



**Evaluación de genes de mantenimiento como controles internos mediante la técnica RT – qPCR y la herramienta bioinformática EDNA – MiFi en *Vitis vinífera* infectada con *Grapevine red blotch – associated virus* (GRBaV)**

Tello Gallegos, Ricardo Paúl

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Flores Flor, Francisco Javier PhD.

31 de agosto del 2021

## Hoja de Resultados de la Herramienta Urkund



### Document Information

<b>Analyzed document</b>	RTello Urkund.txt (D111430780)
<b>Submitted</b>	8/18/2021 5:54:00 PM
<b>Submitted by</b>	
<b>Submitter email</b>	fjflores2@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	1%
<b>Analysis address</b>	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26960112/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26960112/</a> Fetched: 8/18/2021 5:55:00 PM		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis_Alvaro_Ramos fjf corrección_01.docx</b> Document Tesis_Alvaro_Ramos fjf corrección_01.docx (D97136033) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis_Karla Ramos.docx</b> Document Tesis_Karla Ramos.docx (D53540411) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		<b>1</b>





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Evaluación de genes de mantenimiento como controles internos mediante la técnica RT – qPCR y la herramienta bioinformática EDNA – MiFi en *Vitis vinifera* infectada con *Grapevine red blotch – associated virus (GRBaV)*” fue realizado por el señor **Tello Gallegos, Ricardo Paul** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.**

Sangolquí, 19 de agosto de 2021



.....  
Flores Flor, Francisco Javier

C. C.: 1713443479



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Tello Gallegos, Ricardo Paul**, con C.C. 171776860 – 8, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación de genes de mantenimiento como controles internos mediante la técnica RT – qPCR y la herramienta bioinformática EDNA – MIFI en *Vitis vinifera* infectada con *Grapevine red blotch – associated virus* (GRBaV)"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 18 de agosto de 2021

Tello Gallegos Ricardo Paul

C.C.: 171776860 – 8



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de publicación**

Yo, **Tello Gallegos, Ricardo Paul**, con C.C. 171776860 – 8, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Evaluación de genes de mantenimiento como controles internos mediante la técnica RT – qPCR y la herramienta bioinformática EDNA – MIFI en *Vitis vinifera* infectada con *Grapevine red blotch – associated virus (GRBaV)***" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 18 de agosto de 2021

Tello Gallegos Ricardo Paul

C.C.: 171776860 – 8

## Dedicatoria

A Jesucristo,

con tu amor incondicional siempre serás mi guía y mi horizonte;

Contigo todo, sin ti nada.

Mamá, nunca tendré suficiente para devolverte tanto. Juntos hemos luchado tormentas.

¡Lo logramos mi reina!

¡Lunita! mi mejor amiga y consejera. Los mejores regalos de vida los he recibido de tu infinito amor. Juan José, Isabela y Danny los quiero con mi vida.

¡Lo logramos familia!

*Ricardo Paul Tello Gallegos*

## Agradecimientos

Agradezco al Ing. Francisco Flores, PhD. tutor y docente, infinitas gracias por confiar en mí y abrirme las oportunidades a una nueva experiencia.

Al Ing. Andrés Espíndola, PhD. docente investigador de Oklahoma State University (OSU) por abrirme las puertas y la confianza entera de liderar los proyectos de investigación en el Institute of Biosecurity and Microbial Forensics (IBMF).

Al Doctor Francisco Ochoa Corona que con cada palabra y consejo ha inspirado en continuar el día a día de éxitos y fracasos en el diario vivir de la ciencia.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por ser mi alma mater quien ha construido las bases para un futuro profesional brillante.

Amparito Navas quien ha sido mi ángel guardián, quien siempre me ha inspirado a seguir luchando por mis sueños y quien me ha enseñado que no existen los imposibles. Namasté!

Jorge y Diego mis hermanos de toda la vida. Infinitas gracias su amistad y su amor incondicional.

A mi familia en Oklahoma: Andrea, Ishtar, Salome, Patricia, Marcos y Daniele por nunca dejarme solo tan lejos de casa. ¡Son unos genios!

A mi madre, nunca podré devolverte lo que has hecho por mí, tantas horas de trabajo extra, tantos éxitos y tantos fracasos, tanto amor, tanta paciencia, ¡tanto! Que gracias a ti me he formado a tu semejanza. Gracias mi superhéroe ¡Te quiero mi reina!

A mi padre por brindarme su apoyo a lo largo de mi formación profesional, tu soporte y tus consejos por fin han llegado a dar resultados.

A mi hermana Gabriela por siempre ser incondicional en mi vida, tus abrazos, tus consejos y tus regaños me hacen valorar lo importante que eres en mi vida. ¡Te quiero mi lunita!

A mis sobrinos Juan José e Isabela, gracias por llegar y traer con ustedes la felicidad. Ustedes me han enseñado que el amor es tan noble que hasta daría mi vida por ustedes.

A mi familia entera, gracias por sus bendiciones, sus consejos, su aliento y su infinito amor.

## Índice de Contenidos

Hoja de Resultados de la Herramienta Urkund.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización .....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Listado de Tablas.....	12
Listado de Figuras.....	13
Listado de abreviaturas.....	14
Resumen .....	15
Abstract .....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del problema.....	17
Justificación del problema .....	18
Objetivos de la Investigación .....	19
Objetivo General.....	19
Objetivo específico.....	19
Capítulo II: Marco Referencial .....	20
Género <i>Vitis</i> spp.....	20

	10
<b>Relevancia económica de la viticultura</b> .....	20
<b>Enfermedades de <i>Vitis Vinífera</i></b> .....	22
<b>Grapevine red blotch – associated virus (GRBaV)</b> .....	23
<b>Métodos de diagnóstico</b> .....	24
<b>RT – qPCR</b> .....	25
<b>Inmunoensayos</b> .....	26
<b>Genes de mantenimiento</b> .....	26
<b>MinION – Oxford Nanopore Sequencing</b> .....	27
<b>E – probe Diagnostic Nucleic Acid Analysis (EDNA)</b> .....	28
<b>Hipótesis</b> .....	29
<b>Capítulo III: Materiales y métodos</b> .....	30
<b>Instituciones participantes</b> .....	30
<b>Colaboradores científicos</b> .....	30
<b>Área de estudio</b> .....	30
<b>Material biológico</b> .....	30
<b>Extracción total de ARN</b> .....	31
<b>Síntesis de ADN complementario de doble cadena (ADNc – dc )</b> .....	32
<b>Selección y validación de cebadores candidatos</b> .....	32
<b>Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real RT – qPCR</b> ....	34
<b>Evaluación de la expresión de genes de referencia</b> .....	35

<b>E – probe diagnostic nucleic acid analysis (EDNA)</b> .....	35
<b>HTS MinION – ONT Oxford Nanopore Technologies</b> .....	36
<b>MiFi – MiDetect</b> .....	38
<b>Capítulo IV: Resultados</b> .....	39
<b>Extracción total de ARN y síntesis de ADNc – dc</b> .....	39
<b>Validación de cebadores candidatos</b> .....	41
<b>RT – qPCR y High resolution melting</b> .....	42
<b>RefFinder</b> .....	46
<b>Diseño de E – probes</b> .....	48
<b>Secuenciación MinION – ONT</b> .....	48
<b>MiFi Microbe Finder</b> .....	49
<b>Capítulo VI: Conclusiones</b> .....	55
<b>Capítulo VII: Recomendaciones</b> .....	56
<b>Capítulo VIII: Bibliografía</b> .....	57

