., 2015). Por tanto, sigue siendo necesario realizar un análisis particular e individual de los conjuntos entregados por el programa, con tal de minimizar estas interacciones. Además, un buen resultado *in silico* no es necesariamente predictivo de una correcta amplificación, lo que lleva muchas veces a tener que rediseñar y testear repetidamente nuevos partidores (Zhang & Tanner, 2022).

1.4 Implementación en terreno de reacciones LAMP

1.4.1 Liofilización de preparaciones LAMP

Un obstáculo importante para el uso de LAMP en entornos con recursos limitados es la necesidad de almacenar en frío los componentes de la reacción (Kumar y col., 2021).

Como solución, el secado de *master mixes* de reacciones LAMP se muestra como una herramienta para el transporte estable de estas reacciones a lugares lejanos donde serán posteriormente rehidratadas, sin requerir de una cadena de frío (Aidelberg y col., 2021). A la fecha, existen diversos artículos que mencionan el uso de la liofilización para el secado, almacenamiento y transporte de reacciones LAMP con prometedores resultados (Carter y col., 2017; Garneret y col., 2021; Kumar y col., 2021)

La liofilización es un método de secado en frío en que el agua es removida por sublimación de una muestra previamente congelada, cuya realización a bajas temperaturas permite conservar mejor la integridad de la muestra y por mayores periodos de tiempo (Nireesha y col., 2013), lo que la convierte en el método ideal para el secado de muestras biológicas o termolábiles que muchas veces no resisten bien un proceso de secado por calor (Hammerling y col., 2021). No obstante, se ha visto que el tiempo de almacenamiento máximo de una reacción en seco depende del set de partidores utilizados (García-Bernalt Diego y col., 2021), por lo que la máxima estabilidad posible para cada reacción LAMP debe estudiarse caso a caso.

1.4.2 Fabricación de enzimas caseras en el contexto de ciencia colaborativa

Por otro lado, el alto costo de los reactivos comerciales limita bastante la implementación en terreno de LAMP y otras reacciones de biología molecular (Alcántara y col., 2021). Esto ha quedado en evidencia con la pandemia del COVID-19, donde la centralización de la producción de *kits* de detección en el hemisferio Norte ha requerido la continua importación de reactivos a un ritmo incapaz de satisfacer las demandas requeridas para combatir eficientemente esta emergencia sanitaria (Cerdeira y col., 2021).

Diversas iniciativas globales buscan empoderar al Sur Global hacia la fabricación local de reactivos e instrumentos que permitan su independencia tecnológica. Por ejemplo, las redes de colaboración científica internacional como *JOGL* y *ReClone* buscan conectar centros de investigación, generar foros de discusión, distribuir recursos y compartir conocimientos hacia las industrias emergentes. Por otro lado, los repositorios abiertos y de distribución gratuita de enzimas libres de patentes como *Open Enzymes*, buscan que el material básico para la elaboración de diversas técnicas de biología molecular esté disponible y accesible a las comunidades científicas locales (Ravindran, 2020). Actualmente, varios laboratorios alrededor del mundo (incluyendo el Laboratorio de Tecnologías Libres en Chile) trabajan en la producción de reactivos moleculares producidos en casa, libres de patentes, buscando el desarrollo de sistemas de detección molecular de bajo costo, (Bektaş y col., 2021; Bhadra y col., 2021).

En el contexto de la lucha contra la pandemia del *SARS-CoV-2*, recientemente se ha logrado expresar y purificar una versión de la polimerasa *BstLF* libre de patentes (Rivera y col., 2020) para su uso reacciones tipo RT-LAMP en conjunto con una transcriptasa reversa *M-MLV* también producida de forma local (Kellner y col., 2021; Matute y col., 2021). De esta manera, se ha podido detectar el virus mediante reacciones “caseras” cuyos reactivos fueron preparados manualmente en el laboratorio sin recurrir a *kits* comerciales. Este hito permite proyectar el uso de reacciones tipo LAMP para la elaboración de *kits* de detección caseros para otros patógenos de interés local como podría ser el patógeno *Fol*.

En resumen, la ausencia de un método de control seguro y efectivo para *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, junto con su fácil dispersión y prolongada persistencia en los suelos, hacen que la detección temprana de este hongo patógeno sea una prioridad

para la agricultura. Para esto, el uso de reacciones isotermas como LAMP se presenta como una atractiva herramienta molecular para lograr una detección rápida, fácil de visualizar y específica a esta *forma specialis*. Con miras a que esta herramienta de detección sea realmente aplicable en terreno, donde muchas veces no se cuentan con equipos especializados o elevados recursos económicos, se propone el uso de reacciones LAMP preparadas a partir de reactivos caseros y enzimas libres de patentes para la detección de *Fol*, junto con un análisis preliminar de este tipo de preparaciones isotermas caseras en su formato liofilizado. Bajo este contexto, el Seminario de Título desarrollado contó con los siguientes objetivos:

1.5 Objetivo General

Diseñar y evaluar una reacción LAMP para la detección de una secuencia conservada y específica de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, y evaluar la factibilidad técnica de la liofilización en preparaciones LAMP realizadas con reactivos caseros

1.6 Objetivos Específicos

OE1: Desarrollar un control positivo en base a una secuencia conservada y específica de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* para su detección mediante reacciones moleculares

OE2: Validar experimentalmente un set de partidores para la detección LAMP de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

OE3: Evaluar la factibilidad y estabilidad de preparaciones LAMP liofilizadas realizadas con reactivos caseros

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño de un control positivo de *Fol* para su detección molecular

En base a un análisis de la bibliografía existente (Lievens y col., 2009; Ayukawa y col., 2016; Jangir y col., 2021), se determinó a los genes *six2* y *six5* como posibles genes candidatos para una detección de cualquiera de las razas de *Fol* específica a la *forma specialis* que infecta al tomate. Se realizaron análisis BLAST de *six2* y *six5*, cuyos resultados con relación al porcentaje de identidad con ortólogos de otras *forma specialis* llevaron a la elección del *six5* como gen candidato para la detección molecular de *Fol*.

Se buscaron secuencias de ADN del gen *six5* de *Fol* en la base de datos de NCBI, omitiendo resultados que no estuvieran verificados, que fueran de ARNm o que no detallaran que la secuencia provenía de esta *forma specialis* del hongo. Las secuencias resultantes (GenBank *accession numbers*: GQ268952, KM047033, MK906606, MN745210, MN745209, MK906608 y MK906607) fueron utilizadas en un alineamiento múltiple de secuencias con la herramienta *Clustal Omega* para nucleótidos (Sievers y col., 2011). A partir del resultado anterior, se utilizó la herramienta *Emboss Cons* (Rice y col., 2000) para obtener una secuencia consenso, *six5_conserved* (Tabla S1 Anexo).

Con esta información, se diseñó un fragmento de ADN de doble hebra tipo gBlock® con parte de la secuencia consenso *six5_conserved* flanqueada en ambos extremos por secuencias con sitios de corte para la enzima *SapI*, con el fin de insertar este fragmento en el plásmido pL0R-LacZ (GenBank *accession number* MN436816), mediante un protocolo de digestión con la enzima *SapI* y posterior ligación con la enzima *T4 ligasa* previamente descrito (Pollak, 2019a). El gBlock diseñado, denominado *gsix5* (Tabla S1 Anexo), fue sintetizado químicamente por *IDT*, junto con partidores *gsix5_Fw* y *gsix5_Rv* que amplifiquen este fragmento a partir de sus extremos (Tabla S2 Anexo).

2.2 Clonamiento y Transformación de pL0R-gsix5 en bacterias

Para la generación de un control positivo a utilizar en reacciones LAMP *Fol*, se insertó la región del gen *six5* presente en un gBlock® (*gsix5*) en pL0R-LacZ (Pollak, 2019b), un vector de entrada que posee un *cassette* de resistencia a espectinomicina, el gen *lacZ* como marcador de selección y sitios de restricción para las enzimas de restricción *BsaI* y *SapI*. La digestión y posterior ligación fue realizada según el protocolo descrito por Pollak (2019a) utilizando la enzima *SapI*, la enzima *T4* ligasa, 15 fmol de gSIX5, 7,5 fmol de pL0R-*lacZ* e incubando las reacciones en un termociclador Maxygene II (Axygen Inc). Además, se realizó un control de digestión-ligación el cual contenía el mismo mix de enzimas y ADN del plásmido, pero sin contener el inserto de *gsix5*.

Para la transformación del plásmido se añadió 1 µl de este mix a bacterias competentes *E. coli Top10* en hielo, seguido de una incubación a 42°C por 50 segundos, posterior incubación en hielo por 5 minutos y una incubación final con agitación a 37°C por 60 minutos, añadiendo antes 200 µl de medio Luria-Bertani (LB). 150 µl de cultivo fueron plaqueados en placas LB-agar suplementadas previamente con espectinomicina a 75 µg/mL, X-Gal a 50 µg/mL e IPTG 1 mM. Las placas se dejaron crecer *overnight* a 37°C.

2.3 PCR de colonia

Para comprobar la correcta transformación del plásmido, se realizó un PCR de 10 colonias blancas utilizando una GoTaq® ADN polimerasa y los partidores *gsix5_Fw* y *gsix5_Rv* a una concentración de 0,1 mM, de acuerdo con el protocolo descrito por el proveedor (Promega, M3005). Las reacciones de 25 µL fueron incubadas en un termociclador y el producto de reacción fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. El gel fue observado en un transiluminador de luz LED azul a 470 nm (IO Rodeo Inc.) con un filtro de luz ámbar.

2.4 Obtención y secuenciación del ADN plasmidial

Las colonias seleccionadas del gel anterior fueron almacenadas en un stock de glicerol al 50% a -80°C hasta su posterior uso. Con el fin de obtener ADN desde un cultivo, se realizaron inóculos en 10 mL de medio LB con 75 µg/mL de espectinomicina, los cuales se dejaron creciendo *overnight* a 37°C con agitación constante. El ADN plasmidial fue purificado mediante un *miniprep* siguiendo el protocolo descrito por el proveedor (Promega, A1330) y cuantificado en un lector de microplacas Epoch 2 (BioTek).

Una dilución a 100 ng/µL de ADN fue enviada a *Macrogen* para su secuenciación, utilizando partidores UNS1F y UNSXR para amplificar el inserto desde el *backbone* de pL0R (Tabla S2 Anexo). Los resultados fueron comparados, mediante un alineamiento de secuencias, con el diseño teórico para el plásmido pL0R-gsix5.

2.5 Diseño y Análisis de Partidores LAMP para *Fol*

Se diseñaron tres sets de partidores LAMP para *gsix5*. Para esto, se utilizó la herramienta *PrimerExplorer v5* (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/>) siguiendo las recomendaciones del sitio y de distintos autores (Priye y col., 2017; Rockweiler, 2018) en relación con los valores de ΔG y T_m de cada partidor. Al ser necesario, se cambiaron los parámetros por defecto con el fin de obtener más secuencias candidatas. Los sets escogidos con los partidores F3, B3, FIP y BIP fueron utilizados como *input*, en la misma herramienta, para el diseño y elección de partidores en loop LF y LB, debido a que el programa no permite el diseño simultáneo de estos seis partidores.

Distintos sets candidatos fueron analizados con la herramienta “*Multiple Primer Analyzer*” (Thermo Fischer Scientific, 2017), descartando conjuntos con grandes regiones de complementariedad entre partidores, en particular hacia el extremo 3', ya que estas

últimas pueden llevar a la amplificación no deseada de un dímero de partidores. También se utilizó la herramienta “*OligoAnalyzer* de *Integrated DNA Technologies*” (<https://idtdna.com/calc/analyzer>), con una concentración de 8 mM de Mg^{+2} , para analizar la estabilidad de las estructuras secundarias de cada partidor y descartar secuencias con estructuras muy estables (T_m sobre $45^{\circ}C$). En el caso de FIP y BIP, se descartaron estructuras con T_m sobre $65^{\circ}C$ y se evaluó, en caso de ser necesario, si la adición de una a cuatro timinas (T - TTTT) entre las dos regiones que componen cada partidor era capaz de romper o desestabilizar las estructuras secundarias formadas. En base a estos análisis, finalmente fueron escogidos tres sets candidatos de partidores a ser validados experimentalmente mediante reacciones LAMP.

Junto con lo anterior, se consideró que ya existe un set de partidores LAMP para el gen *six5* descrito en la literatura (Ayukawa y col., 2016). Este set fue analizado con *OligoAnalyzer* con el fin de seleccionar un partidor con estructuras secundarias poco estables que pueda ser modificado para su uso mediante la técnica QUASR (Ball y col., 2016). Se privilegió la elección de FIP o BIP, al estar presentes a una mayor concentración en la reacción. El primer escogido, FIP, es modificado en su extremo 5' mediante la adición de un fluoróforo FAM. Además, se diseñó una sonda de unos 7-13 nucleótidos que complementaria a este extremo (FIPc-QCR), con la adición de un *Black Hole quencher* en su extremo 3' capaz de apagar o “*quenchea*” la señal emitida por el fluoróforo. Los tres sets previamente descritos, junto con el set QUASR diseñado (Ayukawa-Q) son sintetizados por *IDT* y sus secuencias se presentan en la Tabla I:

Tabla I: Set de partidores LAMP diseñados para el gen *six5* de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

| Set | Partidor | Secuencia | Modificación |
|---------------|---------------|--|--------------|
| Set 1 | SIX5-F3_V1 | ATAAACCTGGTCCACGATT | |
| | SIX5-B3_V1 | CCTGGTGAGATTTAGAGCA | |
| | SIX5-FIP_V1 | GCTAGTCAAGGTTAGTTCAGGCACGCTGGCATTATGTAAGTCT | |
| | SIX5-BIP_V1 | TGAAAGCTGCAAATGGCAAATTTGTCAAAGCATGTTGAGTCTGC | |
| | SIX5-LF_V1 | CTTAATCATCCTAAGCTGT | |
| | SIX5-LB_V1 | TGGCGATACATTTCTATAATC | |
| Set 2 | SIX5-F3_V2 | GTTCTGGTGACAGCATTGA | |
| | SIX5-B3_V2 | GTTCAGGCACTTAATCATCC | |
| | SIX5-FIP_V2 | CCAATTGCCCAATCACTATGAGGCCACTCAGCTTCAGAACG | |
| | SIX5-BIP_V2 | ATAGCTCAGACCTCTCCAGCAAAATGCCAGCGAATCGTG | |
| | SIX5-LF_V2 | ACATACCCACAAATATGATTTACT | |
| | SIX5-LB_V2 | TGCTGACCGTCATAAACCT | |
| Set 3 | SIX5-F3_V3 | CTTGCCAGTCCGGTTCT | |
| | SIX5-B3_V3 | GCCATTTGCAGCTTTCAG | |
| | SIX5-FIP_V3 | AGCTTGCCCAATTGCCCAATCCACCACTCAGCTTCAG | |
| | SIX5-BIP_V3 | ATAGCTCAGACCTCTCCAGCAAAATGCCAGCGAATCGTG | |
| | SIX5-LF_V3 | ACTATGAGGTATACATACCCACAA | |
| | SIX5-LB_V3 | TATTGGTTTGCTGACCGTCATAAAC | |
| Set Ayukawa-Q | SIX5-F3 | CCTCTCCAGCATATTGGTT | |
| | SIX5-B3 | GTCAAAGCATGTTGAGTCTG | |
| | SIX5-FAM-FIP | GCACTTAATCATCCTAAGCTGTAGATTGCTGACCGTCATAAACCT | FAM 5' |
| | SIX5-BIP | TGAACTAACCTTGACTAGCTGAAAGTTCTCCTCCATTATTAATGCAAAGA | |
| | SIX5-LF | TGCCAGCGAATCGTGGACC | |
| | SIX5-LB | CTGCAAATGGCAAATTTGATGGCGA | |
| | SIX5-FIPc-QCR | ATTAAGTGC | IBHQ 3' |

2.6 Obtención de Ácidos Nucleicos para *GMO Detective*

Para las reacciones con promotor 35S (tipo *GMO Detective*), ya existe un set de partidores LAMP-QUASR utilizado por el Laboratorio de Tecnologías Libres. Las secuencias de este conjunto de partidores se presentan en la Tabla S3 del Anexo.

El control positivo utilizado en estas reacciones corresponde a una dilución a 10 mil copias/ μ l del plásmido pL0R-35S, obtenido de un *miniprep* proveniente de un cultivo de bacterias *Top10* que expresan el plásmido. Este vector fue obtenido de forma similar a pL0R-gsix5, y el cultivo fue donado por el Laboratorio de Tecnologías Libres.

En el caso de utilizar ADN desde alimentos (Tabla S4 del Anexo), se siguió el protocolo del taller de *GMO Detective* (Aidelberg & Rios, n.d.) donde una fracción de cada muestra fue molida en un tubo de 2 mL con 60 μ l de agua destilada. Los tubos fueron depositados en un vaso precipitado con agua hervida en su interior y cubierto de papel aluminio durante 5 minutos con el fin de desactivar las nucleasas que podrían estar presentes, para ser posteriormente almacenados a -20°C hasta su uso.