### Listado de Tablas

<b>Tabla 1</b> Detalles de material biológico utilizado.....	31
<b>Tabla 2</b> Cebadores candidatos provenientes de fuentes bibliográficas.....	33
<b>Tabla 3</b> Parámetros de amplificación PCR convencional con gradiente de temperaturas. .....	33
<b>Tabla 4</b> Parámetros de amplificación de RT – qPCR. ....	34
<b>Tabla 5</b> Reactivos utilizados en la reacción de RT – qPCR. ....	34
<b>Tabla 6</b> Parámetros utilizados para el diseño de e – probes. ....	36
<b>Tabla 7</b> Genomas objetivo-utilizados como referencia para el mapeo de metagenomas mediante minimap2.....	38
<b>Tabla 8</b> Concentraciones y absorbancias obtenidas de la extracción total de ARN.....	39
<b>Tabla 9</b> Análisis de eficiencia RT – qPCR por cada gen de mantenimiento candidato. .	43
<b>Tabla 10</b> Evaluación RefFinder de expresión de genes de mantenimiento candidatos en muestras de tejido sano Vitis spp. y tejido Vitis vinífera infectada con GRBaV.....	47

## Listado de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Producción mundial de vino en 2018.</i>	21
<b>Figura 2.</b> <i>Organización del genoma Grapevine red blotch – associated virus GRBaV.</i>	23
<b>Figura 3.</b> <i>Sintomatología y transmisión de GRBaV</i>	24
<b>Figura 4.</b> <i>Flujo de trabajo secuenciación MinION – Oxford Nanopore Technologies.</i>	27
<b>Figura 5.</b> <i>Diagrama de flujo E – probe Detection of Nucleic Acid Analysis (EDNA)</i>	28
<b>Figura 6.</b> <i>Diluciones seriadas de ADNc – dc de Vitis spp. sana y Vitis vinífera infectada con GRBaV</i>	37
<b>Figura 7.</b> <i>Visualización de integridad ARN total en gel de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X.</i>	40
<b>Figura 8.</b> <i>Visualización de fragmentos amplificados de PCR convencional en gradiente de temperatura en gel de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X de genes de mantenimiento candidatos</i>	41
<b>Figura 9.</b> <i>Amplificación RT – qPCR y HRM de muestras Vitis spp. sanas.</i>	44
<b>Figura 10.</b> <i>Amplificación RT – qPCR y HRM de muestras Vitis vinífera infectadas con GRBaV</i>	45
<b>Figura 11.</b> <i>Visualización de valores Ct en diagrama de cajas</i>	46
<b>Figura 12.</b> <i>Estabilidad de expresión de genes de mantenimiento candidatos calculados por RefFinder.</i>	48
<b>Figura 13.</b> <i>Diagrama de cajas E – probes hits vs Lecturas Genes de Mantenimiento.</i>	50

**Listado de abreviaturas**

<b>GRBaV</b>	Grapevine red blotch – associated virus
<b>RT – qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario
<b>ADNc – dc</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario de doble cadena
<b>GLD</b>	Grapevine leafroll disease
<b>GLRaV 1 – 7</b>	Grapevine leafroll – associated virus 1 – 7
<b>GRBD</b>	Grapevine red blotch disease
<b>HTS</b>	High Troughput Sequencing
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>TGS</b>	Third Generation Sequencing

## Resumen

La planta de uva *Vitis vinífera* es un cultivo de importancia económica a nivel mundial, solamente en el año 2019 Estados Unidos obtuvo una rentabilidad de 162 millones de dólares; sin embargo, las enfermedades de la vid representan el 30% de las pérdidas económicas. El diagnóstico estandarizado, preciso y oportuno de enfermedades de la vid es esencial para mantener las condiciones productivas y fitosanitarias adecuadas, es por ello que el control de calidad en el diagnóstico de fitopatógenos aislados a partir de ARN requiere el uso de genes endógenos como controles internos. Este estudio tiene como objetivo la evaluación de genes de mantenimiento como controles internos mediante la técnica RT – qPCR y la herramienta bioinformática EDNA – MiFi en tejido *Vitis* spp. sano y tejido *Vitis Vinífera* infectado con GRBaV.

La variabilidad de transcripción génica en diferentes organismos, tejidos y condiciones fisiológicas hacen necesaria la selección de genes con un perfil de expresión estable como controles internos. Se evaluaron genes de mantenimiento candidatos por medio de la RT – qPCR y se calcularon los valores de Ct con la herramienta RefFinder, clasificando a VvTCPB y VvAIG – 1 como los genes con un perfil de expresión más estable. La detección de los genes de mantenimiento seleccionados en la plataforma bioinformática EDNA – MiFi mediante el uso de sondas electrónicas permitió la detección positiva en concentraciones diluidas de hasta  $10^{-6}$  de los genes VvTCPB\_VvAIG – 1 en las muestras secuenciadas de tejido sano y tejido infectado con GRBaV.

Los hallazgos de la presente investigación permitieron la selección de dos genes de mantenimiento específicos de uva VvTCPB y VvAIG – 1 que pueden ser utilizados como controles internos en el diagnóstico de enfermedades virales como GRBaV aislados a partir de ARN.

Palabras Clave:

- **GENES DE MANTENIMIENTO**
- **CONTROLES INTERNOS**
- **GRBAV**
- **RT – qPCR.**
- **MINION OXFORD NANOPORE**

### Abstract

The grape plant *Vitis vinifera* is an economically important crop worldwide, only in 2019 the United States obtained a effectiveness of 162 million dollars; however, grapevine diseases represent 30% of economic losses. Standardized, accurate and timely diagnosis of grapevine diseases is essential to maintain adequate productive and phytosanitary conditions, which is why quality control in the diagnosis of phytopathogens isolated from RNA requires the use of endogenous genes as internal controls. This study aims to evaluate maintenance genes as internal controls using RT - qPCR and the bioinformatics tool EDNA - MiFi in healthy *Vitis* spp. tissue and *Vitis vinifera* tissue infected with GRBaV.

The variability of gene transcription in different organisms, tissues and physiological conditions makes it necessary to select genes with a stable expression profile as internal controls. Candidate housekeeping genes were evaluated by RT - qPCR and Ct values were calculated with the RefFinder tool, ranking VvTCPB and VvAIG - 1 as the genes with the most stable expression profile. Detection of the selected housekeeping genes in the EDNA - MiFi bioinformatics platform using electronic probes allowed positive detection at dilute concentrations of up to  $10^{-6}$  of VvTCPB\_VvAIG - 1 genes in the sequenced samples of healthy tissue and GRBaV-infected tissue.

The findings of the present investigation allowed the selection of two grape-specific housekeeping genes VvTCPB and VvAIG - 1 that can be used as internal controls in the diagnosis of viral diseases such as GRBaV isolated from RNA.

Keywords:

- **HOUSEKEEPING GENES**
- **INTERNAL CONTROLS**
- **GRBAV**
- **RT – qPCR.**
- **MINION OXFORD NANOPORE**

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

La planta de uva *Vitis vinífera* es una especie semileñosa que en promedio puede alcanzar cinco metros de altura; su fruto, es utilizado comúnmente para la elaboración de vino. España, China, Francia, Italia, Estados Unidos y Turquía representan el 50% de la producción de uva en el mundo. Estados Unidos de Norteamérica produjo el 10% del vino comercializado a nivel mundial, en 2016 logró una producción de 4.4 millones de toneladas de uva y en 2019 una ganancia neta de 162 millones de dólares por esta fruta (Ugaglia, Cardebat, & Corsi, 2019).

Dentro de la producción de vino se exige estándares de calidad, es por ello que se debe precautelar las enfermedades que afectan a la planta de uva. Desde 2015 en el estado de Oklahoma la mancha roja de la uva es una de las enfermedades más comunes. Esta enfermedad es causada por el *Grapevine red blotch – associated virus* (GRBaV) el cual disminuye proporcionalmente la concentración de azúcares en las uvas, alterando su sabor y disminuyendo la calidad y la producción de los viñedos (Wallace, 2016).

En la actualidad el método Gold standard en el diagnóstico molecular de virus fitopatógenos es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT – qPCR), sin embargo, el diagnóstico podría verse afectado cuando se trabaja a partir del aislamiento del ácido ribonucleico (ARN) debido a su fácil degradación. Para asegurar una mayor confiabilidad en el diagnóstico es necesaria la comparación de un gen objetivo y un control endógeno (Panina, Germond, Masui, & Watanabe, 2018).

## **Justificación del problema**

Las enfermedades virales generan una gama de síntomas en las plantas susceptibles, produciendo cambios en sus vías metabólicas y alterando funciones vitales de la planta. Los impactos negativos de las enfermedades virales se ven reflejadas en la disminución en el rendimiento de los cultivos y las pérdidas económicas que estas generan (Olufemi, y otros, 2016). Se han identificado cerca de 80 distintos virus en plantas de uva asociados con la degeneración de la planta, madera rugosa y enfermedades de la mancha. La enfermedad GLD causada por: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7, representa la mayor cantidad de pérdidas económicas en los cultivos de uva, sin embargo, la enfermedad GRBD causada por: GRBaV representa pérdidas de hasta 6854 dólares por hectárea de cultivo (Ricketts, Gómez, & Fuchs, 2017).

El diagnóstico molecular con RT – qPCR puede verse afectado por diferentes aspectos: contaminación durante el aislamiento de ARN, errores en la síntesis del ADNc y otras formas de error experimental generadas por el operador (Pulgar & Casanova, 2019). Los aspectos antes mencionados de la RT – qPCR podrían estar asociados a una inadecuada normalización de datos de estabilidad génica en el estudio de cada organismo, por lo que el estudio de genes endógenos permitirá que el diagnóstico molecular refleje resultados más confiables a partir del análisis de expresión génica. Los genes de mantenimiento son objeto de estudio ya que juegan un rol importante al ser utilizados como controles internos, brindando un diagnóstico eficiente de virus fitopatógenos y la garantía de los procesos adecuados (Szegedi, Deák, & Turcsán, 2018).

Las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS), como MinION (Oxford Nanopore Technologies), permiten el biomonitorio de secuencias de ADN. La HTS en conjunto con la bioinformática facilitan la detección de organismos diana en diferentes tipos de muestras. Las nuevas tecnologías permiten reducir los costos de uso y por lo tanto el reemplazo paulatino del diagnóstico molecular tradicional (Villamor, Ho, Rwahnih, Martin, & Tzanetakis, 2019).

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo General**

Evaluar genes de mantenimiento como controles internos mediante la técnica RT – qPCR y la herramienta bioinformática EDNA – MiFi en *Vitis vinífera* infectadas con *Grapevine red blotch – associated virus* (GRBaV).

### **Objetivo específico**

- Determinar los cebadores óptimos para la detección de genes de mantenimiento mediante RT – qPCR en muestras de tejido de uva *Vitis vinífera* para el uso como controles internos en la extracción de ARN.
- Comparar la presencia de un gen de mantenimiento seleccionado como control interno en *Vitis vinífera* sana versus *Vitis vinífera* infectada con *Grapevine red blotch – associated virus* (GRBaV).
- Verificar la presencia del gen de mantenimiento seleccionado por medio de la herramienta bioinformática EDNA – MiFi.

## Capítulo II: Marco Referencial

### Género *Vitis* spp.

La planta de la vid pertenece a la familia Vitaceae con 12 géneros y 700 diferentes especies, se estima que fue domesticada hace más de 6000 años el cual se extendió por Oriente y Europa como un cultivo de propagación vegetativa (Viana, Resende, & Riaz, 2016). La vid es una planta semileñosa que puede crecer libremente y alcanzar una altura promedio de hasta 17 m sin ningún tipo de cuidado o simplemente quedar reducida a arbusto. Es considerada como uno de los cultivos frutales más populares en el mundo siendo la materia prima para la producción de vino.

*Vitis vinifera*, la especie más extendida a nivel mundial de *Vitis* se propaga por medio de clonación dando como consecuencia la acumulación de virus fitopatógenos que afectan a la calidad de sus frutos. La uva, un fruto rico en antioxidantes, hidratos de carbono, vitamina C y ciertos minerales como potasio, cobre, hierro, calcio, fósforo y magnesio es la materia prima principal para la elaboración de bebidas alcohólicas (Powell, Cooper, & Forneck, 2013).

### Relevancia económica de la viticultura.

La uva se caracteriza por su alto aporte económico, de su producción total el 31% representa la utilidad mundial de fruta fresca, el 67% se destina a la elaboración de bebidas alcohólicas y solamente un 2% se destina al consumo de valor nutricional (Bravo, Salazar, Muro, & Arciniega, 2016). Desde 1970 en Estados Unidos la uva es considerada una fruta de consumo masivo; trimestralmente se adquiere 10 libras por persona (Micheli, y otros, 2018).

Figura 1.

Producción mundial de vino en 2018.



Nota. La ilustración representa los porcentajes de producción mundial de vino en 2018.

Tomado de *Producción mundial de vino 2018*, Revista digital del vino Winetour, (2018)

En el ámbito económico el mercado estadounidense genera un promedio de 3.4 dólares por kilogramo de uva, con un crecimiento anual del 10% en comparación al año 2019 – 2020, los estados como California, Arizona, Washington y Florida son los principales consumidores de vino y además de ello son los estados con mayor producción de uva. *Vitis vinífera* es una de las especies consideradas con mayor superficie de producción en los Estados Unidos con 19 299 acres correspondientes al 39% de la superficie total de frutas orgánicas (Reynolds, 2017).

China, Turquía e Italia son los países de mayor producción de uva, estos tres países representan el 70% de la producción mundial de uva de mesa, siendo China el

país con mayor consumo de uva, casi cerca de los 3.8 millones de toneladas de uva al año.

Los países sudamericanos y del hemisferio sur tales como: Chile, Argentina, Brasil, Sudáfrica y Australia son exportadores importantes hacia los países europeos, como por ejemplo Chile exporta aproximadamente un millón de toneladas de producción anual (Romero, y otros, 2020).