2.7 Obtención y almacenamiento de *BstLF* polimerasa

La enzima *BstLF* fue obtenida y expresada en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Rivera y col (2020), y diluida a una concentración de uso de 0,2 mg/mL.

Una fracción de lo obtenido fue almacenada en un *buffer* con glicerol a -20°C hasta su uso en reacciones LAMP, mientras que otra fracción fue almacenada a -80°C en un *buffer* sin glicerol para su uso en un *master mix* de reacciones LAMP a ser liofilizado.

2.8 Reacciones LAMP

Se realizaron distintos tipos de reacciones LAMP, que varían según el método de visualización de los resultados, la composición y fuente de origen de los *buffers*. Además, los partidores y controles positivos varían según el ADN a detectar:

- **Para las reacciones de *Fol*:** Se utilizaron como partidores los sets 1, 2, 3 o *Ayukawa-Q* y una concentración final de 20 mil copias del plásmido pL0R-gsix5 por reacción positiva.
- **Para *GMO Detective*:** Se utilizó el set de partidores 35S-Z y una concentración final de 20 mil copias del plásmido pL0R-35S por control positivo. Para las reacciones con muestras de alimentos, se utilizaron 2 µl de la dilución obtenida.

2.8.1 LAMP QUASR con reactivos caseros

Para las reacciones LAMP preparadas con reactivos caseros, se siguió el protocolo de Matute y col. (2021) con modificaciones para ser utilizado con la técnica QUASR (Ball y col., 2016) y un volumen final de reacción de 10 µl. Cada reacción posee 1X *Buffer* Isothermal (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Tween 20), 6 mM MgSO₄, 1,4 mM de dNTPs, 0,16 mg/mL de *BstLF* y un mix 10X de partidores LAMP 35S-Z (1,6 µM de FIP-BIP, 0,4 µM de LF-LB, 0,2 µM de F3-B3 y 2,4 µM de BIPc-IBHQ).

Las reacciones fueron incubadas a 63°C por 35 minutos y 15°C por 15 minutos, para posteriormente ser observadas en un transiluminador de luz LED azul. Las fotografías presentadas fueron obtenidas con una cámara Canon T3i y un lente 24mm f/2.8. Las reacciones se llevaron a cabo con dos réplicas técnicas cada una y en triplicado (n = 3).

2.8.2 LAMP Liofilizado con reactivos caseros

En el caso de las preparaciones liofilizadas, siguiendo el protocolo de Aidelberg y col. (2021), se preparó un mix de reacción con 0,16 mg/mL *BstLF* (almacenada sin glicerol a -80°C), 1,4 mM dNTPs, un *mix* 10X de partidores LAMP 35S-Z y trehalosa al 5%. Cada tubo con 8 µl de este *mix* fue sellado con parafilm y pre-congelado a -80°C por 10-20 minutos, con el fin de proteger el contenido de “saltar hacia afuera” dentro del liofilizador (debido a cambios abruptos de presión) y asegurar un estado sólido que favorezca una correcta sublimación, respectivamente.

Posteriormente, se perforó el parafilm de cada tubo y las preparaciones fueron ubicadas en un liofilizador de sobremesa FreeZone 2,5L (LabConco) a -84 °C y 0,04 mBar por 2-3 horas, subiendo gradualmente la temperatura durante los últimos 30 minutos. Los tubos fueron cerrados y sellados al vacío en bolsas gofradas de plástico con un sachet de sílica gel, un absorbedor de oxígeno y un pulso de gas argón en su interior para desplazar el aire de la atmósfera en contacto con el material liofilizado. Las bolsas fueron depositadas en bolsas de aluminio que también fueron selladas al vacío, permitiendo almacenar las preparaciones en oscuridad y temperatura ambiente o 4°C por un tiempo de 7 o 14 días (o 2 meses, en algunos casos).

Posteriormente, cada mezcla liofilizada fue rehidratada con ADN (o H₂O en los controles negativos) y una mezcla que contiene 6 mM MgSO₄ y 1X *Buffer* Isothermal a un volumen final de 10 µl por reacción. Las reacciones fueron incubadas y su fluorescencia fue observada de manera similar a las reacciones frescas detalladas en la sección anterior. A continuación, se presenta un esquema que resume el montaje experimental realizado (Figura 3):

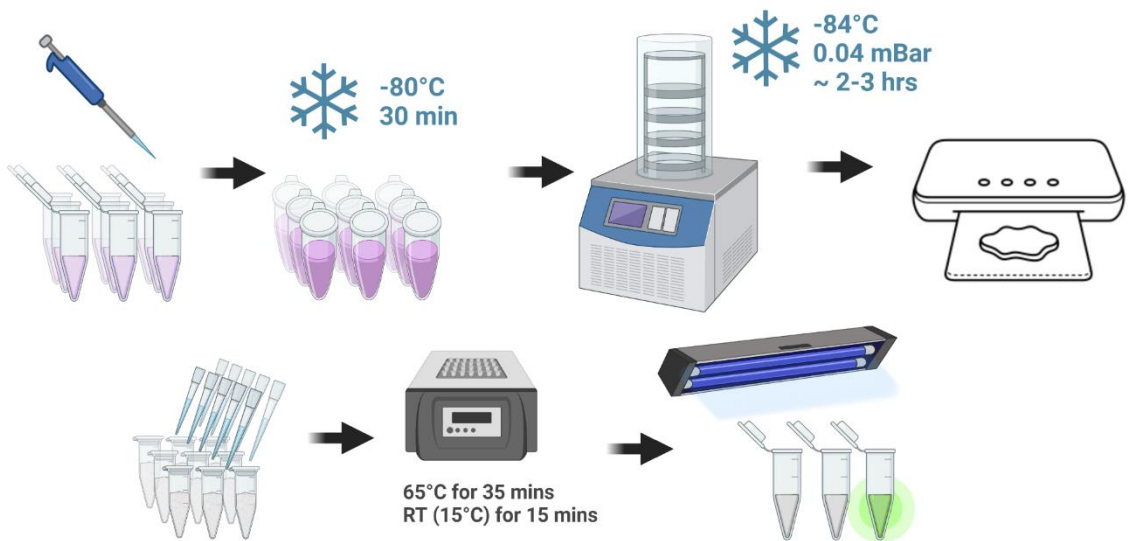


Figura 3: Esquema de liofilización de reacciones LAMP. Esquema ilustrativo del protocolo utilizado en la liofilización de reacciones LAMP, incluyendo (en orden, desde el borde superior izquierdo): la preparación y alicuotado de un *master mix* de reacción, el pre-congelado de las preparaciones, su liofilización, sellado al vacío, rehidratación, incubación y observación de su fluorescencia.

En algunos casos, el MgSO_4 y 1X *Buffer* Isothermal fueron añadidos directamente a la mezcla a liofilizar. De ser así, las reacciones fueron rehidratadas solamente con ADN (o H_2O), mientras que el resto del proceso fue realizado de la misma manera.

2.8.3 LAMP Colorimétrico

Para las reacciones LAMP colorimétricas se siguió el protocolo descrito por Poole y col. (2017), basado en el uso del indicador *neutral red* en reacciones de amplificación en ausencia de amortiguadores tipo Tris (Tanner y col., 2015).

Cada reacción de $10\ \mu\text{l}$ contiene $1,4\ \text{mM}$ de dNTPs, $10\ \text{mM}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $8\ \text{mM}$ MgSO_4 , $10\ \text{mM}$ KCl, $0,1\%$ Tween-20, $0,1\ \text{mM}$ *neutral red*, $0,16\ \text{mg/mL}$ de *BstLF* y un mix 10X de primers LAMP ($1,6\ \mu\text{M}$ de FIP-BIP, $0,2\ \mu\text{M}$ de F3-B3 y $0,4\ \mu\text{M}$ de LF-LB, a menos que se indique lo contrario).

Las reacciones fueron incubadas a 63°C por 35 minutos (o el tiempo indicado) y observadas a simple vista con luz de día. Las fotografías presentadas fueron obtenidas con una cámara Canon T3i y un lente 24mm f/2.8.

2.8.4 LAMP de *output* fluorescente a tiempo real

Para observar la emisión de fluorescencia a tiempo real, se prepararon reacciones LAMP para *Fol* de 20 µl utilizando el *kit WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA)* (NEB, E1700S), los partidores del set 1, 2 o 3 y el protocolo descrito por el proveedor

La medición de fluorescencia a tiempo real fue realizada en un equipo de qPCR Stratagene Mx3000P (Stratagene-Agilent) adaptado para LAMP con los siguientes parámetros: 65°C por 60 segundos, 45 ciclos a 65°C por 60 segundos, 95°C por 60 segundos, 55°C por 30 segundos, 95°C por 60 segundos. Los datos de fluorescencia fueron recolectados al final de cada ciclo de 65°C y en la rampa de temperatura de entre 55 a 95°C. Las reacciones se llevan a cabo con dos réplicas técnicas cada una y en triplicado (n = 3).

RESULTADOS

3.1 Elección de un gen marcador de *Fol* y diseño *in silico* de un control positivo para su detección molecular

Dado que los genes *six* están relacionados con la virulencia e interacción específica entre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y la planta de tomate, (Lievens y col., 2009), se decidió trabajar con uno de estos genes para el diseño de partidores LAMP que permitan detectar este patógeno. En primera instancia, se decidió trabajar con los genes *six2* y *six5*, al ser secuencias conservadas entre las tres razas de *Fol* (Jangir y col., 2021). Sin embargo, al realizar un análisis BLAST de *six2* (Figura S4 Anexo), se observó que este se encuentra presente en varios aislados de otras especies de *Fusarium* como *F. fujikuroi* con un alto porcentaje de identidad (sobre 88%). Por otro lado, se observó que *six5* se encuentra presente casi únicamente en *Fol*, con la pequeña excepción de dos cepas de *Fo* que infectan cebolla (Figura S4 Anexo) pero con menor porcentaje de identidad. Debido a esto, se decidió seguir trabajando sólo con el gen *six5*.

Con el fin de identificar una región conservada de este gen, cuya secuencia parece ser específica para esta *forma specialis* del hongo, se tomaron todas las secuencias de ADN del gen *six5* de *Fol* presentes en la base de datos de NCBI y se sometieron a un alineamiento múltiple de secuencias. Del alineamiento, se observó que las secuencias comparten desde un 98,25% de identidad entre ellas (Figura S5 Anexo), demostrando el alto grado de conservación que presenta *six5*. A partir de estos resultados, se obtuvo la secuencia consenso denominada *six5_conserved*, de un largo de 593 pb (Tabla S1 Anexo), la cual fue utilizada para el diseño de partidores LAMP y la generación de un control positivo para las amplificaciones.

3.2 Obtención de un plásmido a usar como control positivo de amplificación

Para obtener un control positivo de *six5* a utilizar en reacciones moleculares, se buscó insertar parte de la secuencia consenso de *six5* en un plásmido, que al ser transformado en bacterias permitiera obtener una “fuente” constante de DNA a utilizar como control.

Para una correcta inserción de la secuencia consenso en un plásmido, se ordenó la síntesis química del fragmento *gsix5* (Tabla S1 Anexo). Este fragmento contiene parte de la secuencia *six5_conserved* flanqueada en ambos extremos por sitios de corte para la enzima *SapI*, de forma de poder insertar fácilmente *gsix5* en el vector de entrada escogido pL0R-*lacZ*. Esta inserción se realizó mediante varios ciclos de digestión-ligación en el mismo tubo con las enzimas *SapI* y T4 ligasa, con el fin de obtener el constructo pL0R-*gsix5* (Figura S6 Anexo).

Este vector fue introducido en bacterias competentes mediante una transformación por shock térmico, en presencia de espectinomicina, IPTG y X-Gal. Dado que la correcta incorporación del fragmento a insertar reemplaza al gen *lacZ* en el vector de destino, se puede realizar un *blue-white screening* al plaquear con X-Gal. De este modo, se escogieron las colonias blancas, cuya coloración era indicativa de una ausencia de actividad β -galactosidasa capaz de degradar el X-Gal a un producto azul (Maas, 1999). Sin embargo, la ausencia de coloración azul no implica necesariamente una correcta inserción del plásmido pL0R-*gsix5* en las bacterias, ya que existe la posibilidad que en el proceso de digestión-ligación algunos vectores hayan escindido el gen *lacZ* y la ligasa haya unido sus extremos sin que *gsix5* se haya unido. Para verificar que efectivamente las colonias blancas tenían el constructo deseado, se realizó un PCR de colonia a diez de estas colonias utilizando partidores específicos a *gsix5*. El producto fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 4).

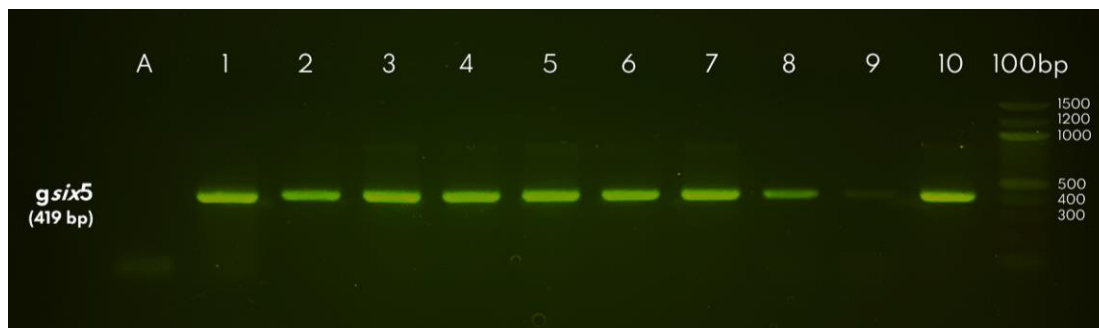


Figura 4: PCR de colonia de transformación de pL0R-*gsix5*. Gel de electroforesis del producto de PCR, con partidores *gsix5_Fw* y *gsix5_Rv*, de distintas colonias transformadas con pL0R-*gsix5*. A indica una colonia azul (control negativo), 1-10 indican distintas colonias blancas y 100 bp corresponde al marcador de tamaño NEB.

Al observar el gel, vemos que todas las colonias blancas presentan una banda de tamaño cercano a los 400 pb, lo que corresponde al tamaño esperado del amplicón de *gsix5* (419 pb) y sugiere una correcta transformación del vector en estas colonias.

En base a lo anterior, se seleccionaron las colonias con mayor intensidad de banda y menor contaminación (carriles 1, 2, 4 y 10) para almacenarlas en glicerol 50% y -80°C. Al crecer la colonia 1 en medio LB con antibiótico y realizar un *miniprep* de este cultivo, se obtuvo ADN plasmidial a una concentración de 171 ng/μl, el cual fue enviado para servicio de secuenciación utilizando partidores UNS1 y UNSX específicos al vector. Para comprobar la presencia del fragmento *gsix5* en este ADN plasmidial, una alícuota del *miniprep* fue enviada para su secuenciación, junto con los partidores UNS1 y UNSX específicos al vector pL0R. Al analizar la secuenciación realizada (Figura S7 Anexo), se observa que los datos obtenidos coinciden con el constructo teórico de pL0R-*gsix5* tanto en regiones del vector pL0R como con la totalidad del fragmento *gsix5*, sugiriendo una correcta inserción de esta secuencia de ADN en el plásmido. Por lo tanto, se puede afirmar que se cuenta con un control positivo del gen *six5* de *Fol* que puede ser utilizado para la detección LAMP de cualquiera de las tres razas de este hongo. El plásmido pL0R-*gsix5*, verificado por secuenciación, fue diluido para su futuro uso en reacciones LAMP.

3.3 Evaluación de un set de partidores previamente descrito para la detección de una secuencia conservada de *Fol* mediante reacciones LAMP-QUASR

Una vez obtenido el ADN de *six5* a utilizar como control positivo, se procedió a la búsqueda de un set de partidores para reacciones LAMP que detecten *Fol*. Para esto, se modificó un conjunto previamente descrito para amplificar *six5* (Ayukawa y col., 2016) para ser utilizado con la técnica QUASR, la cual permite una amplificación más específica, fluorescente y con menor riesgo de contaminación (Ball y col., 2016). Se realizó un análisis de la estabilidad de las estructuras secundarias de los partidores, especialmente de FIP y BIP (Figura S8 Anexo) al estar presentes a una mayor concentración, proponiendo a FIP como el mejor candidato del set para ser modificado con un fluoróforo en el extremo 5'. Se diseñó una sonda complementaria de *quencheo* (FIPc-QCR) y se llevaron a cabo reacciones LAMP utilizando este set QUASR (Set Ayukawa-Q) y el control positivo previamente diseñado (Figura 5).