### **Enfermedades de *Vitis Vinífera*.**

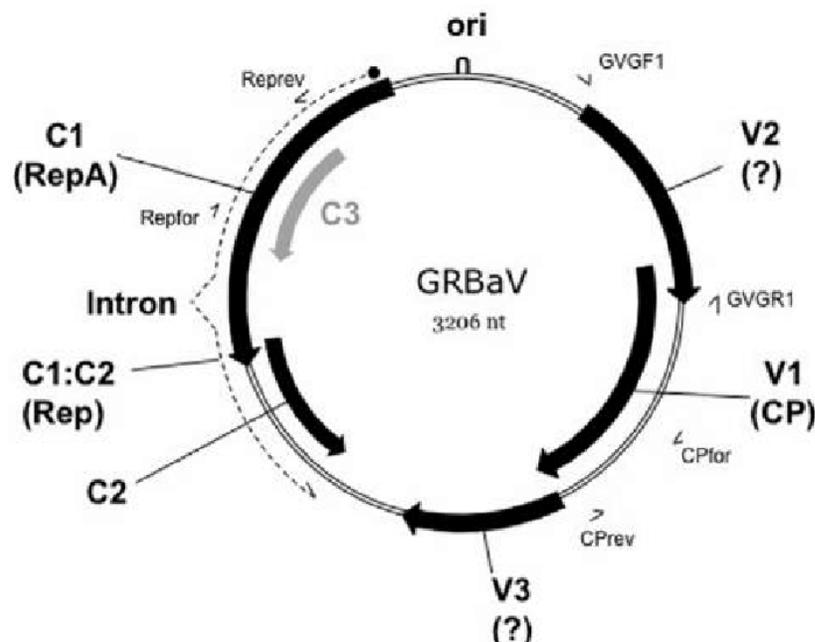
Las plantaciones de uva son consideradas como los cultivos más importantes en las regiones vitícolas de los Estados Unidos. La propagación asexual de la uva la hace propensa a varias enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus. En la actualidad se han logrado identificar alrededor del mundo cerca de 80 distintos virus que afectan a la uva. Estas enfermedades virales pueden causar fuertes pérdidas económicas debido a la reducción del tamaño y el rendimiento de la planta, así como también la disminución de la calidad de la uva relacionado directamente con una alteración bioquímica de la fruta (Girardello, y otros, 2019).

La enfermedad viral ocasionada por el *Grapevine leafroll – associated virus* (GLRaV – 1, GLRaV – 2) causa una disminución del 23% de la producción total de los cultivos de uva, además representa una pérdida del 5% de azúcares totales en la fruta. Por otra parte la enfermedad viral Grapevine fanleaf virus (GFLV) genera una pérdida del 10% de producción total de los cultivos de uva, presentando sintomatología de madera rugosa (Xue & Yi, 2017). La enfermedad Grapevine red blotch disease (GRBD) causada por el GRBaV es el agente responsable de la sintomatología de manchas rojas en los foliares y frutales, los síntomas foliares aparecen en las hojas más viejas, usualmente a inicios de verano, se pueden observar progresivamente y se asemejan a las sintomatologías relacionadas a GLRaV (Naidu, 2017).

## Grapevine red blotch – associated virus (GRBaV).

### Figura 2.

Organización del genoma Grapevine red blotch – associated virus GRBaV.



*Nota.* Genoma circular monocatenario de 3206 nucleótidos pertenecientes al GRBaV. Ilustración tomada de *Grapevine Red Blotch associated virus is Widespread in the United States* por Krenz, Thompson, Mclane, & Fuchs, 2014, *Phytopathology*.

El virus *Grapevine red blotch – associated virus* GRBaV del género *Grablovirus* pertenece a la familia *Geminiviridae*, su genoma consiste en un ADN circular de una sola hebra (ADNcs). Su estructura tiene seis marcos de lectura abiertos (ORF) los cuales codifican en la cadena con sentido de virión (V) y en sentido complementario (C), además de la proteína de recubrimiento (CP), proteína de movimiento (MP), proteína asociada a la replicación (Rep) y la región intergénica corta (Cieniewicz, Perry, & Fuchs, 2017).

Actualmente se ha reportado que GRBaV es transmisible por medio de injertos, en Estados Unidos se encontró que los cultivos infectados con el virus provenían de una

infección por diseminación a través de material de propagación infectado. Así mismo se demostró que el saltamontes de alfalfa de tres esquinas *Spissistilus festinus* es considerado como el vector de transmisión en condiciones de invernadero (Cieniewicz, Perry, & Fuchs, 2017).

### Figura 3.

*Sintomatología y transmisión de GRBaV.*



*Nota.* A) Sintomatología en diferentes variedades de uva; B) *Spissistilus festinus* adulto, un vector confirmado de GRBaV. Ilustración tomada de *Grapevine Red Blotch: Molecular Biology of the Virus and Management of the Disease*, por Cieniewicz, Perry, & Fuchs, 2017, Springer Link.

### Métodos de diagnóstico

Actualmente en fitopatología existen varios métodos de diagnóstico, sin embargo, los análisis de campo permiten dar el primer paso al diagnóstico visual, gracias a la

experiencia del operador se puede suponer diversas enfermedades con el análisis de los síntomas presentados en los cultivos, sin embargo, siempre se tiene un error en la identificación de las enfermedades. Es por ello por lo que se implementa el diagnóstico molecular o inmunoensayos (Naidu, 2017).

### **RT – qPCR**

La reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real RT – qPCR actualmente se ha convertido en el método común para la detección y cuantificación de perfiles de expresión de genes seleccionados. Esta técnica permite el genotipado cuantitativo, detección de polimorfismos y la discriminación alélica; sin embargo, la técnica tiene ciertas desventajas ya que la reacción depende fundamentalmente del uso correcto de los materiales, una calibración correcta de los equipos y una buena calidad de las muestras a procesar (Deepak, y otros).

El apareamiento de esta técnica de transcripción inversa en tiempo real le ha dado un cambio a la metodología de análisis en la expresión génica. Esta técnica permite la recolección de datos a lo largo del proceso de la reacción PCR, combinando así la amplificación y la detección en un solo paso. La técnica utiliza diferentes químicas fluorescentes que correlacionan la concentración del producto de PCR y la intensidad de la fluorescencia que se transmite (Wong & Medrano, 2018).

Las cinética de reacción se caracteriza por identificar un punto en el tiempo o ciclo de PCR en el cual el dispositivo detecta la amplificación de la secuencia objetivo, el valor generalmente se lo denomina como ciclo de umbral o Ct el cual es detectado al momento en que la intensidad es mayor a la fluorescencia de fondo; por tanto las concentraciones más altas permitirán un aumento significativo de la fluorescencia y un valor Ct más bajo (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993).

### **Inmunoensayos**

La técnica inmunológica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) implica la unión de la cubierta externa del patógeno con el anticuerpo específico; estos presentan sitios determinados de unión que identifican una forma molecular; la actividad de acoplamiento del anticuerpo específico es usada para identificar el virus y los agentes patógenos diana (Monis, 2006). La técnica Elisa y la RT-PCR en conjunto forman la IC-RT-PCR (Immune Capture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) la cual permite la identificación de múltiples copias resultados de la PCR en base al fundamento de detección inmunológico. El uso de estos métodos incrementa la sensibilidad y especificidad del diagnóstico. Sin embargo, existen varias diferencias entre las nuevas técnicas y las técnicas de diagnóstico existentes debido a que se requiere un periodo de estudio y validación para ser considerados (Cruzat, Rodrigo; Montes, Carlo, 2009).

### **Genes de mantenimiento**

Los genes de mantenimiento tienen un rol importante en el mantenimiento celular, es por ello por lo que se consideran indispensables para el funcionamiento celular y la sustentación de la vida. Estos genes teóricamente se deberían expresar constantemente en todas las células y en distintas condiciones fisiológicas del organismo. Los genes de mantenimiento aportan a la exposición de la infraestructura celular y a una mejor comprensión de las características genómicas estructurales (Eisenberg & Levanon, 2013).

Los genes de mantenimiento como el 18S rRNA, actina, tubulina y el factor de elongación 1 – Alpha recientemente se han utilizado como controles internos en la detección de enfermedades virales de plantas en diferentes condiciones experimentales y computacionales, además de que su uso puede prevenir falsos positivos con el uso de genes endógenos del hospedero como control de calidad de los procesos experimentales.

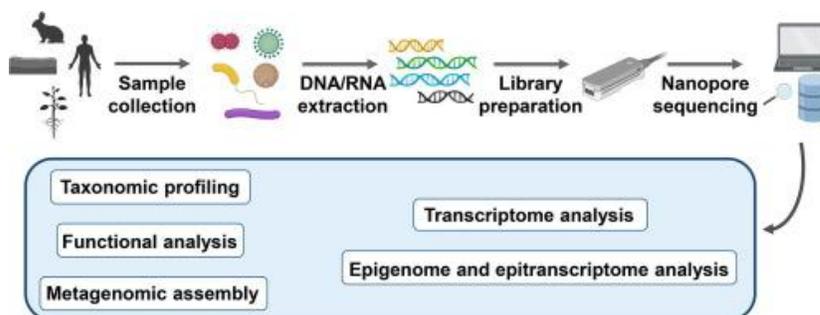
Diversos estudios han destacado las características genómicas y evolutivas de los genes de mantenimiento, además de demostrar que este tipo de genes tienen intrones y exones más cortos (Turcsán, Deák, Oláh, & Szegedi, 2019).

### MinION – Oxford Nanopore Sequencing

La tecnología de secuenciación de tercera generación (TGS) permite la secuenciación en tiempo real, donde los resultados de las lecturas pueden ser analizadas tan pronto como hayan pasado por el secuenciador. Las ventajas de esta tecnología es el aumento de la longitud de lecturas en decenas de miles de bases por lectura dando como resultado una mejor optimización del tiempo de secuencia y la eliminación del sesgo proveniente de la amplificación por PCR (Lu, Giordano, & Ning, 2016).

#### Figura 4.

*Flujo de trabajo secuenciación MinION – Oxford Nanopore Technologies.*



*Nota.* Los enfoques principales de la secuenciación por nanoporos permiten analizar: perfiles taxonómicos, análisis funcional, ensamblaje, análisis de transcriptoma, epigenética y transcriptómica. Ilustración tomada de Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities, por Ciuffreda, Pérez, & Flores, 2021, ScienceDirect.

Los dispositivos de secuenciación Oxford Nanopore utilizan celdas con una serie de orificios colocados en una membrana electro resistente. Los nanoporos corresponden

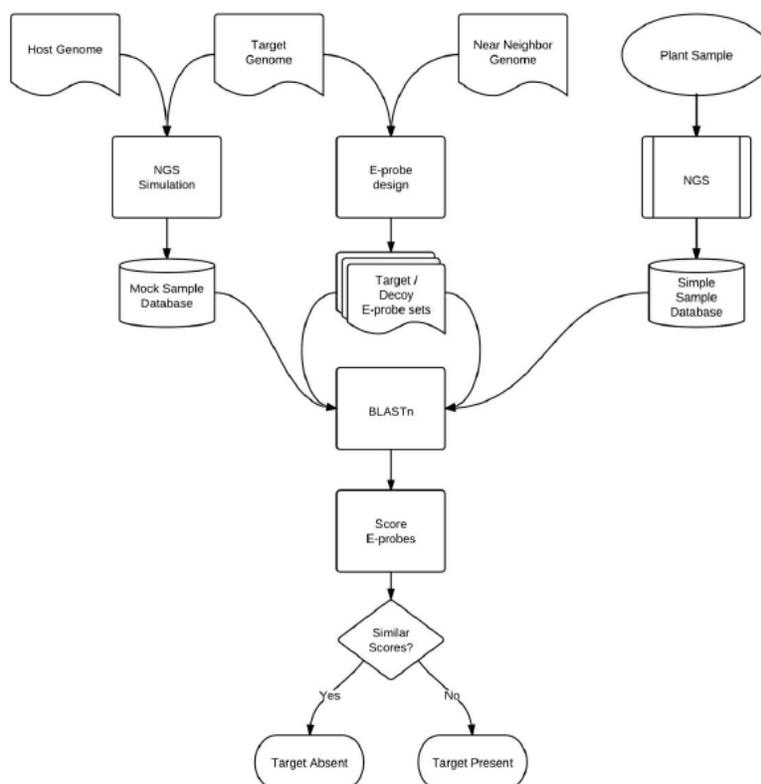
a un único electrodo y un chip sensor los cuales miden una corriente eléctrica que fluye a través de la membrana, la cual puede identificar una molécula y posteriormente codificarlo mediante algoritmos para determinar la secuencia de ADN o ARN en tiempo real (Oxford Nanopore Technologies, 2020).

### **E – probe Diagnostic Nucleic Acid Analysis (EDNA)**

El análisis de ácidos nucleicos por medio de sondas electrónicas hace referencia a la herramienta bioinformática que minimiza e ignora secuencias irrelevantes de secuencias diana específicas. La plataforma EDNA - MiFi evalúa la presencia o ausencia de patógenos de interés mediante pequeñas secuencias únicas llamadas e – probes incorporando una búsqueda de alineamientos BLAST en muestras secuenciadas previamente. El servidor de la plataforma bioinformático es proporcionado por el Institute of biosecurity and microbial forensics de Oklahoma State University (Stobbe, y otros, 2013).

**Figura 5.**

Diagrama de flujo E – probe Detection of Nucleic Acid Analysis (EDNA).



Nota. Ilustración tomada de *E – probe Diagnostic Nucleic Acid Analysis (EDNA): A theoretical approach for handling of next generation sequencing data for diagnostics* por Stobbe, y otros, 2013, Elsevier

### Hipótesis

Los genes de mantenimiento son válidos como controles internos en la detección de *Grapevine red blotch – associated virus (GRBaV)* en *Vitis vinífera*.

### **Capítulo III: Materiales y métodos**

#### **Instituciones participantes**

El presente trabajo de investigación se realizó desde el 19 de marzo de 2021 hasta el 7 de julio de 2021 cumpliendo con el convenio existente entre el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura en la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y el Department of Entomology and Plant Pathology, Institute of Biosecurity and Microbial Forensics (IBMF) en Oklahoma State University.

#### **Colaboradores científicos**

- Francisco J. Flores Flor, PhD. Tutor de tesis.
- Andrés S. Espíndola Camacho, PhD. Profesor asistente de investigación en el IBMF (OSU).
- Carla D. Garzón, PhD. Coordinadora del convenio (UFA – ESPE y OSU).

#### **Área de estudio**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio del Institute of Biosecurity and Microbial Forensics (IBMF) en Oklahoma State University; ubicado en el 130 Henry Bellmon Research Center, Oklahoma – Stillwater, Estados Unidos.