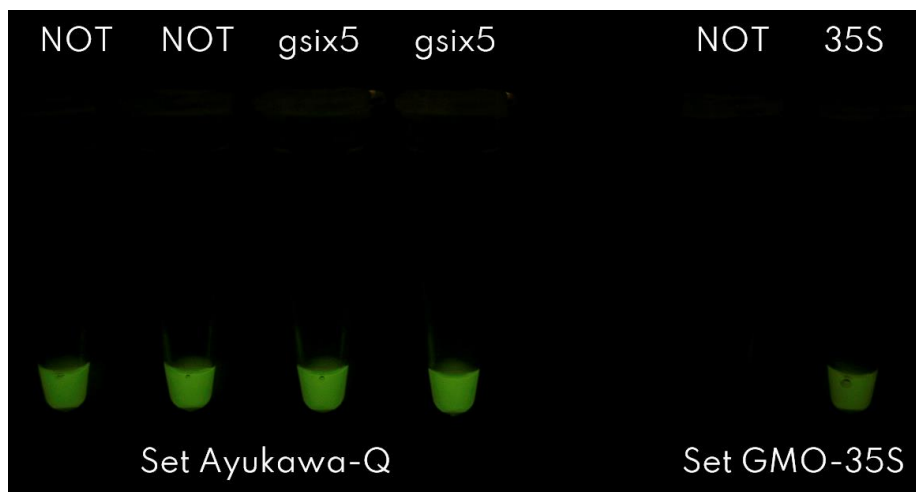


Figura 5: Reacciones LAMP-QUASR para la detección de *six5*. Resultados de fluorescencia de reacciones LAMP caseras. A la izquierda, reacciones con partidores del set Ayukawa-Q y a la derecha con el set de partidores GMO-35SZ, utilizado en este caso como un control de reacción que detecta la presencia del promotor 35S. NOT indica controles negativos sin templado y 35S o gSIX5 reacciones con 20 mil copias del plásmido pL0R-35S o pL0R-gsix5, respectivamente.

Cabe señalar que como control de reacción (tanto negativo como positivo), se trabajó con reacciones LAMP-QUASR tipo *GMO Detective* que detectan la presencia del

promotor 35S. Se eligió esta reacción, dado que se contaba con partidores y controles positivos ya validados en el laboratorio utilizando tanto *kits* comerciales, como enzima y reactivos caseros de forma consistente y reproducible (Figura S9 Anexo).

Al observar los resultados del testeo del set *Ayukawa-Q* (Figura 5, izquierda), se observa una amplificación inespecífica de los controles negativos que no permite distinguirlos de las reacciones que contienen la secuencia templado *gsix5*. En paralelo a estas reacciones, se corrieron reacciones de *GMO Detective* (Figura 5, derecha) en las que sí es posible distinguir claramente las reacciones positivas de las negativas. Estos resultados se repiten las tres veces que se realiza el experimento (n=3).

Debido a lo anterior, se llevaron a cabo diversos experimentos con el fin de entender la razón de este fallo e intentar corregirlo. Una primera hipótesis de trabajo es que la alta concentración de fluoróforo genera una señal tan intensa que el *quencheo*, de ocurrir, no es perceptible. Para someter a prueba esta hipótesis, se realizaron experimentos de amplificación LAMP utilizando distintas concentraciones del partidor con fluoróforo FAM-FIP (1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 μM), pero manteniendo la concentración de la sonda de *quencheo* a 2,4 μM . Esto permitiría estudiar el efecto de cambiar la razón de las concentraciones de fluoróforo y *quencher* entre 1:1,5 a 1:12. El resultado de este experimento muestra que si bien la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de fluoróforo en la reacción (Figura 6A), a ninguna concentración testada se observa una diferencia clara entre reacciones con o sin ADN templado (*gsix5* vs NOT).

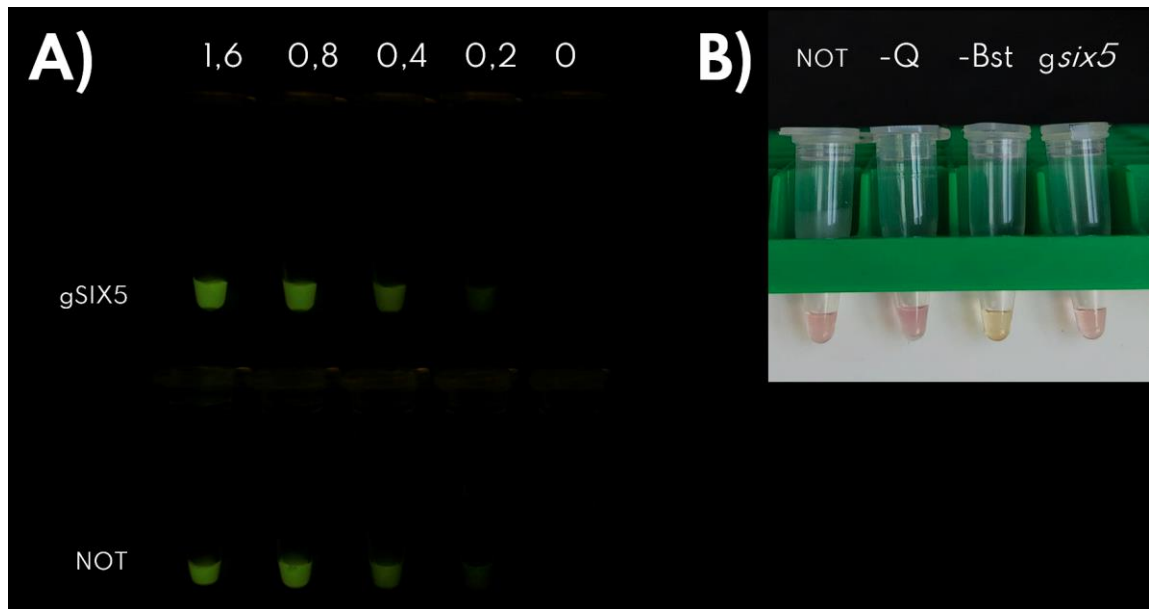


Figura 6: Reacciones LAMP *Fol* a distintas condiciones. **A)** muestra los resultados de fluorescencia de reacciones LAMP-QUASR para *Fol*, con partidores del set Ayukawa-Q a una concentración variable del partidor FIP entre (de izquierda a derecha) 1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 o 0 μM . **B)** presenta los resultados a simple vista de reacciones LAMP colorimétricas para *Fol*. NOT indica controles negativos sin templado, gSIX5 reacciones con 20 mil copias del plásmido pL0R-gsix5, -Q reacciones positivas (con ADN templado) en las que no se incluye el partidor FIPc-QCR y -Bst a reacciones (con ADN templado) sin *BstLF* polimerasa.

Una segunda hipótesis de trabajo que se evaluó fue que existen fenómenos intrínsecos a la fluorescencia misma que podrían estar afectando los resultados. Por lo tanto, se realizaron reacciones LAMP colorimétricas basadas en *neutral red*, en donde la amplificación genera un cambio en pH que lleva a un cambio de color de las reacciones de amarillo a rosado (Tanner y col., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos (Figura 6B) muestran un cambio de color, indicativo de un cambio de pH secundario a la amplificación, tanto en ausencia como en presencia de *gsix5*. Esto no varía si se decide añadir la sonda de *quencheo* (FIPc-QCR) a la reacción o no (-Q en Figura 6B), y sólo se observa una señal amarilla, indicativa de una ausencia de amplificación, en reacciones sin *BstLF* polimerasa (-Bst, Figura 6B).

En base a los resultados anteriores se establece que existe un problema relacionado al conjunto de partidores en sí mismo que lleva a una amplificación no específica de los

controles negativos. Esta amplificación, al ser no específica, no es apagada por la sonda FIPc-QCR. Debido a lo anterior, se decide diseñar nuevos sets de partidores para *gsix5* para su posterior evaluación mediante reacciones LAMP colorimétricas.

3.4 Diseño y testeo de tres sets de partidores LAMP para *six5*

Para el diseño de partidores LAMP para *gsix5*, se utilizó la herramienta *PrimerExplorer v5*, modificando los parámetros por defecto con el fin de obtener y analizar un mayor número de conjuntos de partidores. Los sets obtenidos que cumplen con los parámetros recomendados fueron analizados mediante distintas herramientas bioinformáticas con el fin de descartar conjuntos que presenten altas regiones de complementariedad entre sus secuencias, dímeros de partidores y/o estructuras secundarias muy estables en términos de ΔG y T_m que afecten la especificidad y calidad de la amplificación. Tres sets candidatos fueron seleccionados para su validación experimental, sus secuencias se presentan en la Tabla I, mientras que en la Figura S10 del Anexo se muestra el sitio de unión de cada secuencia a *gsix5*.

Para cada set de partidores, se prepararon reacciones LAMP colorimétricas basadas en *neutral red* con el objetivo de estudiar su efectividad para la detección de *FoI* y la generación de posibles falsos positivos (Figura 7).

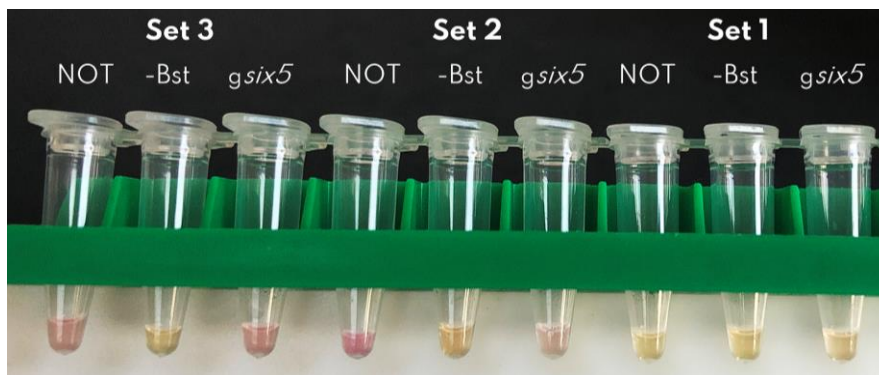
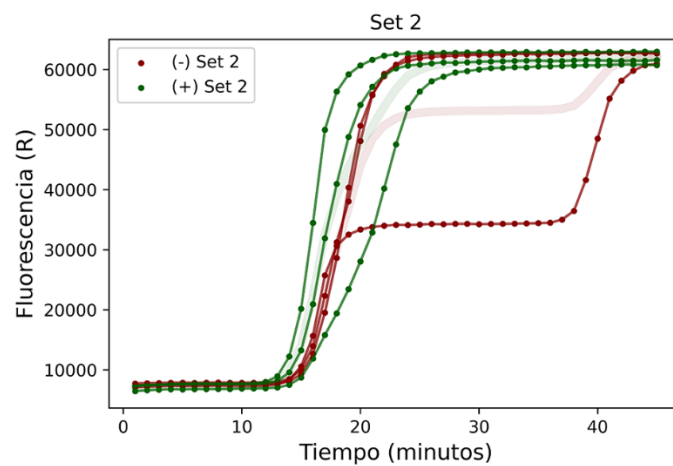
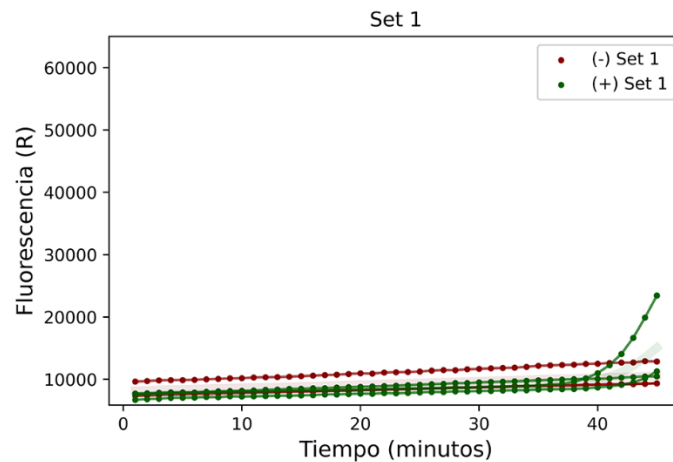


Figura 7: Testeo de sets 1-3 en reacciones LAMP colorimétricas para *Fol*. Se muestran los resultados colorimétricos de reacciones LAMP caseras que utilizan *neutral* red como indicador y el set 3, 2 o 1 de partidores LAMP para la detección del gen *six5* de *Fol*. Para cada set, se presentan, de izquierda a derecha, un control negativo sin templado (NOT), un control sin *BstLF* polimerasa (-Bst) y una reacción positiva con 20 mil copias del plásmido pLOR-gsix5 (*gsix5*).

Al realizar los primeros ensayos (Figura 7), se observó una coloración rosada en los tubos de los sets 2 y 3 (indicativo de una amplificación de ADN) tanto en presencia como en ausencia de ADN templado (*gsix5* y NOT). Por otro lado, todas las reacciones del set 1 se mantuvieron de color amarillo, sugiriendo que en ninguna ocurrió amplificación. Para los tres sets, se observa una ausencia de amplificación en controles sin la *BstLF* polimerasa (control negativo de amplificación).

De modo de descartar problemas de contaminación con amplicón, fenómeno que suele ser frecuente al trabajar con reacciones LAMP (Parida y col., 2008; Suleman y col., 2016), se decidió evaluar a estos tres sets en otro laboratorio en el cual nunca se habían realizado amplificaciones LAMP de *gsix5*. Para esto, se realizó un LAMP fluorescente a tiempo real, que permitiera observar posibles diferencias en las curvas de amplificación durante reacciones en ausencia o presencia de ADN templado. Además, se recurrió al uso de un kit comercial LAMP Warmstart®, el cuál posee un agente intercalante cuya emisión fluorescente es proporcional a la amplificación ocurrida en la reacción. Esto permite seguir la reacción usando un equipo de PCR a tiempo real y reducir fuertemente cualquier posible error y/o contaminación ligada a la preparación de los reactivos.

Al observar las curvas de fluorescencia obtenidas para cada set (Figura 8), se notan diferencias notorias en la dinámica de cada uno. Por un lado, el set 1 no muestra amplificación en ninguna de las réplicas experimentales, de forma similar a lo ocurrido en las reacciones colorimétricas. Por su parte, el set 2 muestra una clara amplificación independiente de la ausencia o presencia de ADN templado en la reacción. En el caso del set 3, se observa una clara diferencia entre la señal generada por reacciones negativas y positivas en las tres replicas experimentales. Incluso en el caso que existe una amplificación de una reacción negativa de este set, esta es leve y aún permite apreciar una clara diferencia con una señal positiva a los 30-35 minutos de reacción.



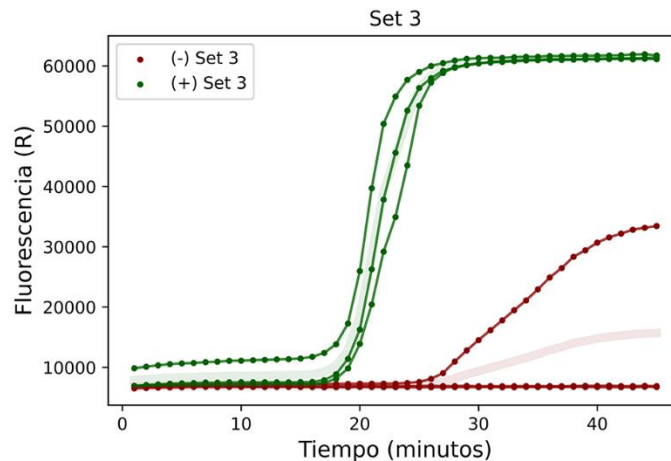


Figura 8: LAMP fluorescente a tiempo real utilizando los sets 1-3 para la detección de la secuencia *six5* de *Fol*. De arriba a abajo, se muestran las curvas de amplificación obtenidas utilizando los sets 1, 2 y 3 en la detección del gen *six5* de *Fol* mediante un LAMP fluorescente a tiempo real, indicando la fluorescencia absoluta en función del tiempo de incubación a 65 °C. (-) indica controles negativos sin ADN templado y (+) reacciones con 20 mil copias del plásmido pL0R-g*six5*. El experimento se realizó en triplicado (n = 3), donde cada curva corresponde al promedio de dos réplicas técnicas del experimento mientras que el promedio de las tres repeticiones en un trazo más ancho y transparente al fondo de cada gráfico.

Los resultados anteriores indican que el set 3 es un buen set candidato para reacciones LAMP que detecten *Fol*, validado experimentalmente mediante un LAMP de *output* fluorescente cuya intensidad fue medida durante el transcurso de la reacción.

A su vez, las diferencias experimentales en cada laboratorio podrían ser atribuibles a una posible contaminación por amplicón. Para evitar esto, todo el material utilizado para la preparación fue limpiado exhaustivamente con etanol 70 % y cloro al 0,5 % antes de realizar cada nuevo ensayo, junto con una esterilización mediante exposición a luz UV por 5-10 minutos y el trabajo en campana de flujo laminar.

Dado los buenos resultados obtenidos en LAMP fluorescente a tiempo real, se decidió seguir trabajando con el set 3 con el objetivo de también poder validarlo experimentalmente en reacciones LAMP colorimétricas, ya que de este modo se podría analizar el resultado de una forma más simple, sin necesidad de equipos especializados y costosos.