#### **Material biológico**

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron tejidos vegetales de hoja de uva de dos diferentes tipos: tejido vegetal sano proveniente del muestreo realizado el 01 de Julio de 2020 conservado a -80°C y tejido vegetal infectado con GRBaV proveniente de controles positivos proporcionados por el Dr. Marc Fuchs de Cornell University conservados a -80°C desde 2018; Además de ello se utilizaron tejidos vegetales de hoja de rosa con el fin de ser utilizados como controles negativos (Tabla 1).

**Tabla 1.**

*Detalles de material biológico utilizado.*

<b>Muestra</b>	<b>Localización en campo</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Parte del Hospedero</b>	<b>Hospedero</b>
D202025	Fila 1, Planta 5	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	Hojas	<i>Vitis</i> ssp.
D202027	Fila 1, Planta 8	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	Hojas	<i>Vitis</i> ssp.
D202029	Fila 4, Planta 6	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	Hojas	<i>Vitis</i> ssp.
<b>Control</b>	<b>Muestra</b>	<b>Parte del Hospedero</b>	<b>Hospedero</b>		
GRBaV	Grapevine red blotch – associated virus	2 – 13	Hojas y peciolo		<i>Vitis vinifera</i>
	Rosa	1 – 5	Hojas		<i>Rosa Chinensis</i>

*Nota.* El tejido vegetal sano proveniente del muestreo 2020 pertenece al proyecto: “Detección de GLRaV (Grapevine leafroll – associated virus) y GRBaV (Grapevine red blotch – associated virus) mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS)” (Sempertégui, 2021).

### **Extracción total de ARN**

Para la extracción total de ARN se utilizó un máximo de 100 mg de tejido de hoja previamente triturado mecánicamente utilizando nitrógeno líquido en tubos de 1,5 mL, posterior a ello se utilizó el kit Mini RNeasy Plant de la compañía Qiagen. Para la preparación de cada mL de Buffer RLT se adicionó 0,04 g de polivinilpirrolidona (PVP) y

se ajustó el pH a 5,5 con acetato de sodio 0,2M (Gehrig, Winter, Cushman, Borland, & Taybi, 2012).

Mediante el uso del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) se logró cuantificar y analizar la pureza de ARN, el análisis de integridad de ARN se evaluó en gel de agarosa al 1%; en caso de existir bandas pertenecientes a ADN genómico se realizó un paso de limpieza con DNase I. Las muestras de ARN total se almacenaron a – 80°C hasta su posterior uso.

### **Síntesis de ADN complementario de doble cadena (ADNc – dc )**

Para la síntesis de la cadena simple de ADN complementario se utilizó primers TSO (Template Switching Oligo) específico poly – T. Posterior a ello se realizó la reacción enzimática con transcripción inversa y por último se realizó la amplificación de cadenas ADNc – dc en base al protocolo ds – cDNA IBMF – AE1 TASPRT que contiene adaptaciones del protocolo fuente: Protocolo de amplificación y síntesis de ADNc utilizando mezclas enzimáticas RT de cambio de plantilla (NEB #M0466).

Las muestras obtenidas se cuantificaron con el uso del Quantus™ Fluorometer de la compañía Promega usando el kit de cuantificación ONE dsDNA System E4870 y posterior a ello se almacenaron a – 20°C hasta su posterior uso.

### **Selección y validación de cebadores candidatos**

Por medio de una revisión bibliográfica enfocada a la selección de genes de mantenimiento específicos para plantas de uva se logró proponer cinco genes de mantenimiento candidatos. Se propuso dos genes altamente conservados en plantas de uva: AIG1 perteneciente al gen de la proteína de unión a nucleótidos asociada al sistema inmunitario 9 y TCPB perteneciente al gen de la subunidad beta de la proteína 1 del

complejo T. Además de ello se propusieron tres genes de mantenimiento de uso común: Actina, factor de elongación 1 – alfa y tubulina (Tabla 2).

**Tabla 2.**

*Cebadores candidatos provenientes de fuentes bibliográficas.*

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Tamaño [pb]	Tm [°C]	Producto [pb]	Fuente	
VvAIG1	F: GAAGATTATTTGGGCCGTGAG	21	62	108	(González, y otros, 2013)	
	R: CTTCTTGGCTTCATCCTTGGT	21	62			
VvTCPB	F:AGACAGTGATTGACAGCCGAGTT	23	62	238		
	R: ATCCCTGCGTGGCTTTCTTCC	21	63			
VvEF1-alpha	F: CGCCTGTCAATCTTGGTCAGTAT	23	60,6	83		GenBank: CB977561
	R: AATGGCTATGCCCCTGTTCTG	21	52,3			
Vvalpha – Tub	F: CAGCCAGATCTTCACGAGCTT	21	58	119	GenBank: EC930869	
	R: GTTCTCGCGCATTGACCATA	20	60			
VvActin	F: CTTGCATCCCTCAGCACCTT	20	60,3	82	GenBank: EC969944	
	R: TCCTGTGGACAATGGATGGA	20	58,3			

*Nota.* Para la validación de los genes candidatos se corrió una PCR convencional con una temperatura de annealing en gradiente con el fin de calcular la temperatura óptima de cada gen de mantenimiento candidato.

El rango de temperaturas en gradiente se calculó con base en las temperaturas de melting de los genes candidatos, para ello se analizaron muestras de ADNc – dc de tejido sano de *Vitis* spp. desde 52°C – 60°C (Tabla 3).

**Tabla 3.**

*Parámetros de amplificación PCR convencional con gradiente de temperaturas.*

PCR	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Activación enzimática	95°C	45 seg	1
Desnaturalización	98°C	30 seg	
Alineamiento	52°C – 60°C	30 seg	30
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	7 min	1
Conservación	4°C	∞	

### Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real RT – qPCR

Las reacciones de la RT – qPCR se realizaron bajo los parámetros indicados en la Tabla 4 utilizando los cebadores de los genes de mantenimiento candidatos a un volumen de 10µL por cada reacción en tubos de 0.1mL mediante el uso de los reactivos indicados en la Tabla 5.

**Tabla 4.**

*Parámetros de amplificación de RT – qPCR.*

RT – qPCR	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Activación enzimática	50°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	5 min	1
Amplificación	94°C	30 seg	30
	55°C	45 seg	
	72°C	60 seg	
Extensión	72°C	7 min	1
Fusión de alta resolución	Rampa de 60°C a 90°C		
HRM	Aumento por paso de 0.25°C		
	Espera de 90 s antes de llegar a las condiciones de HRM		
	Espera de 2s después de cada paso.		

*Nota.* Cada muestra en la reacción de RT – qPCR fue analizada por triplicado.

**Tabla 5.**

*Reactivos utilizados en la reacción de RT – qPCR.*

Reactivo	Concentración	Volumen - 1X
ADNc – dc	~ 20 – 40 [ng/uL]	2 [µL]
Primer Forward	5 [µM]	1 [µL]
Primer Reverse	5 [µM]	1 [µL]
Agua libre de nucleasas	-	1 [µL]
PowerUp SYBR Green	2X	5 [µL]
Master Mix		
Volumen Total		10 [µL]

### **Evaluación de la expresión de genes de referencia**

Para la selección del gen de mantenimiento con mayor estabilidad de expresión génica se realizó un estudio de expresión mediante el análisis de los valores Ct obtenidos de la RT – qPCR con el uso de la plataforma RefFinder desarrollada por Heart Cure Australia Biotechnology and bioinformatics.