Al realizar nuevos testeos de este set (Figura 9), utilizando un nuevo *batch* de *BstLF* polimerasa y reforzando aún más las medidas de esterilidad, se observaron cambios colorimétricos sólo en las reacciones que presentan ADN templado en ellas, sea este pLOR-*gsix5* para las reacciones LAMP-*Fol* o pLOR-35S, en el caso de los controles con *GMO Detective*. Por el contrario, todas las reacciones negativas mantienen su coloración amarilla original, indicando que no ocurrió amplificación. El experimento se realizó en triplicado (n=3) con los mismos resultados para cada ensayo.

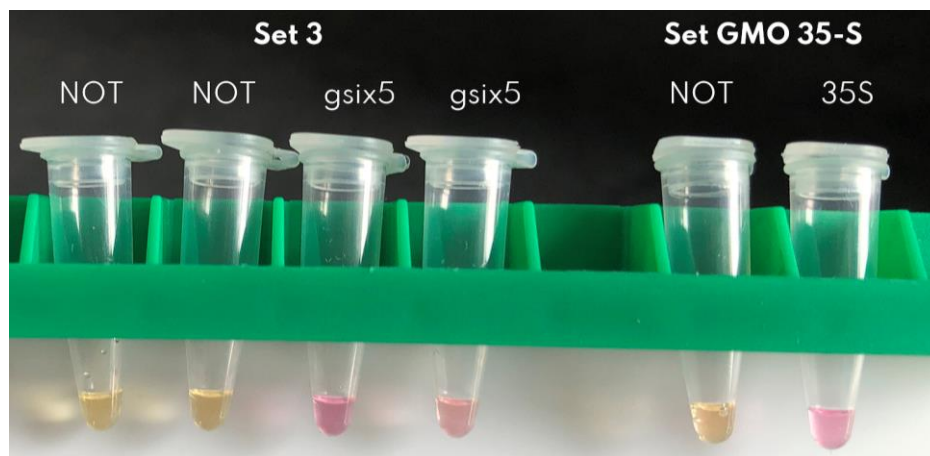


Figura 9: Testeo del set 3 en reacciones LAMP colorimétricas para *Fol*. Resultados colorimétricos de reacciones LAMP caseras utilizando *neutral red*. A la izquierda, reacciones con partidores del set 3 y a la derecha con el set de partidores GMO-35SZ, utilizado en este caso como un control de reacción. NOT indica controles negativos sin templado y 35S o gSIX5 reacciones con 20 mil copias del plásmido pLOR-35S o pLOR-*gsix5*, respectivamente. El experimento se realizó en triplicado (n=3) con los mismos resultados.

En base a lo obtenido, podemos afirmar que el uso del set 3 permite la detección del gen *six5* de *Fol* en reacciones LAMP colorimétricas, preparadas a partir de reactivos caseros y enzimas expresadas de manera local. La validación de este set de partidores cumple con el objetivo de este Seminario de Título al permitir la detección de una secuencia de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* en reacciones LAMP colorimétricas caseras. Los resultados obtenidos refuerzan la necesidad de una cuantificación funcional de cada *batch* preparado de enzimas caseras para determinar su concentración óptima, junto con el requerimiento de rigurosas medidas de cuidado al preparar este tipo de reacciones.

3.5 Liofilización de preparaciones LAMP *GMO Detective* con reactivos caseros

En paralelo a los experimentos anteriores, durante este Seminario se trabajó en el estudio de la factibilidad técnica y la estabilidad a temperatura ambiente de preparaciones LAMP caseras al ser liofilizadas. Para esto, se trabajó con reacciones tipo *GMO Detective* mientras se validaba experimentalmente un set de partidores para la detección de *Fol* mediante reacciones LAMP.

Primero, para comprobar que estas reacciones LAMP *GMO Detective* caseras sirven más allá de reconocer un control positivo sintético (Figura S9 Anexo), se realizaron reacciones a partir de muestras diluidas (sin procesamiento de extracción de ADN) de diferentes alimentos presentes en un supermercado (Tabla S4 Anexo). La mayoría de estos son derivados de la soya, un cultivo cuyas semillas suelen haber sido modificadas genéticamente (Sánchez, 2020). Al analizar los resultados (Figura 10), se aprecia que tanto la muestra de choclo como la de hamburguesa de soya presentan una señal positiva, indicando la detección del promotor 35S en ambos alimentos y la capacidad de estas reacciones LAMP caseras de funcionar con distintas fuentes de ADN.

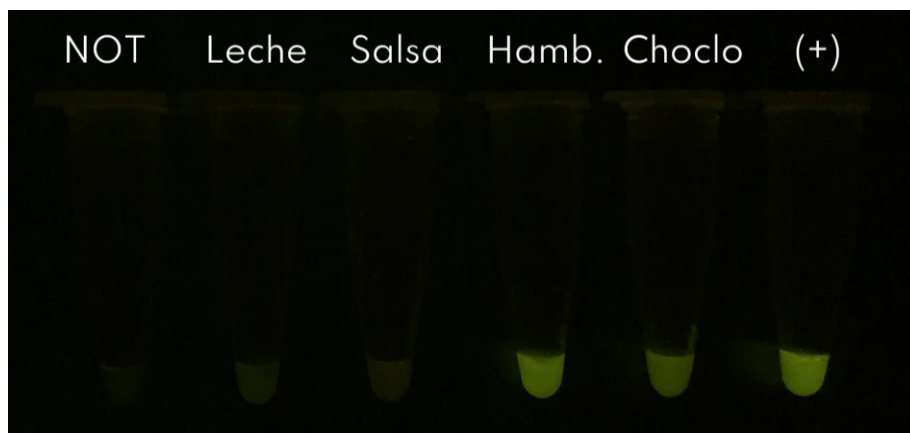


Figura 10: Reacciones *GMO Detective* caseras con ADN extraído de alimentos. Resultados de fluorescencia obtenidos al llevar a cabo reacciones LAMP-QUASR con ADN proveniente de alimentos. De izquierda a derecha, se aprecia un control negativo y reacciones con leche, salsa o hamburguesa de soya, choclo en granos y un control positivo con 20 mil copias del plásmido pL0R-35S.

Considerando que los *kits* comerciales de LAMP deben viajar grandes distancias y no siempre se poseen los implementos necesarios para mantener la cadena de frío de los reactivos, es importante analizar si preparaciones de estas reacciones pueden ser liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente sin perder su efectividad.

Para esto, se preparó un *master mix* o mezcla a liofilizar, que incluyó nucleótidos (dNTPs), partidores LAMP-QUASR *GMO Detective* (35S-Z), la polimerasa *BstLF* casera (en este caso sin glicerol, ya que está descrito que este compuesto interfiere con la liofilización (Xu y col., 2020)) y trehalosa como agente crio-preservante (Leung y col., 2019). Además, siguiendo lo planteado por diversos autores, tanto el $MgSO_4$ como el *buffer* isotermal se dejaron fuera de la mezcla a liofilizar (Aidelberg y col., 2021; García-Bernalt Diego y col., 2019; Leung y col., 2019; Priye y col., 2017). Más detalles del protocolo de liofilización se presentan en la sección de Materiales y Métodos.

Las muestras fueron guardadas a temperatura ambiente y rehidratadas a los 7 o 14 días tras la liofilización. Las bolsas con vacío fueron abiertas, y los tubos en su interior fueron rehidratados en una dilución con *buffer* isotermal y $MgSO_4$, junto con la adición de 20 mil copias de pL0R-35S en el caso de reacciones positivas. A su vez, los controles negativos corresponden a controles sin templado (NOT). En la Tabla II se presenta un resumen cualitativo de los resultados de fluorescencia obtenidos.

Tabla II: Resumen de resultados al rehidratar preparaciones LAMP *GMO Detective* previamente liofilizadas. Resumen cualitativo de la fluorescencia observada al rehidratar preparaciones LAMP liofilizadas hace 7 o 14 días. (-) indica ausencia de fluorescencia, mientras que (+) una baja, (++) media y (+++) alta intensidad de fluorescencia. NOT indica controles negativos sin templado y 35S a la presencia de 20 mil copias de pLOR-35S. Cada fila corresponde a un experimento distinto de liofilización, con dos replicas técnicas cada uno. Fotografías de cada experimento se presentan en la Figura S11 del Anexo.

| | 7 días | | | | | 14 días | | | |
|-----|--------|-----|-----|-----|--|---------|-----|-----|-----|
| | NOT | NOT | 35S | 35S | | NOT | NOT | 35S | 35S |
| N=1 | | - | +++ | +++ | | - | - | +++ | +++ |
| N=2 | - | - | + | +++ | | - | - | +++ | +++ |
| N=3 | - | - | +++ | +++ | | - | - | ++ | +++ |
| N=4 | - | - | +++ | +++ | | - | - | ++ | +++ |

En general, se observa una gran similitud a lo obtenido en reacciones frescas, con una clara diferencia entre negativos y positivos. Además, se aprecia que la alta intensidad de la señal fluorescente positiva se conserva en el 88% de las reacciones rehidratadas a los 7 días y el 75% de las rehidratadas a los 14 días, observando algún tipo de intensidad fluorescente (entre baja y alta) que permite discriminar reacciones positivas de negativas en el 100% de los casos. Por tanto, se afirma que es posible realizar reacciones LAMP-QUASR del tipo *GMO Detective* utilizando reactivos y enzimas de producción casera, las que además pueden ser liofilizadas hasta por 14 días a temperatura ambiente sin perder eficiencia de detección.

Con el fin de ensayar las reacciones liofilizadas durante un mayor periodo de tiempo, se prepararon mezclas de reacción que fueron almacenadas a temperatura ambiente y a 4°C por alrededor de dos meses durante el verano 2021-2022 (Figura 11A). Además, se intentó simplificar el *buffer* de rehidratación preparando y liofilizando preparaciones que incluían *buffer* isotermal y MgSO₄ (Figura 11B). Éstos, también fueron almacenados a temperatura ambiente o a 4°C durante el mismo rango temporal.

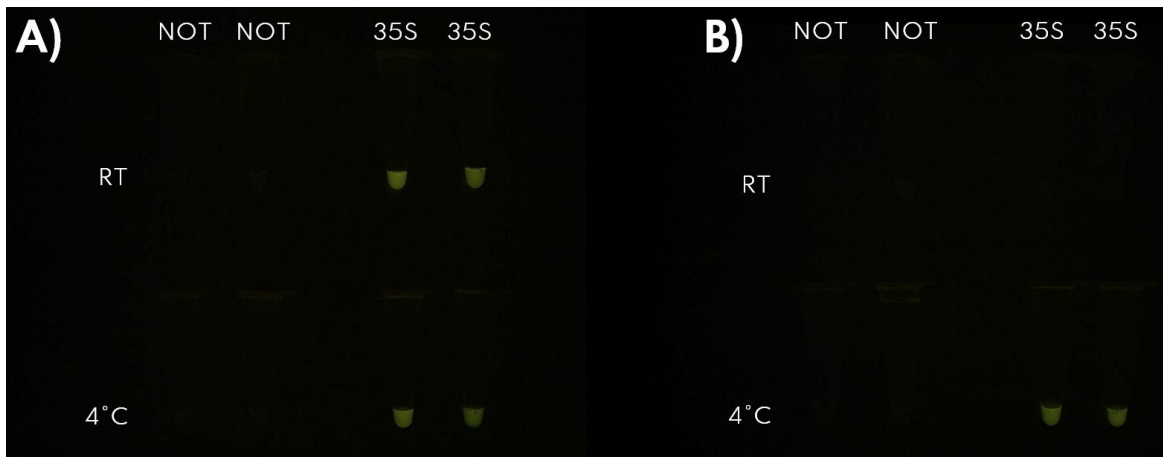


Figura 11: Reacciones *GMO Detective* liofilizadas y almacenadas durante dos meses. Resultados de fluorescencia al liofilizar reacciones LAMP-QUASR y almacenarlas por dos meses previo a su rehidratación. **A)** indica reacciones donde se liofilizó dNTPs, *BstLF*, partidores y trehalosa, y se rehidrató con $MgSO_4$ y *buffer* isothermal, mientras que en **B)** todos los componentes forman parte del mix liofilizado y la rehidratación se realiza sólo con agua. Para ambos casos, las reacciones liofilizadas se almacenaron a temperatura ambiente (RT) o a **4°C**, según se indica en cada caso. NOT indica controles negativos sin templado y 35S la presencia de 20 mil copias de pL0R-35S. Cada reacción presenta dos réplicas técnicas.

Al observar los resultados obtenidos se concluye que el método de liofilización sin *buffer* ni magnesio (Figura 11A) permite obtener una señal positiva incluso dos meses después de la fecha de liofilización, independiente de si los tubos se almacenaron a temperatura ambiente o a 4 °C. Por otro lado, si se decide incluir el *buffer* y el magnesio en la liofilización (Figura 11B), sólo es posible obtener una señal positiva después de dos meses si es que los tubos liofilizados son almacenados a 4 °C.

La alta estabilidad de las reacciones caseras liofilizadas a temperatura ambiente facilitarían su uso para aplicaciones en terreno y cumple con el tercer objetivo planteado para este Seminario de Título. Por temas de tiempo, en el plazo de este Seminario de Título no se alcanzó a lograr determinar la factibilidad de las preparaciones LAMP caseras y liofilizadas para la detección de una secuencia específica de *Fol*. Sin embargo, los resultados presentados en esta sección son un avance hacia una detección de este hongo patógeno en terreno con menor dependencia de una cadena de frío.

DISCUSIÓN

4.1 Diseño de un control positivo para *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

Una de las enfermedades de mayor impacto al cultivo de tomate es la marchitez causada por el hongo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (*Fol*). A la fecha, su prolongada persistencia en suelos junto con la ausencia de un método de control efectivo y seguro contra el hongo hacen de su detección temprana una prioridad para la agricultura (Srinivas y col., 2019). Una correcta detección molecular requiere la identificación de secuencias o genes de *Fol* específicos a su interacción con la planta de tomate, como los factores de virulencia codificados en los genes *six* (Lievens y col., 2009).

En específico, los genes *six2* y *six5* parecen ser buenas opciones para una detección que sea, en primera instancia, aplicable a cualquiera de las razas de *Fol*. Los análisis bioinformáticos realizados nos llevaron a escoger como secuencia candidata al gen *six5* sobre *six2*, debido al alto grado de conservación que presenta este último en otras especies del mismo género *Fusarium*. Se realizó un alineamiento de las secuencias de *six5* presentes exclusivamente en *Fol*, utilizando datos que explicitaran que correspondían a esta *forma specialis*. Si bien los estrictos requerimientos establecidos pudieron llevar a la omisión de secuencias relevantes, la falta de información en sus descripciones no permitía afirmar con certeza su especificidad hongo-hospedero.

El alineamiento realizado mostró un alto grado de conservación del gen *six5* entre las distintas secuencias (Figura S5 Anexo), lo que permitió que parte de la secuencia consenso de este alineamiento fuera posteriormente insertada, mediante un plásmido, en bacterias competentes que permitieran contar con un control positivo para la detección molecular de cualquiera de las tres razas de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

Este control es útil tanto para LAMP como para otras reacciones de biología molecular, cumpliendo así uno de los objetivos planteados para este Seminario.

4.2 Detección de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* con reacciones LAMP

Una vez obtenido el control positivo se procedió a su uso en la detección de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Fol)* mediante reacciones LAMP, las cuales al llevarse a cabo de manera isotermal sin la necesidad de un termociclador se presentan como una atractiva herramienta molecular para una detección rápida, fácil de visualizar y específica de esta subespecie de *F. oxysporum* adaptada especialmente para infectar al tomate.

Al revisar la literatura existente, vemos que existe una reacción LAMP previamente descrita para *Fol* basada en la detección de la región 28S ARNr del hongo (Almasi y col., 2015). Sin embargo, la especificidad de la reacción se determina comparando con otras muestras del género *Fusarium* que no pertenecen a la especie *oxysporum*, por lo que no se puede descartar que entregue falsos positivos con otras *formas specialis* de *F. oxysporum*. Además, al realizar un BLAST de la secuencia 28S utilizada (Figura S12 Anexo), se observan coincidencias sobre 98,6% de identidad para diversas *formas specialis* e incluso otras especies del género, como *F. languescens* y *F. curvatum*.

Por otro lado, se encontró otro artículo que describe la detección del gen *six5* de *Fol* mediante reacciones LAMP preparadas con kits comerciales (Ayukawa y col., 2016). Dado que la idea, en un principio, era enfocarnos en la liofilización de reacciones LAMP caseras que detecten *Fol*, se decidió trabajar a partir del set de partidores descrito por estos autores, pero con modificaciones para ser utilizado con la técnica QUASR de forma que la detección fuese secuencia-específica.

Las recomendaciones de Ball y col. (2016) nos llevaron finalmente a la elección del partidador FIP, siendo modificado con un fluoróforo en su extremo 5' y añadiendo una sonda de *quencheo* complementaria a su secuencia. Sin embargo, al realizar los primeros ensayos con este set de partidores (Set Ayukawa-Q) se observaron señales fluorescentes tanto en tubos positivos como negativos (Figura 5), lo que no pudo corregirse al cambiar la concentración del fluoróforo ni con otras técnicas de visualización, descartando a los fenómenos fluorescentes como los causantes de este fallo. Considerando lo anterior, se cree que existen posibles interacciones entre los mismos partidores del set y que son estas las que dan origen a una amplificación en ausencia de templado. En base a esto, se decidió diseñar nuevos sets de partidores LAMP para la detección del gen *six5* de *Fol*.

El diseño de partidores LAMP suele ser una especie de “caja negra”, ya que la mayoría de la literatura existente se remite a mencionar que los partidores fueron diseñados utilizando *software* especializado, sin mencionar los parámetros o criterios utilizados para escoger un set sobre otro. Estos aspectos son de vital importancia, considerando que un buen diseño *in-silico* no necesariamente se traduce en buenos resultados experimentales (Suleman y col., 2016) y que muchas veces es necesario rediseñar nuevos conjuntos de partidores y evaluar experimentalmente más de un set de partidores (García-Bernalt Diego y col., 2021; Peltzer y col., 2021; Zhang & Tanner, 2022).

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo se basó lo más posible en recomendaciones descritas en la literatura para el diseño de partidores LAMP, siguiendo rigurosos criterios para obtener conjuntos con mejores parámetros que los presentes en el set previamente descrito en la literatura. De esta manera, se llegó a la obtención de 3 sets candidatos de partidores a ser evaluados experimentalmente para la detección LAMP de *Fol*.

Al poner a prueba estos sets en reacciones LAMP colorimétricas, se observaron diferencias entre los resultados al sets y, en algunos casos, la presencia de amplificaciones inespecíficas en ausencia de ADN templado (Figura 7). Dada esta variabilidad, se planteó la hipótesis de una posible contaminación por amplicón, por lo que se volvió a evaluar cada uno de estos sets en otro laboratorio, mediante un LAMP fluorescente a tiempo real preparado con un *kit* comercial.

Cabe mencionar, que ante la posible existencia de una contaminación por amplicón en el laboratorio, se procedió a reforzar las medidas de aseo para esta nueva tanda de experimentos, incluyendo la limpieza exhaustiva de la zona de trabajo con etanol y cloro; el uso de campana de flujo laminar: micropipetas específicas; uso de puntas con filtro; y la separación de las áreas de preparación de reactivos, cargado de las reacciones y análisis de los productos. Todas estas medidas han sido sugeridas por varios autores (Aidelberg y col., 2021; Tomita y col., 2008; Wong y col., 2018).

Mediante las curvas obtenidas del LAMP a tiempo real (Figura 8), fue posible descartar completamente al set 1, al presentar una total ausencia de amplificación; y al set 2, debido a que genera una amplificación inespecífica que hace indistinguibles las reacciones positivas de los controles negativos sin ADN. Estas amplificaciones del set 2 podrían ser causa, por ejemplo, debido a que las secuencias forman estructuras secundarias muy estables que amplifican o el stock de partidores utilizado (del cual se hacen diluciones de uso para las reacciones) está contaminado. En cambio, la clara diferencia entre reacciones negativas y positivas que utilizan el set 3, sugiere a este set como un conjunto de partidores válido para la detección experimental de *FoI* mediante reacciones LAMP, lo que fue posteriormente comprobado en reacciones LAMP

colorimétricas utilizando enzimas caseras y reactivos preparados localmente (Figura 9). De esta manera, se cumple el segundo objetivo planteado para este Seminario.

Adicionalmente, es relevante enfatizar que en los experimentos colorimétricos realizados únicamente con el *set 3* (Figura 9) se utilizó un nuevo *batch* de producción de polimerasa *BstLF*. Si bien esta enzima fue expresada y purificada siguiendo el mismo protocolo que el *batch* anterior (Rivera y col., 2020), la variabilidad intrínseca del proceso de expresión y purificación pudo haber llevado a que actividad específica de la enzima *BstLF* producida en cada *batch* sea distinta (Scott y col., 2012). Debido a que estos experimentos forman parte de los primeros ensayos con enzimas locales, aún no se cuenta con un método de cuantificación de las unidades enzimáticas que presenta la *BstLF* expresada en el laboratorio. Esto puede llevar a que, si bien se utiliza una misma concentración de enzima, existan *batches* con una actividad mayor a la deseada, lo que, por ejemplo, puede llevar a la amplificación no deseada de pequeñas contaminaciones de ADN en la reacción LAMP.

Debido a que comercialmente las enzimas se estandarizan y venden en términos de unidades de enzima por volumen (U/mL) (*New England Biolabs*), existe la propuesta en el Laboratorio de Tecnologías Libres de generar sistemas de cuantificación de actividad enzimática para reacciones moleculares sobre las cuales esto exista una estandarización conocida, como ocurre con la *BstLF*. De esta manera, se espera pasar de unidades de masa por unidad de volumen a una estandarización a unidades de enzima por unidad de volumen.

Con un *set* de partidores ya validado para la detección isotermal del gen *six5* de *Fol*, se espera, en el futuro, poder evaluar este *set* con muestras obtenidas tanto de cultivos del

hongo como desde ADN extraído de suelos contaminados. En este contexto, se debe señalar que el Laboratorio de Tecnologías Libres se encuentra en colaboración activa con un grupo de trabajo en Nigeria, país donde *Fol* presenta una gran amenaza al rendimiento de los cultivos de tomate y donde muchas veces la detección oportuna del patógeno es difícil (Bawa, 2016; Akaeze & Aduramigba-Modupe, 2017).

A la fecha, se está trabajando en el envío de reactivos y partidores LAMP a Kafilat Adedeji en África, con el objetivo que puedan ser validados experimentalmente con muestras de suelo y a través de reacciones LAMP llevadas a cabo utilizando dispositivos de bajo costo con elementos impresos en 3D, los cuales no requieren de electricidad para llevar a cabo la reacción (Velders y col., 2022). De validarse su efectividad, el trabajo aquí presente podría contribuir a solucionar un problema real que afecta a varias comunidades agrícolas en el planeta.

4.3 Hacia una detección molecular accesible en terreno

La pandemia del COVID-19 ha puesto en evidencia la fragilidad de las redes logísticas de producción y suministro de herramientas de diagnóstico, agravadas por las barreras de acceso, la dificultad de transporte de reactivos en cadena de frío y los limitados recursos para muchos países del hemisferio sur (Ravindran, 2020). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de una vigilancia más eficaz, económica y ubicua de distintos agentes patógenos (Pardee y col., 2016; Paules y col., 2017; Velders y col., 2022) mediante soluciones que puedan desarrollarse e implementarse de manera local.

Para esto, el desarrollo de sistemas de detección utilizando enzimas libres, junto con la preparación de *buffers* y reactivos caseros es vital para lograr resolver a tiempo la falta de monitoreo de posibles enfermedades que afectan a estos lugares.

Por otro lado, para combatir el problema de la cadena de frío, una de las estrategias más exitosas consiste en la liofilización de reacciones moleculares, una técnica de secado en frío que permite un almacenamiento estable a mayores temperaturas sin que se pierda la integridad o actividad de la muestra (Hammerling y col., 2021). En el presente Seminario de Título, se trabajó con la aplicación de esta técnica a reacciones LAMP caseras que detectan el promotor 35S, dado que son reacciones robustas (Aidelberg & Rios, n.d.), que ya han sido puestas a prueba varias veces en el Laboratorio de Tecnologías Libres y en varios pasos prácticos con estudiantes de pregrado.

En base a los resultados obtenidos, vemos que es posible preparar reacciones LAMP caseras capaces de ser liofilizadas y ser almacenadas de manera estable hasta por dos meses a temperatura ambiente o a 4°C (Figura 11). Estas reacciones son capaces de detectar la presencia del promotor 35S tanto desde ADN plasmidial como desde muestras reales de alimentos (Figura 10), lo que permite su uso local en el marco del proyecto educativo y divulgativo *GMO Detective* (<https://gmodetective.com>).

A nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe el uso de reactivos caseros y enzimas expresadas y purificadas de manera local para la detección LAMP del promotor 35S, utilizando protocolos abiertos (Matute y col., 2021) que permiten una fácil implementación y reproducción de estos resultados en otros laboratorios.

A la fecha, existe un número limitado de artículos que describen el uso de la liofilización en reacciones isotermas LAMP (Carter y col., 2017; Yaren y col., 2017; Aidelberg y col., 2021; Kumar y col., 2021), y dentro de ellos, pocos detallan las condiciones de temperatura y vacío utilizadas en sus experimentos. Si bien hay elementos comunes, como el trabajo con enzimas libres de glicerol (o dializadas) para evitar la retención de

humedad en el tubo que realiza esta molécula higroscópica (Xu y col., 2020), muchas veces no existe un consenso respecto a la temperatura de almacenamiento de las reacciones liofilizadas o sobre qué componentes son liofilizados y cuáles son añadidos sólo cuando la reacción es rehidratada (Carter y col., 2017; Aidelberg y col., 2021; García-Bernalt Diego y col., 2021).

A partir de los resultados presentados (Figura 11), se sugiere que la mayor estabilidad a temperatura ambiente de estas preparaciones LAMP liofilizadas se obtiene cuando el *buffer* isotermal y el $MgSO_4$ forman parte de la mezcla de rehidratación, en vez de formar parte de la mezcla liofilizada. Cuando estos dos componentes se añaden al *master mix* liofilizado (rehidratando sólo con agua y ADN), estas preparaciones conservan su actividad a los dos meses sólo si son almacenadas a 4°C, lo que sugiere un posible desequilibrio iónico causado por la adición del *buffer* a la preparación. Lo anterior se debe tener en consideración para un futuro transporte y uso en terreno de este tipo de preparaciones. A futuro, se recomienda una futura evaluación de la estabilidad de estas reacciones a mayores tiempos y/o diferentes temperaturas de almacenamiento.

Si bien no fue posible durante la duración de este Seminario de Título evaluar la liofilización de reacciones LAMP que detecten *Fol*, a partir de los resultados obtenidos para *GMO Detective* se espera que también sea posible la liofilización de reacciones LAMP caseras que detecten otras secuencias, como el gen *six5* de *Fol. Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Junto con cumplir el tercer objetivo específico, el uso conjunto de componentes caseros y liofilizados en reacciones LAMP amplía el potencial y aplicabilidad de este tipo de herramientas moleculares en terreno.

4.4 Ciencia abierta como una herramienta para el desarrollo sostenible

Gracias a la ciencia, la tecnología y la innovación (CTI) es posible encontrar soluciones a problemas complejos que mejoren el bienestar humano y fomenten el desarrollo social y económico de manera sostenible (UNESCO, 2021). Sin embargo, para ser capaces de implementar estas soluciones y avanzar hacia el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) propuestos por Naciones Unidas, es necesario un trabajo colaborativo e interdisciplinario mediante prácticas de ciencia abierta que no se vean limitadas por barreras de acceso al conocimiento (Zhaohui, 2021).

La ciencia abierta se basa en principios de transparencia, reproducibilidad, participación y equidad (UNESCO, 2021; Zhaohui, 2021), promoviendo un trabajo científico riguroso y crítico de forma que los resultados puedan ser replicados por distintas personas o comunidades, a través de colaboraciones que permitan un libre acceso, contribución y beneficio del conocimiento científico. Es una herramienta que permite expandir los límites del conocimiento a partir de datos e ideas previamente existentes y accesibles sin barreras de propiedad intelectual.

En un sistema de innovación cada vez menos eficiente y productivo, el uso de herramientas de ciencia abierta puede ser una contribución, y no un impedimento como se suele pensar, al desarrollo económico de una región (Gold, 2021). Dado que la innovación depende del conocimiento existente, el acceso restringido o incompleto sólo lleva a una fragmentación del progreso científico y un freno a las posibles soluciones que este pueda entregar. La creación de nuevo conocimiento científico incrementa la complejidad económica de una región (Laverde-Rojas & Correa, 2019), promoviendo la combinación de estas nuevas habilidades hacia el desarrollo de nuevas tecnologías y una diversificación de la matriz productiva (Hidalgo & Hausmann, 2009).

Para el Sur Global, los principios de ciencia abierta y la generación de repositorios distribuidos se muestran como un camino para avanzar hacia infraestructuras científicas y tecnológicas más resilientes (Zhaohui, 2021; Marx, 2022). En base a estos desafíos, se espera que el presente trabajo contribuya al empoderamiento tecnológico que implica el desarrollo e implementación local de herramientas de diagnóstico *in situ* (ODS 9), con especial énfasis en su uso para alcanzar la seguridad alimentaria (ODS 2).

Esperamos que, a futuro, más grupos de trabajo adopten modelos de trabajo colaborativo y distribuido (ODS 17) con miras a la resolución de problemas de escala local, fortaleciendo la capacidad de respuesta de la región frente a las amenazas de nuevas pandemias y desastres climáticos.

CONCLUSIONES

- El gen *six5* es un factor de virulencia de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (*Fol*), cuya especificidad y alto grado de conservación lo presentan como una prometedora secuencia para la detección molecular de este hongo.
- En el presente Seminario de Título, se validó experimentalmente al *set 3* como un conjunto de partidores que permite la detección de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante reacciones LAMP preparadas con reactivos caseros, siendo capaces de detectar un control positivo diseñado contra el gen *six5* del hongo.
- Preparaciones de reacciones isotermas caseras pueden ser liofilizadas y almacenadas hasta dos meses a temperatura ambiente de manera estable sin pérdida de actividad, lo que fue comprobado para reacciones LAMP que detectan la presencia del promotor 35S. Lo anterior es un significativo avance hacia una implementación accesible en terreno de este tipo de reacciones.
- Futuros estudios que evalúen la detección específica de *Fol* mediante preparaciones LAMP caseras liofilizadas y/o reacciones que utilicen muestras reales del hongo permitirán validar los resultados aquí descritos para un futuro uso en terreno contra este patógeno.
- Para esto, es vital continuar con el trabajo colaborativo e interdisciplinario mediante repositorios abiertos que ayuden a resolver problemas a escala local.

BIBLIOGRAFÍA

- Aidelberg, G., Aronoff, R., Eliseeva, T., Quero, F. J., Vielfaure, H., Codyre, M., Hadasch, K., & Lindner, A. B. (2021). Corona Detective: a simple, scalable, and robust SARS-CoV-2 detection method based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Biomolecular Techniques*, 32(3), 89–97. <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-003>
- Aidelberg, G., & Rios, N. (n.d.). *GMO Detective Workshop Protocol*. <https://gmodetective.com/wp-content/uploads/2018/06/Workshop-Protocol-2pages-Google-Docs.pdf>
- Akazeze, O. O., & Aduramigba-Modupe, A. O. (2017). Fusarium wilt disease of tomato: Screening for resistance and in-vitro evaluation of botanicals for control; the Nigeria case. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(1), 32–36. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.1.32-36>
- Alcántara, R., Peñaranda, K., Mendoza-Rojas, G., Nakamoto, J. A., Martins-Luna, J., del Valle-Mendoza, J., Adai, V., & Milón, P. (2021). Unlocking SARS-CoV-2 detection in low- and middle-income countries. *Cell Reports Methods*, 1(7). <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100093>
- Alekseenko, A., Barrett, D., Pareja-Sanchez, Y., Howard, R. J., Strandback, E., Ampah-Korsah, H., Rovšnik, U., Zuniga-Veliz, S., Klenov, A., Malloo, J., Ye, S., Liu, X., Reinius, B., Elsässer, S. J., Nyman, T., Sandh, G., Yin, X., & Pelechano, V. (2021). Direct detection of SARS-CoV-2 using non-commercial RT-LAMP reagents on heat-inactivated samples. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80352-8>
- Arce, A., Guzman Chavez, F., Gandini, C., Puig, J., Matute, T., Haseloff, J., Dalchau, N., Molloy, J., Pardee, K., & Federici, F. (2021). Decentralizing Cell-Free RNA Sensing With the Use of Low-Cost Cell Extracts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.727584>
- Ayukawa, Y., Komatsu, K., Kashiwa, T., Akai, K., Yamada, M., Teraoka, T., & Arie, T. (2016). Detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 using loop-mediated isothermal amplification with three primer sets. *Letters in Applied Microbiology*, 63(3), 202–209. <https://doi.org/10.1111/lam.12597>
- Ball, C. S., Light, Y. K., Koh, C. Y., Wheeler, S. S., Coffey, L. L., & Meagher, R. J. (2016). Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses. *Analytical Chemistry*, 88(7), 3562–3568. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04054>
- Balogun, O. (2007). Comparison of *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* races 1, 2 and 3, and f.sp *radicis lycopersici* based on the sequences of fragments of the ribosomal DNA intergenic spacer region. *Biokemistri*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.4314/biokem.v19i1.56416>
- Bawa, I. (2016). MANAGEMENT STRATEGIES OF FUSARIUM WILT DISEASE OF TOMATO INCITED BY *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.): A REVIEW. *International Journal of Advanced Academic Research | Sciences Technology & Engineering*, 2(5), 2488–9849.
- Bektaş, A., Covington, M. F., Aidelberg, G., Arce, A., Matute, T., Núñez, I., Walsh, J., Boutboul, D., Delaugerre, C., Lindner, A. B., Federici, F., & Jayaprakash, A. D. (2021). Accessible LAMP-enabled rapid test (Alert) for detecting sars-cov-2. *Viruses*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/v13050742>