La plataforma utiliza programas computacionales (NormFinder, GeNorm, BestKeeper y el Método comparativo delta Ct). Con NormFinder se evaluó el valor de estabilidad en relación con la variación intragrupo de los genes candidatos (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004). Con GeNorm se definió la estabilidad del gen de referencia a través del análisis por pares (Vandesompele, y otros, 2002). Con BestKeeper se analizó el coeficiente de correlación y la desviación estándar del valor Cp el cual es análogo al valor Ct (Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2005). Método comparativo delta Ct que determinó la expresión génica de las muestras en base a la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Silver, Best, Jiang, & Thein, 2006) y por último se obtuvo ranking final de RefFinder que compara y clasifica los genes de referencia candidatos asignando una ponderación apropiada para cada gen y calcula la media geométrica de sus ponderaciones logrando una clasificación general de expresión génica (Xie, Xiao, Chen, Xu, & Baohong, 2012).

### **E – probe diagnostic nucleic acid analysis (EDNA)**

El diseño de las e – probes o sondas electrónicas se realizó mediante el uso de la plataforma bioinformática MiFi Microbe Finder en la herramienta MiProbe (<https://bioinfo.okstate.edu/login/profile.php>), en la cual se genera pequeños segmentos de la secuencia objetivo. Para el diseño de las sondas electrónicas se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: genoma del organismo objetivo; genoma del organismo más cercano; variabilidad de la sonda electrónica; longitud de sonda electrónica y el mínimo de coincidencias para las sondas electrónicas (Espindola & Cardwell, 2021).

**Tabla 6.**

*Parámetros utilizados para el diseño de e – probes.*

Parámetros	Genes de mantenimiento		
	AIG1	TCPB	AIG1/TCPB
Gen objetivo (número de acceso GenBank)	XM_002281960	XM_002285876	XM_002281960 XM_002285876
Genoma de organismo más cercano (número de acceso GenBank)	GCA_002994745.2 <i>Rosa chinensis</i>	GCA_002994745.2 <i>Rosa chinensis</i>	GCA_002994745.2 <i>Rosa chinensis</i>
Variabilidad	Tamaño variable	Tamaño variable	Tamaño variable
Longitud de sonda electrónica (bp)	20 nt	20 nt	20 nt
Mínimo de coincidencias	15 (default)	15 (default)	15 (default)

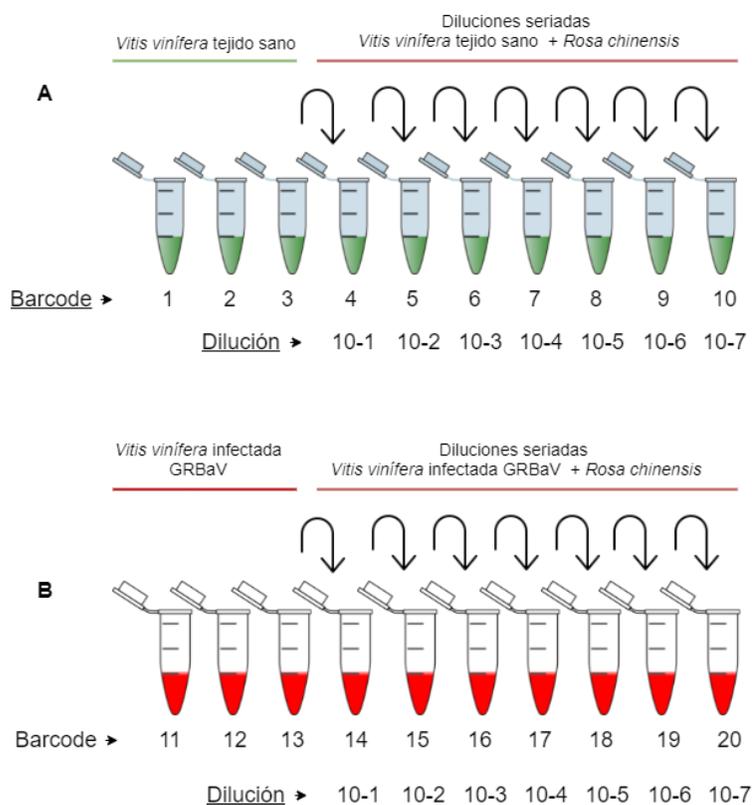
Posterior a la obtención de las e – probes se realizó un Blast – n en la base de datos del NCBI, comprobando que las secuencias obtenidas correspondan al organismo objetivo.

### **HTS MinION – ONT Oxford Nanopore Technologies**

Para realizar la secuenciación en MinION – ONT se utilizó el kit de preparación de librerías Direct cDNA Native Barcoding (SQK – DSC109) con extensiones de barcode EXP – NBD104 y EXP – NBD114. En la Figura 6 se detalla la preparación y detalles de las muestras que fueron cargadas en la placa de flujo.

**Figura 6.**

*Diluciones seriadas de ADNc – dc de Vitis spp. sana y Vitis vinífera infectada con GRBaV.*



*Nota.* Las muestras de tejido sano y tejido infectado con GRBaV fueron diluidas en 5  $\mu$ L de *Rosa chinensis* a 40 ng/  $\mu$ L.

Para cada producto obtenido de la secuenciación se mapearon con el uso del programa bioinformático minimap2 con los genomas objetivo obtenidos del National Center of Biotechnology Information NCBI detallados en la tabla 7.

**Tabla 7.**

*Genomas objetivo-utilizados como referencia para el mapeo de metagenomas mediante minimap2.*

<b>Genoma de referencia</b>	<b>Número de acceso GenBank</b>
<i>Vitis vinífera</i>	GCA_000003745.2
<i>Rosa Chinensis</i>	GCA_002994745.2
Gen de mantenimiento AIG1	XM_002281960
Gen de mantenimiento TCPB	XM_002285876
Gen de mantenimiento AIG1/TCPB	XM_002281960/XM_002285876

### **MiFi – MiDetect**

Para la detección del gen de mantenimiento seleccionado y el patógeno GRBaV en las muestras secuenciadas se utilizó la herramienta MiDetect bajo los siguientes parámetros: e – valor extremadamente sensible (5) valor sugerido para la detección de pequeñas secuencias objetivo y el número mínimo de hits en 250 recomendado para semi cuantificación.

## Capítulo IV: Resultados

### Extracción total de ARN y síntesis de ADNc – dc

La adición de PVP al protocolo establecido en Mini Kit RNeasy Plant permitió obtener 8 muestras de ARN de *Vitis spp.* tejido sano; 6 muestras de ARN de tejido *Vitis vinífera* infectado con GRBaV y 6 muestras de ARN de tejido de *Rosa chinensis*. Las concentraciones y absorbancia 260/280 medidas a través del NanoDrop 2000 se muestran en la tabla 8.