- Bhadra, S., Nguyen, V., Torres, J. A., Kar, S., Fadanka, S., Gandini, C., Akligoh, H., Paik, I., Maranhao, A. C., Molloy, J., & Ellington, A. D. (2021). Producing molecular biology reagents without purification. *PLoS ONE*, *16*(6 June), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252507>
- CABI. (2022). *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fusarium wilt of tomato). CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24660>
- Carter, C., Akrami, K., Hall, D., Smith, D., & Aronoff-Spencer, E. (2017). Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA. *Journal of Virological Methods*, *244*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.013>
- Cerda, A., Rivera, M., Armijo, G., Ibarra-Henriquez, C., Reyes, J., Blázquez-Sánchez, P., Avilés, J., Arce, A., Seguel, A., Brown, A. J., Vásquez, Y., Martín, M. C.-S., Cubillos, F., García, P., Ferres, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Federici, F., & Gutiérrez, R. A. (2021). A One-Step open RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.29.21267000>
- de Lamo, F. J., & Takken, F. L. W. (2020). Biocontrol by *Fusarium oxysporum* Using Endophyte-Mediated Resistance. *Frontiers in Plant Science*, *11*(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037>
- Eiken Genome Site. (2005). *The principle of LAMP method*. Eiken Chemical Co. Ltd. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>
- Fang, X. E., Li, J., & Chen, Q. (2008). One new method of nucleic acid amplification - Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virologica Sinica*, *23*(3), 167–172. <https://doi.org/10.1007/s12250-008-2929-8>
- Flaño, A. (2013). *Situación del tomate para consumo fresco*. https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/08/11729_ArtTomateFresco2013.pdf
- García-Bernalt Diego, J., Fernández-Soto, P., Crego-Vicente, B., Alonso-Castrillejo, S., Febrer-Sendra, B., Gómez-Sánchez, A., Vicente, B., López-Abán, J., & Muro, A. (2019). Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51342-2>
- García-Bernalt Diego, J., Fernández-Soto, P., Domínguez-Gil, M., Belhassen-García, M., Bellido, J. L. M., & Muro, A. (2021). A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics*, *11*(3), 438. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030438>
- Garneret, P., Coz, E., Martin, E., Manuguerra, J. C., Brient-Litzler, E., Enouf, V., González Obando, D. F., Olivo-Marin, J. C., Monti, F., van der Werf, S., Vanhomwegen, J., & Tabeling, P. (2021). Performing point-of-care molecular testing for SARS-CoV-2 with RNA extraction and isothermal amplification. *PLoS ONE*, *16*(1 January), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243712>
- Gold, E. R. (2021). The fall of the innovation empire and its possible rise through open science. *Research Policy*, *50*(5), 104226. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2021.104226>
- Hammerling, M. J., Warfel, K. F., & Jewett, M. C. (2021). Lyophilization of premixed COVID-19 diagnostic RT-qPCR reactions enables stable long-term storage at elevated temperature. *Biotechnology Journal*, *16*(7), 1–19. <https://doi.org/10.1002/biot.202000572>
- Herrera Cid, R. (2017). *Estudio Etiológico De Fusarium Oxysporum En Tomate En La Zona Central De Chile* [Universidad de Chile].

- <http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/209736/Tesis RHerrera C.pdf>
- Hidalgo, C. A., & Hausmann, R. (2009). The building blocks of economic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26), 10570–10575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900943106>
- Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., & Kapoor, R. (2021). Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 12(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628611>
- Kellner, M. J., Ross, J. J., Schnabl, J., Dekens, M. P. S. S., Heinen, R., Grishkovskaya, I., Bauer, B., Stadlmann, J., Menendez-Arias, L., Fritsche-Polanz, R., Traugott, M., Seitz, T., Zoufaly, A., Foedinger, M., Wenisch, C., Zuber, J., (VCDI), V. C.-19 D. I., Pauli, A., & Brennecke, J. (2021). A rapid, highly sensitive and open-access SARS-CoV-2 detection assay for laboratory and home testing. *BioRxiv*, 2020.06.23.166397.
- Kumar, S., Sharma, S., Bhardwaj, N., Pande, V., Savargaonkar, D., & Anvikar, A. R. (2021). Advanced Lyophilised Loop Mediated Isothermal Amplification (L-LAMP) based point of care technique for the detection of dengue virus. *Journal of Virological Methods*, 293, 114168. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114168>
- Laverde-Rojas, H., & Correa, J. C. (2019). Can scientific productivity impact the economic complexity of countries? *Scientometrics*, 120(1), 267–282. <https://doi.org/10.1007/s11192-019-03118-8>
- Leung, V., Brooks, M., Emerson, S., Ali, M., & Filipe, C. D. M. (2019). Ready-to-use thermally stable mastermix pills for molecular biology applications. *Biotechnology Progress*, 35(2), 1–8. <https://doi.org/10.1002/btpr.2764>
- Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiology Letters*, 300(2), 201–215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x>
- Lievens, B., Rep, M., & Thomma, B. P. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*, 64(8), 781–788. <https://doi.org/10.1002/ps.1564>
- Maas, S. (1999). Efficient and rapid procedure for blue-white screening of recombinant bacterial clones. *BioTechniques*, 27(6), 1126–1128. <https://doi.org/10.2144/99276bm08>
- Marx, V. (2022). Lessons from the Global South's fight against COVID-19. *Nature Methods*, 19(April), 403–407. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01439-w>
- Matute, T., Núñez, I., & Federici, F. (2021). Low Cost LAMP and RT-LAMP. *Protocols.io*.
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78–92. doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021
- Muñoz, M. (2021). *Tomate: una especie de exportación*. <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71089/ArtTomate202109.pdf>
- Murphy, J., & Bustin, S. A. (2009). Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: Gold standard or substandard? *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9(2), 187–197. <https://doi.org/10.1586/14737159.9.2.187>
- New England Biolabs. Isothermal Amplification & Strand Displacement. Neb.com. Retrieved 27 April 2022, from <https://www.neb.com/products/pcr-qpcr-and-amplification-technologies/isothermal-amplification-and-strand-displacement/isothermal-amplification-and-strand-displacement>.
- Nireesha, G., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjana Babu, M., & Lavakumar,

- V. (2013). Lyophilization/Freeze Drying -An Review. *Ijntps*, 3(4), 87–98.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., Clement Tsui, K. M., Srinivas, C., Niranjana, S. R., & Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep21367>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.
- Panno, S., Matić, S., Tiberini, A., Caruso, A. G., Bella, P., Torta, L., Stassi, R., & Davino, S. (2020). Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants*, 9(4), 1–28. <https://doi.org/10.3390/plants9040461>
- Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059>
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6), 407–421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Paules, C. I., Eisinger, R. W., Marston, H. D., & Fauci, A. S. (2017). What recent history has taught us about responding to emerging infectious disease threats. *Annals of Internal Medicine*, 167(11), 805–811. <https://doi.org/10.7326/M17-2496>
- Peltzer, D., Tobler, K., Fraefel, C., Maley, M., & Bachofen, C. (2021). Rapid and simple colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Bovine alphaherpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 289(December 2020), 114041. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114041>
- Pollak, B. (2019a). Loop and uLoop assembly. *Protocols.io*.
- Pollak, B. (2019b). pL0R-LacZ. *Protocols.io*.
- Pollak, B., Matute, T., Nuñez, I., Cerda, A., Lopez, C., Vargas, V., Kan, A., Bielinski, V., von Dassow, P., Dupont, C. L., & Federici, F. (2020). Universal loop assembly: Open, efficient and cross-kingdom DNA fabrication. *Synthetic Biology*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysaa001>
- Poole, C. B., Li, Z., Alhassan, A., Guelig, D., Diesburg, S., Tanner, N. A., Zhang, Y., Evans, T. C., LaBarre, P., Wanji, S., Burton, R. A., & Carlow, C. K. S. (2017). Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using noninstrumented Nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169011>
- Priye, A., Bird, S. W., Light, Y. K., Ball, C. S., Negrete, O. A., & Meagher, R. J. (2017). A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Scientific Reports*, 7(March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep44778>
- Ravindran, S. (2020). How DIY technologies are democratizing science. *Nature*, 587(7834), 509–511. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-03193-5>
- Rice, P., Longden, L., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- Rivera, M., Cazaux, S., Cerda, A., Medina, A. A., Nuñez, I., Matute, T., Brown, A.,

- Gasulla, J., Federici, F., & Ramirez-Sarmiento, C. A. (2020). Recombinant protein expression and purification of codon-optimized Bst-LF polymerase. *Protocols.io*.
- Rockweiler, T. (2018). *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Primer Design and Assay Optimization* [Webinar]. Lucigen. <https://lucigen.com/docs/slide-decks/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification-Design-Primers-Webinar-March-2018.pdf>
- Sánchez, M. A. (2020). Chile as a key enabler country for global plant breeding, agricultural innovation, and biotechnology. *GM Crops and Food*, 11(3), 130–139. <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1761757>
- Scientific, T. F. (2017). *Multiple Primer Analyzer*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>
- Scott, J. E., Ph, D., Williams, K. P., & Ph, D. (2012). Validating Identity , Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations * Enzymatic Purity or Activity Purity Consequences of using Enzymatically Impure Enzyme Preparations . Signs of Enzymatic Contamination. *Assay Guidance Manual, Md*, 1–13.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(539). <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, V. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S. (2017). Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.028>
- Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B. P., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., & Chandra Nayaka, S. (2019). Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Suleman, E., Mtshali, M. S., & Lane, E. (2016). Investigation of false positives associated with loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Toxoplasma gondii* in archived tissue samples of captive felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), 536–542. <https://doi.org/10.1177/1040638716659864>
- Sundaramoorthy, S., & Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ARTICLE INFO ABSTRACT. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1(03), 36–040. <https://doi.org/10.7324/JABB.2013.1306>
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- UNESCO. (2021). *UNESCO Recommendation on Open Science*.
- Velders, A. H., Ossendrijver, M., Keijser, B. J. F., & Saggiomo, V. (2022). T-Cup: A Cheap, Rapid, and Simple Home Device for Isothermal Nucleic Acid Amplification.

- Global Challenges*, 6(3), 2100078. <https://doi.org/10.1002/gch2.202100078>
- Wang, D. G., Brewster, J. D., Paul, M., & Tomasula, P. M. (2015). Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*, 20(4), 6048–6059. <https://doi.org/10.3390/molecules20046048>
- Wang, Y., Wang, C., Ma, Y., Zhang, X., & Yang, H. (2022). *Rapid and specific detection of Fusarium acuminatum and Fusarium solani associated with root rot on Astragalus membranaceus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*.
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Xu, J., Wang, J., Zhong, Z., Su, X., Yang, K., Chen, Z., Zhang, D., Li, T., Wang, Y., Zhang, S., Ge, S., Zhang, J., & Xia, N. (2020). Room-temperature-storable PCR mixes for SARS-CoV-2 detection. *Journal of Cleaner Production*, January. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.06.013>
- Xu, J., Zheng, Q., Yu, L., Liu, R., Zhao, X., Wang, G., Wang, Q., & Cao, J. (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25 . *Food Science & Nutrition*, 1(6), 432–438. <https://doi.org/10.1002/fsn3.68>
- Yaren, O., Alto, B. W., Gangodkar, P. v., Ranade, S. R., Patil, K. N., Bradley, K. M., Yang, Z., Phadke, N., & Benner, S. A. (2017). Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2382-0>
- Zhang, Y., & Tanner, N. A. (2022). Improving RT-LAMP detection of SARS-CoV-2 RNA through primer set selection and combination. *PLOS ONE*, 17(4), e0254324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254324>
- Zhaohui, W. (2021). Open science can help us meet our development goals. In *World Economic Forum*. <https://www.weforum.org/agenda/2021/10/why-open-science-is-the-cornerstone-of-sustainable-development/>

ANEXO

Tabla S1: Secuencias utilizadas para el diseño del control positivo del gen *six5* de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. En subrayado se presentan los fragmentos comunes ambas secuencias.

| Nombre | Descripción | Secuencia |
|-----------------------|--|---|
| <i>six5_conserved</i> | Secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento múltiple de siete secuencias del gen <i>six5</i> de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> | <u>cagcgcacagcactactatctctatctnnaccagaatcgatacaatcaatcatgcgcttcg</u> <u>agtacatctctgttcttagccctttgcgcgcgaggtaatcttagccctttgttatcttacac</u> <u>gcctgtgtagttcgtgtgtttgctaacatggcttagtctcgcaagggatcatcagtagctgt</u> <u>gcttgccagtcggcttctggtgacagcattgatatagatgccaccactcagcttcagaacga</u> <u>taatagtaaatcatatttgggggtatgtatacctcatagtgattggcaattgggcaagct</u> <u>tacaattctatagctcagacctctccagcatattggtttgctgacctcataaacctggctc</u> <u>acgattcgtctggcatttatgtaagtctacagcttaggatgattaagtgctgaactaacctt</u> <u>gactagctgaaagctgcaaatggcaaatggatggcgatacattctataatctttgcattaa</u> <u>taatggaggagcagactcaacatgctttgactgctctaaatctcaccaggttagaacgcta</u> <u>tctattgtgatgcgccctagaggtatctacagctt</u> |
| <i>gsix5</i> | gBlock® con parte de la secuencia <i>six5_conserved</i> (subrayada), flanqueada en ambos extremos por secuencias del vector de entrada pLOR (mayúsculas) que incluyen sitios de corte para la enzima <i>SapI</i> | AAGTCTTCATCCTACTtgtgcttgccagtcggcttctggtgacagcattgatatagatgcc <u>accactcagcttcagaacgataatagtaaatcatatttgggggtatgtatacctcatagtg</u> <u>attgggcaattgggcaagcttacaattctatagctcagacctcaccagcataltggttgct</u> <u>gaccgtcataaacgggtccacgattcgtctggcatttatgtaagtctacagcttaggatgatt</u> <u>aagtgcctgaactaaccttgactagctgaaagctgcaaatggcaaatggatggcgatacat</u> <u>tctataatctttgcattaaatggaggagcagactcaacatgctttgactgctctaaatct</u> <u>caccaggttagaacggttatctattgtgatgcgccctagAGGTCGAAGAAGAGCAA</u> |

Tabla S2: Set de partidores utilizados en reacciones de PCR y/o secuenciación

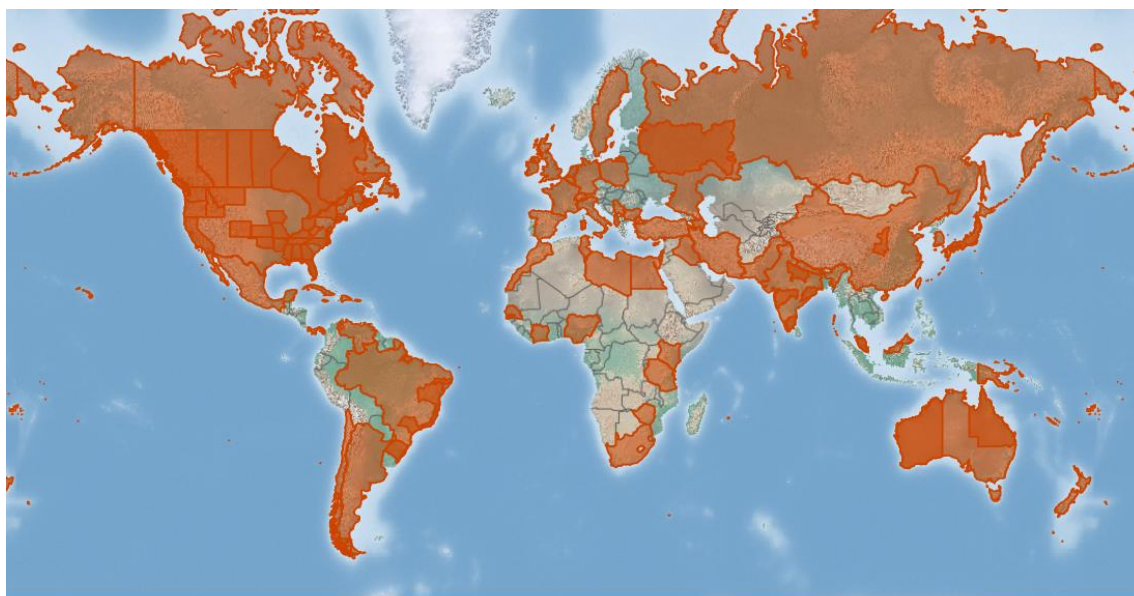
| Partidor | Secuencia |
|-----------------|--|
| <i>gsix5_Fw</i> | CTTCATCCTACTTGTGCTTGCCAGTCCGGTTCT |
| <i>gsix5_Rv</i> | CTTCTTCGACCTCTAGGCCGCATCACAATAGATAA |
| UNS1 | cattactcgcattccattctcaggctgtctcgtctcgtctc |
| UNSX | gggtggaagggtcggagttgtggttaattctatgtatcctgg |

Tabla S3: Set de partidores LAMP para promotor 35S utilizado en *GMO Detective* (https://benchling.com/prosimio/f_yC4lxHZT-educational-resources/).

| Partidor | Secuencia | Modificación |
|------------|--|--------------|
| 35SZ-F3 | AAGATGCCTCTGCCGACA | |
| 35SZ-B3 | CAGCGTGTCTCTCCAAAT | |
| 35SZ-FIP | ACGTGGTTGGAACGTCTTCTTCCCAAAGATGGACCCCA | |
| 35SZ-BIP | ATCTCCACTGACGTAAGGGATGATAGAGGAAGGGTCTTGCGA | FAM 5' |
| 35SZ-LF | TCCACGATGCTCCTCGTG | |
| 35SZ-LB | ACGCACAATCCCACTATCCT | |
| 35SZ-BIP-Q | CAGTGGAGAT | IBHQ 3' |

Tabla S4: Muestras de alimentos utilizadas en *GMO Detective*

| Alimento | Detalle (Marca) |
|----------|---|
| Leche | Alimento Líquido de Soya Vainilla (ViviCosí) |
| Salsa | Salsa de Soya Botella (Gourmet) |
| Hamb. | Hamburguesa de soya (Mister Veggie) |
| Choclo | Choclo congelado en granos (Frutos del Maipo) |



CABI, 2022. *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc>

● CABI Summary Data

Figura S1: Distribución geográfica de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Mapa ilustrativo que indica, mediante una coloración naranja, países o regiones en los que se ha descrito la presencia de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Imagen y datos extraídos de CABI (2022).

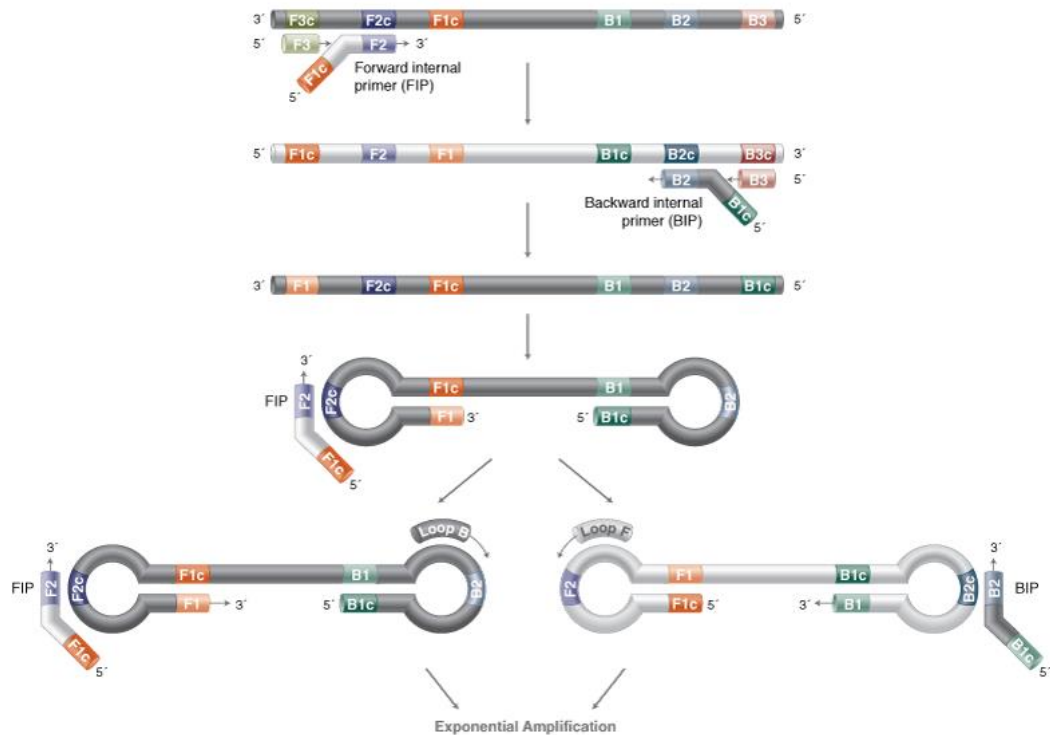


Figura S2: Esquema de reacciones LAMP. Se detallan los primers F3, FIP (F1c y F2), B3, BIP (B1c y B2) y los pasos que llevan a la formación de la estructura de “mancuerna” a través de una amplificación isotermal dependiente de una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra. Se muestran los primers LB y LF (LoopB y LoopF, respectivamente), que favorecen una amplificación exponencial de la estructura formada. Imagen extraída de *New England Biolabs*.

QUASR primer and complementary quenching probe

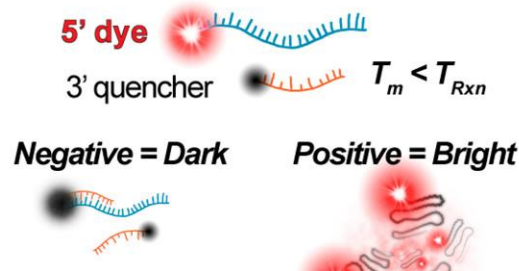


Figura S3: Esquema de detección QUASR de reacciones LAMP. Uno de los primers loop (LF/LB) o internos (FIP/BIP) es marcado con un fluoróforo. La reacción también contiene una sonda corta, unida a un quencher en su extremo 3' y complementaria al extremo 5' del primer marcado con el fluoróforo. Esta sonda posee una T_m al menos 10°C bajo la temperatura de la reacción LAMP, para permanecer disociada durante la amplificación. Una vez que la reacción es enfriada a temperatura ambiente, puede existir la inhibición de la fluorescencia (*dark quenching*, resultado negativo) o la presencia de amplicones emitiendo una señal fluorescente (reacciones positivas). Imagen y descripción extraídas de Ball y col (2016).

A) six2

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|--|---------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------|
| Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate Fol_UDC-10 secreted in the xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 1190 | 1190 | 100% | 0.0 | 100.00% | 644 | MN745206.1 |
| Fusarium oxysporum isolate Fol3 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 1190 | 1190 | 100% | 0.0 | 100.00% | 723 | MK906596.1 |
| Fusarium oxysporum isolate Fol2 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 1190 | 1190 | 100% | 0.0 | 100.00% | 725 | MK906595.1 |
| Fusarium oxysporum isolate Fol1 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 1190 | 1190 | 100% | 0.0 | 100.00% | 722 | MK906594.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici six1 gene_fot5 gene_six2 gene_shh1 gene_and ORF2 (partial) | Fusarium oxysp... | 1190 | 1190 | 100% | 0.0 | 100.00% | 14531 | AJ608703.3 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287 hypothetical protein partial mRNA | Fusarium oxysp... | 1155 | 1155 | 97% | 0.0 | 100.00% | 699 | XM_018396439.1 |
| Fusarium oxysporum isolate SIX235 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 1155 | 1155 | 97% | 0.0 | 100.00% | 663 | KM047024.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate BFOL-51 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 1155 | 1155 | 97% | 0.0 | 100.00% | 699 | GQ268949.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate Fol59 secreted in the xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 1179 | 1179 | 99% | 0.0 | 99.84% | 641 | MN745205.1 |
| Fusarium mangiferae uncharacterized protein (FMAN_09493)_partial mRNA | Fusarium mangi... | 750 | 750 | 97% | 0.0 | 88.34% | 699 | XM_041830344.1 |
| Fusarium fujikuroi strain Augusto2 chromosome VI | Fusarium fujikuroi | 750 | 750 | 97% | 0.0 | 88.24% | 4218434 | CP023094.1 |
| Fusarium fujikuroi IMI 58289 draft genome_chromosome FFUJ_chr06 | Fusarium fujikur... | 750 | 750 | 97% | 0.0 | 88.24% | 4234805 | HF679028.1 |
| Fusarium fujikuroi IMI 58289 uncharacterized protein (FFUJ_06492)_partial mRNA | Fusarium fujikur... | 745 | 745 | 97% | 0.0 | 88.18% | 699 | XM_023579823.1 |
| Fusarium fujikuroi isolate UQ6540 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium fujikuroi | 246 | 246 | 34% | 2e-60 | 86.61% | 223 | MW076673.1 |
| Fusarium fujikuroi isolate UQ6530 secreted in xylem 2 (SIX2).gene_partial cds | Fusarium fujikuroi | 244 | 244 | 34% | 8e-60 | 86.55% | 222 | MW076676.1 |

B) six5

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|-------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------|
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287 hypothetical protein mRNA | Fusarium oxysp... | 665 | 665 | 100% | 0.0 | 100.00% | 708 | XM_018402898.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287 hypothetical protein mRNA | Fusarium oxysp... | 665 | 665 | 100% | 0.0 | 100.00% | 747 | XM_018402897.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici Six5 mRNA_complete cds | Fusarium oxysp... | 665 | 665 | 100% | 0.0 | 100.00% | 360 | FJ767863.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate Fol_UDC-10 secreted in the xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 255 | 674 | 100% | 2e-63 | 99.29% | 589 | MN745210.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate Fol59 secreted in the xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 255 | 674 | 100% | 2e-63 | 99.29% | 573 | MN745209.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fol3 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 255 | 674 | 100% | 2e-63 | 99.29% | 637 | MK906608.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fol2 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 255 | 674 | 100% | 2e-63 | 99.29% | 655 | MK906607.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fol1 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 255 | 674 | 100% | 2e-63 | 99.29% | 638 | MK906606.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate SIX5MN25 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 250 | 669 | 99% | 1e-61 | 99.28% | 523 | KM047033.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate BFOL-51 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_partial cds | Fusarium oxysp... | 250 | 667 | 99% | 1e-61 | 99.28% | 523 | GQ268952.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. isolate Fus439 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium sp. | 222 | 312 | 57% | 2e-53 | 95.04% | 655 | MK906613.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cepae isolate A21 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 172 | 306 | 63% | 2e-38 | 88.65% | 605 | KP964966.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cepae isolate FUS2 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 172 | 306 | 63% | 2e-38 | 88.65% | 600 | KP964965.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fus129 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 172 | 306 | 63% | 2e-38 | 88.65% | 638 | MK906612.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fus127 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 172 | 306 | 63% | 2e-38 | 88.65% | 641 | MK906611.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fus125 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 172 | 306 | 63% | 2e-38 | 88.65% | 641 | MK906610.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fus062 secreted in xylem 5 (SIX5).gene_complete cds | Fusarium oxysp... | 172 | 306 | 63% | 2e-38 | 88.65% | 646 | MK906609.1 |

Figura S4: BLAST de six2 y six5 de Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici. Resultados principales al realizar un análisis BLAST del gen six2 (A, GenBank accession number MN745206) o six5 (B, GenBank accession number FJ767863).

```

#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
1: GQ268952.1 100.00 99.81 99.81 99.81 99.81 99.81 99.81
2: MK906606.1 99.81 100.00 100.00 100.00 98.25 99.83 100.00
3: MK906607.1 99.81 100.00 100.00 100.00 98.25 99.83 100.00
4: MK906608.1 99.81 100.00 100.00 100.00 98.25 99.83 100.00
5: MN745209.1 99.81 98.25 98.25 98.25 100.00 99.29 100.00
6: MN745210.1 99.81 99.83 99.83 99.83 99.29 100.00 100.00
7: KM047033.1 99.81 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00

```

Figura S5: Matriz de identidad entre secuencias alineadas del gen *six5* de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Resultado entregado por *Clustal Omega* al realizar el alineamiento múltiple de las secuencias del gen *six5* de *Fol* (en formato *Genbank*): GQ268952, KM047033, MK906606, MN745210, MN745209, MK906608 y MK906607. Cada fila numera una de estas secuencias, indicando hacia la derecha el porcentaje de identidad que esta presenta con las otras secuencias (de 1 a 7, de izquierda a derecha).

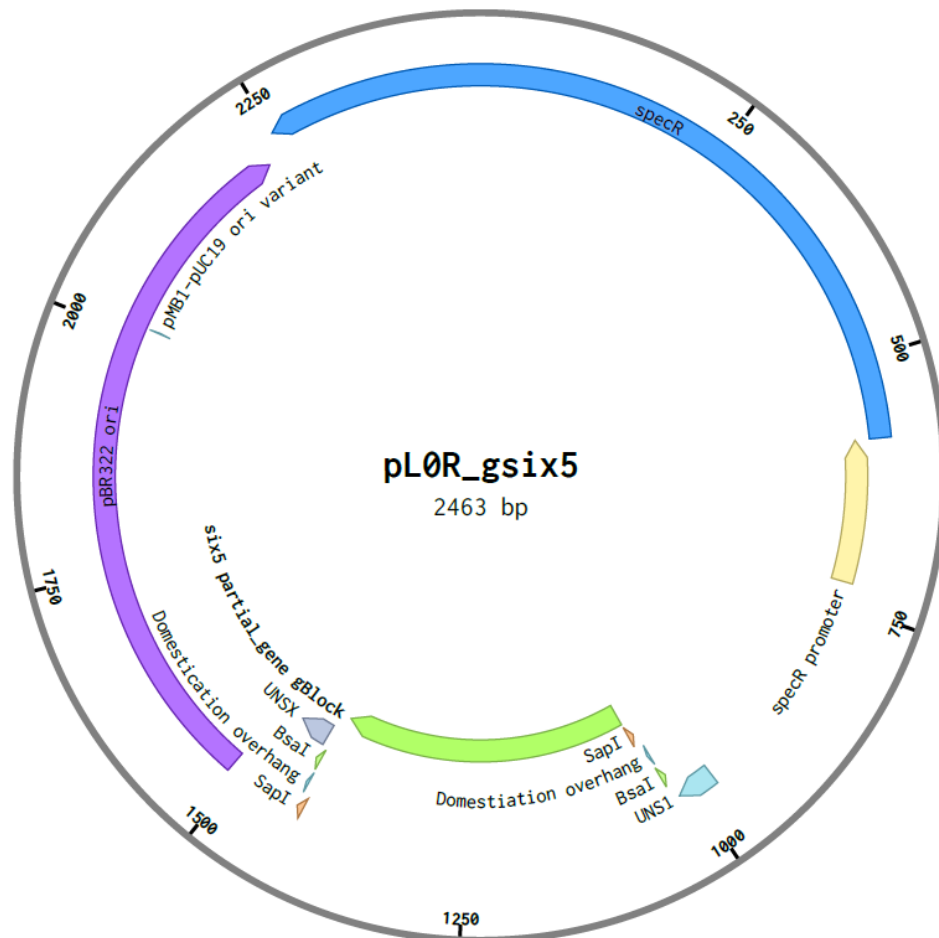


Figura S6: Esquema del plásmido pL0R-*gsix5*. Esquema del vector pL0R-*gsix5*, incluyendo la presencia de un cassette de resistencia a espectinomicina con su respectivo promotor, las secuencias UNSX y UNS1, sitios de corte para la enzima de restricción *SapI* y un fragmento del gen *six5* de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, el cual reemplaza al gen de la β -galactosidasa originalmente presente en el vector pL0R-*lacZ*.

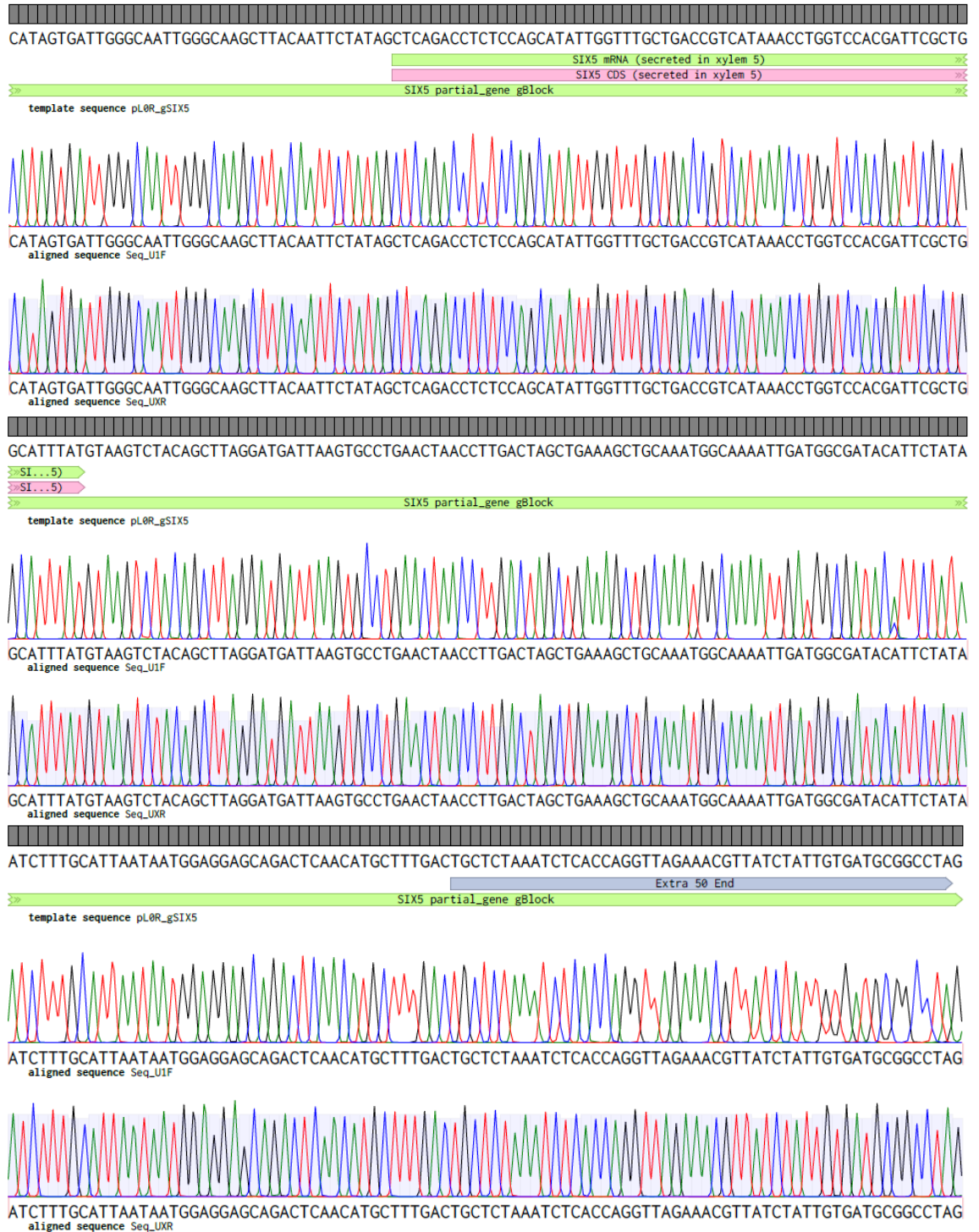








Figura S7: Secuenciación ADN de pL0R-gsix5. Parte de cromatogramas obtenidos en la secuenciación de una dilución de ADN plasmidial obtenido de una colonia transformada con el vector pL0R-gsix5, utilizando los partidores UNS1 y UNSX.

FAM-FIP

| structure | Image | ΔG (kcal.mole ⁻¹) | T _m (°C) | ΔH (kcal.mole ⁻¹) | ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹) |
|-----------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|
| 1 |  | -1.54 | 47.4 | -22.1 | -68.95 |
| 2 |  | -1.5 | 39.5 | -32.4 | -103.64 |
| 3 |  | -1.31 | 35.2 | -39.7 | -128.76 |
| 4 |  | -1.2 | 32.4 | -49.2 | -161.01 |
| 5 |  | -1.05 | 38.8 | -23.8 | -76.3 |
| 6 |  | -0.95 | 31 | -47.8 | -157.14 |

BIP

| structure | Image | ΔG (kcal.mole ⁻¹) | T _m (°C) | ΔH (kcal.mole ⁻¹) | ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹) |
|-----------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|
| 1 |  | -4.13 | 43.6 | -70.4 | -222.28 |
| 2 |  | -3.01 | 35.9 | -85.2 | -275.66 |
| 3 |  | -2.61 | 34.7 | -83 | -269.63 |

Figura S8: Estructuras secundarias de partidores FIP y BIP del Set Ayukawa-Q. Datos obtenidos mediante la herramienta OligoAnalyzer.

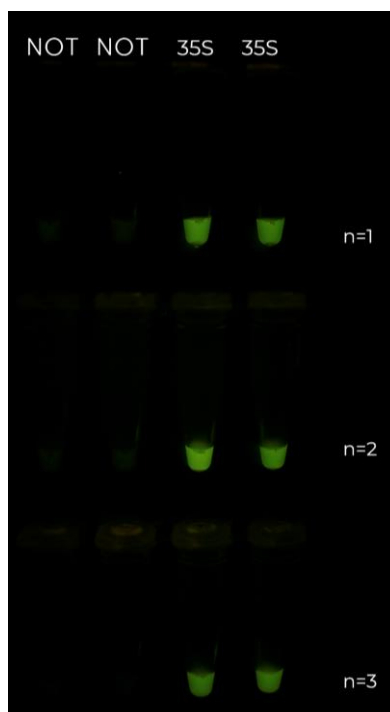


Figura S9: Reacciones *GMO Detective* con reactivos y enzimas caseras. Resultados de fluorescencia obtenidos al llevar a cabo reacciones LAMP-QUASR y observarlas en un transiluminador de luz azul. NOT indica controles negativos sin templado y 35S reacciones con 20 mil copias del plásmido pL0R-35S. Las reacciones se llevan a cabo en triplicado (n = 3) y cada fila corresponde a un experimento distinto.

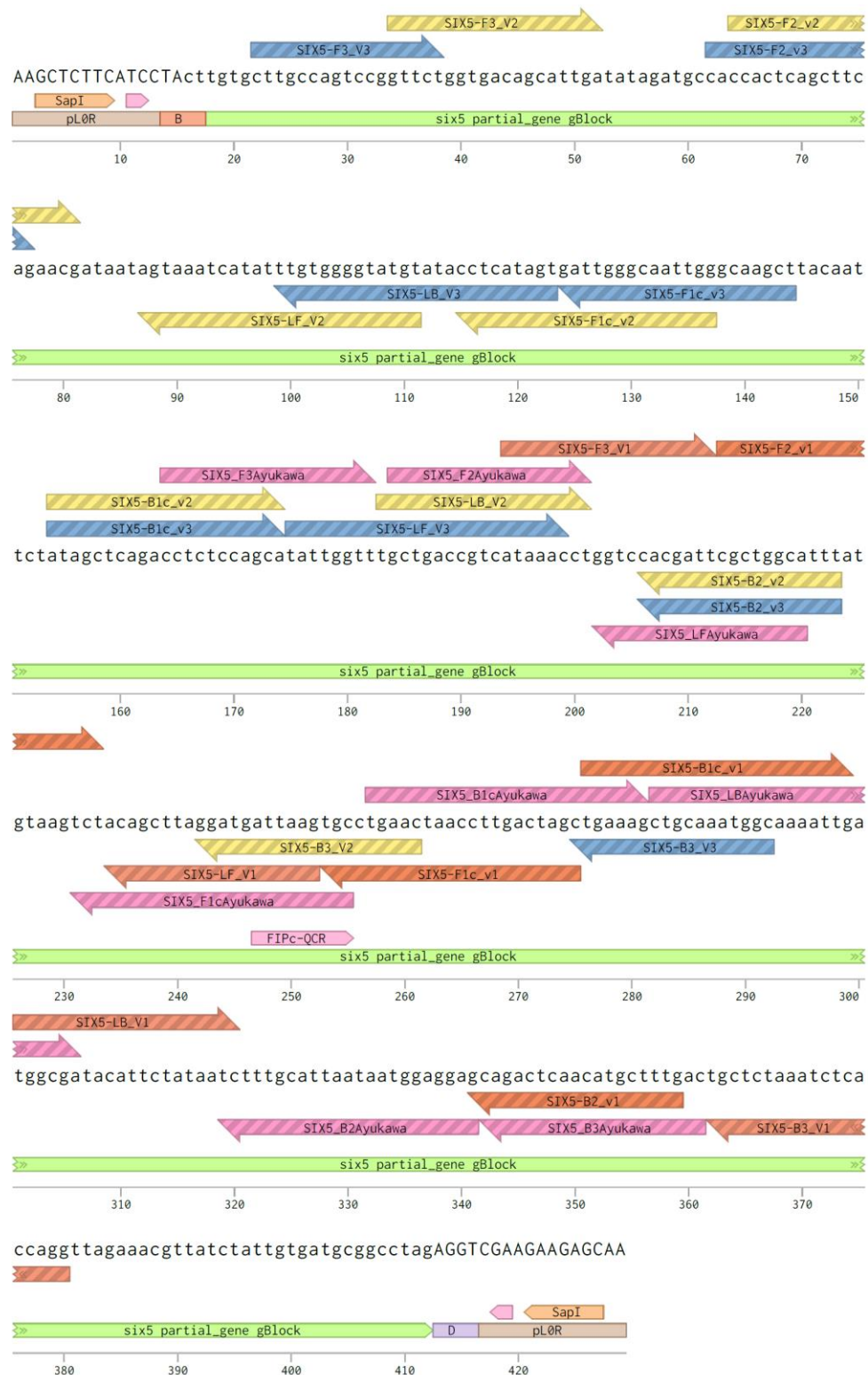


Figura S10: Ubicación de primers LAMP en *six5*. Se detallan la ubicación de los partidores del set 1, 2, 3 y Ayukawa-Q en la secuencia *six5* (distintos colores para cada set), la cual contiene una región conservada del gen *six5* de *FoI* flanqueada por secuencias que permiten su inserción en un plásmido pLOR.

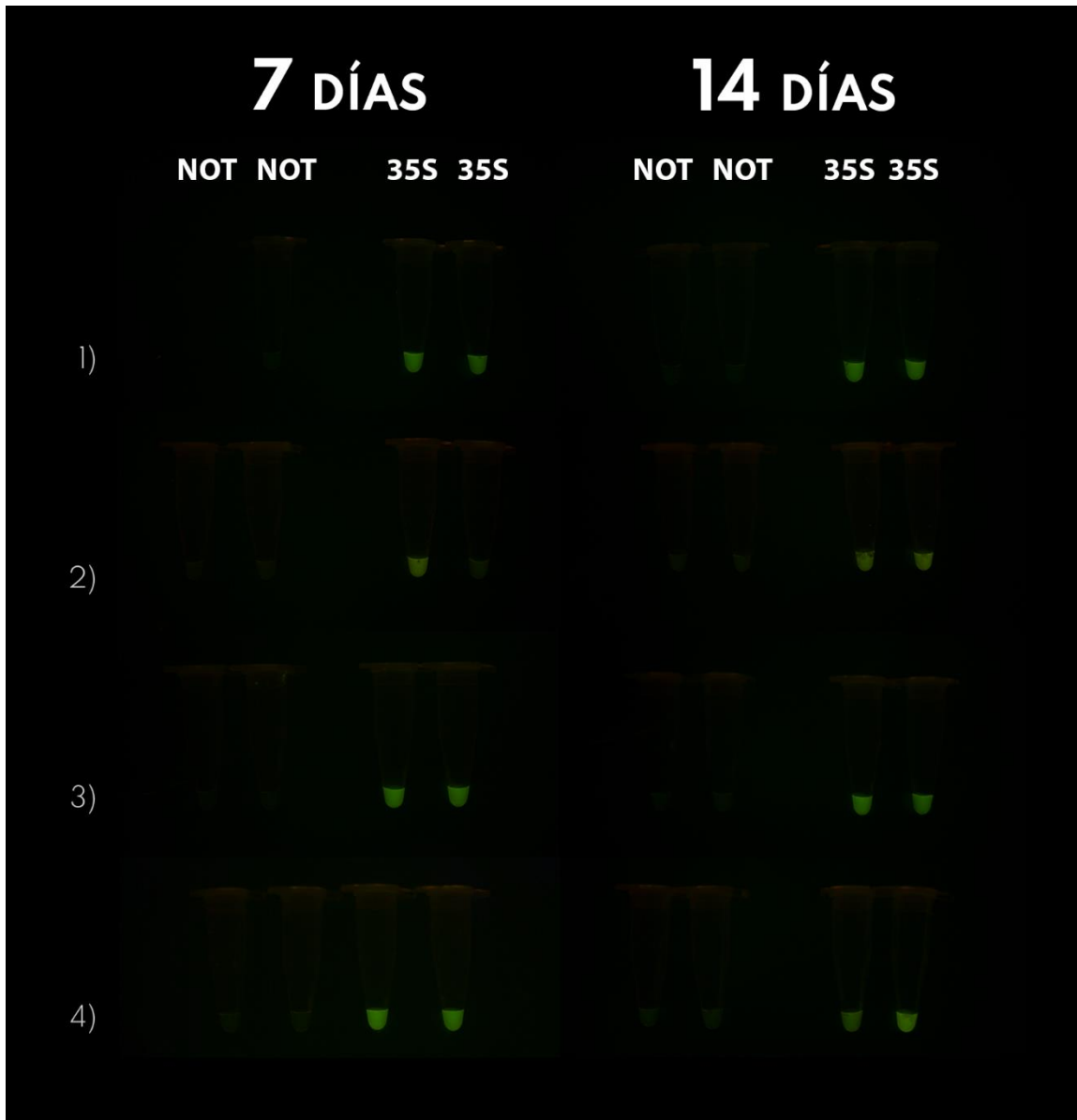


Figura S11: Resultados de liofilización de reacciones LAMP *GMO Detective*. Resultados de fluorescencia obtenidos al liofilizar reacciones LAMP-QUASR, almacenarlas a temperatura ambiente por dos semanas y posteriormente rehidratarlas con agua, ADN, *buffer* isoterma y $MgSO_4$ a los 7 o 14 días de su liofilización. NOT indica controles negativos sin templado y 35S reacciones con 20 mil copias del plásmido pLOR-35S. Se realizan 4 experimentos de liofilización ($n=4$), cada uno con dos réplicas técnicas. Cada fila corresponde a un experimento de liofilización realizado en días distintos.

| select all 92 sequences selected | | GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer | | | |
|---|-------------------------|-----------|-------------|--------------------------|------------|------------|----------|----------------------------|
| Scientific Name | Taxid | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| Fusarium languescens | 2502992 | 4157 | 4157 | 96% | 0.0 | 100.00% | 2251 | MH484826.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4276 | 4276 | 99% | 0.0 | 99.96% | 2318 | HM057257.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4276 | 4276 | 99% | 0.0 | 99.96% | 2321 | HM057248.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4270 | 4270 | 99% | 0.0 | 99.96% | 2315 | HM057246.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4224 | 4224 | 98% | 0.0 | 99.96% | 2290 | HM057242.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4270 | 4270 | 99% | 0.0 | 99.91% | 2319 | HM057273.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4270 | 4270 | 99% | 0.0 | 99.91% | 2319 | HM057247.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4270 | 4270 | 99% | 0.0 | 99.91% | 2320 | HM057234.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4270 | 4270 | 99% | 0.0 | 99.91% | 2318 | HM057235.1 |
| Fusarium languescens | 2502992 | 4148 | 4148 | 96% | 0.0 | 99.91% | 2253 | MH484800.1 |
| Fusarium languescens | 2502992 | 4146 | 4146 | 96% | 0.0 | 99.91% | 2252 | MH484801.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4274 | 4274 | 100% | 0.0 | 99.87% | 2326 | HM057269.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4266 | 4266 | 99% | 0.0 | 99.87% | 2320 | HM057240.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4266 | 4266 | 99% | 0.0 | 99.87% | 2321 | HM057238.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4255 | 4255 | 99% | 0.0 | 99.87% | 2314 | HM057272.1 |
| Fusarium oxysporum | 5507 | 4194 | 4194 | 100% | 0.0 | 99.19% | 2511 | EU418430.1 |
| Fusarium curvatum | 2502985 | 4117 | 4117 | 100% | 0.0 | 98.71% | 2337 | MW024385.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4106 | 4106 | 99% | 0.0 | 98.66% | 2314 | HM057270.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. cubense | 61366 | 4076 | 4076 | 99% | 0.0 | 98.65% | 2298 | KC869390.1 |
| Fusarium nirenbergiae | 2502993 | 4108 | 4108 | 100% | 0.0 | 98.62% | 2341 | MW024407.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici | 61372 | 4100 | 4100 | 99% | 0.0 | 98.62% | 2315 | HM057237.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lactucae | 299031 | 4089 | 4089 | 99% | 0.0 | 98.62% | 2309 | MH412710.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lactucae | 299031 | 4089 | 4089 | 99% | 0.0 | 98.62% | 2309 | MH412709.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lactucae | 299031 | 4089 | 4089 | 99% | 0.0 | 98.62% | 2309 | MH412708.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lactucae | 299031 | 4089 | 4089 | 99% | 0.0 | 98.62% | 2309 | MH412707.1 |
| Fusarium oxysporum f. sp. lactucae | 299031 | 4089 | 4089 | 99% | 0.0 | 98.62% | 2309 | MH412706.1 |

Figura S12: BLAST de gen 28S de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Resultados principales al realizar un análisis BLAST del gen 28S (GenBank accession number HM057281), excluyendo todos los resultados de secuencias de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* a modo de comparar la similitud de la secuencia obtenida con la de otras sub-especies o especies de *Fusarium*.