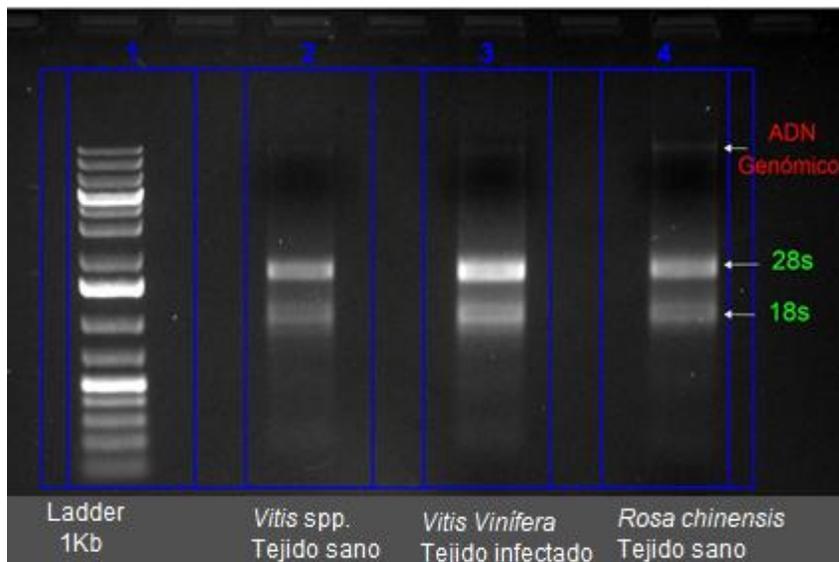
**Tabla 8.**

*Concentraciones y absorbancias obtenidas de la extracción total de ARN.*

Muestra	Etiqueta	Concentración [ng/uL]	Abs 260/280
<i>Vitis spp.</i> Tejido sano	Healthy25	62.8	2.00
	Healthy25.1	75.9	1.98
	Healthy25.2	75.2	1.93
	Healthy25.3	67	1.87
	Healthy27	20.3	1.88
	Healthy27.1	30	1.98
	Healthy29	30	2.00
	Healthy29.1	48.3	1.92
<i>Vitis vinífera</i> tejido infectado con GRBaV	GRBaV.1	96.4	2.00
	GRBaV.2	98	2.00
	GRBaV.3	114.5	2.05
	GRBaV.4	112	1.89
	GRBaV.5	78	1.75
	GRBaV.6	69	1.83
<i>Rosa chinensis</i> tejido sano	Rosa.1	54.7	1.99
	Rosa.2	102.9	2.04
	Rosa.3	107.4	2.03
	Rosa.4	133.5	2.02
	Rosa.5	332.3	1.57
	Rosa.6	241.9	2.09

### Figura 7.

Visualización de integridad ARN total en gel de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X.



*Nota.* Gel de agarosa al 2% que visualiza la integridad de la extracción total de ARN. La variación de PVP en la preparación del buffer RLT permitió obtener las bandas correspondientes a las subunidades 28s y 18s indicadores de una extracción de alta calidad.

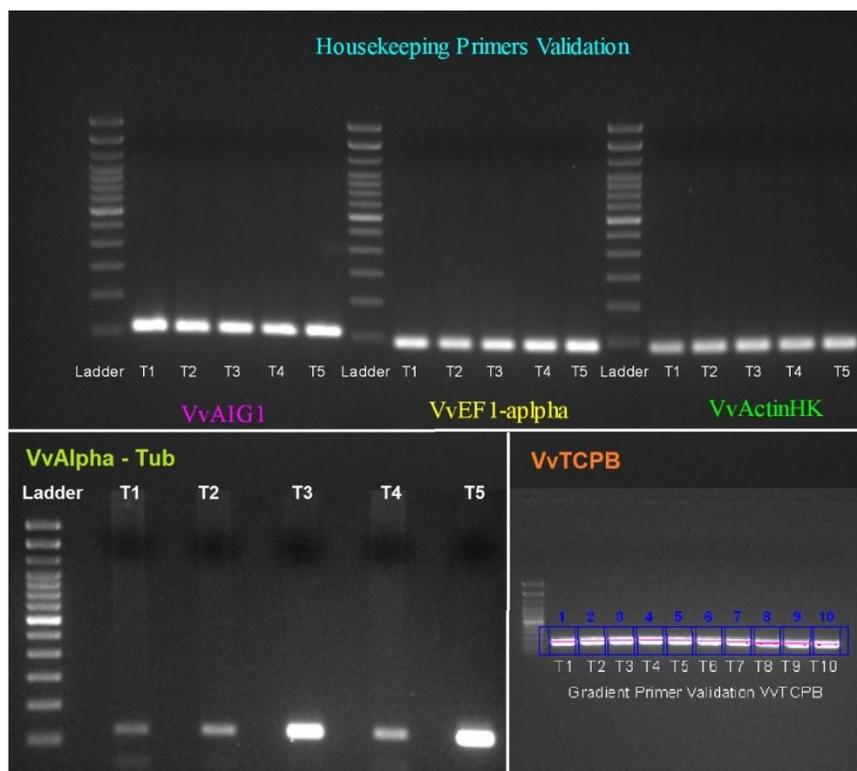
Mediante el uso del protocolo ds – cDNA IBMF – AE1 TASPER que contiene adaptaciones del protocolo fuente: Protocolo de amplificación y síntesis de ADNc utilizando mezclas enzimáticas RT de cambio de plantilla (NEB #M0466) se logró obtener concentraciones de ADNc – dc en tejido de *Vitis* spp. sano [mínima: 30 ng/uL; máxima: 52 ng/uL], tejido de *Vitis vinifera* infectada con GRBaV [mínima: 76 ng/uL; máxima: 122 ng/uL] y en tejido de *Rosa chinensis* sano [mínima: 17 ng/uL; máxima: 52 ng/uL].

## Validación de cebadores candidatos

Mediante la PCR convencional en gradiente de temperatura de los genes de mantenimiento candidatos se logró la visualización en gel de agarosa al 2% de bandas correspondientes a la amplificación de los fragmentos en todas las temperaturas analizadas, es por ello por lo que se tomó como temperatura de alineamiento una temperatura promedio de 55°C la cual se utilizó posteriormente en los parámetros de la RT – qPCR.

### Figura 8.

*Visualización de fragmentos amplificados de PCR convencional en gradiente de temperatura en gel de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X de genes de mantenimiento candidatos.*



*Nota.* Los cinco genes de mantenimiento candidatos amplificaron en el tamaño del fragmento esperado. VvAIG1: 108bp; VvEF1 – alpha: 83 bp; VvActin: 82 bp; VvAlpha – Tub: 119 bp; VvTCPB: 238 bp.

### **RT – qPCR y High resolution melting**

Los resultados obtenidos de la RT – qPCR permitieron analizar las curvas de amplificación tanto para las muestras sanas y muestras infectadas con GRBaV, en la Figura 9 y 10 se puede visualizar: A) Las curvas de amplificación para cada gen de mantenimiento candidato las cuales permitieron obtener los valores Ct los cuales expresan el momento en el que la amplificación cruza la línea de umbral. B) Permite observar la curva de disociación que expresa la disminución de fluorescencia cuando la reacción alcanza el punto de fusión y C) La dinámica de fusión explica el conglomerado de la amplificación y disociación la cual permite observar los picos de amplificación para cada gen de mantenimiento candidato.

Se realizó el análisis de eficacia de la RT – qPCR por medio de la curva estándar que contenía muestras de tejido *Vitis* spp. sano en diluciones seriadas con concentraciones predeterminadas, este análisis demostró que para los genes candidatos todas las reacciones tenían un coeficiente de determinación  $R^2$  muy cercano a uno siendo un indicador de que la RT – qPCR se ajusta a una regresión lineal correcta; además de corroborar de que la eficiencia es óptima para el estudio Tabla 9.

**Tabla 9**

*Análisis de eficiencia RT – qPCR por cada gen de mantenimiento candidato.*

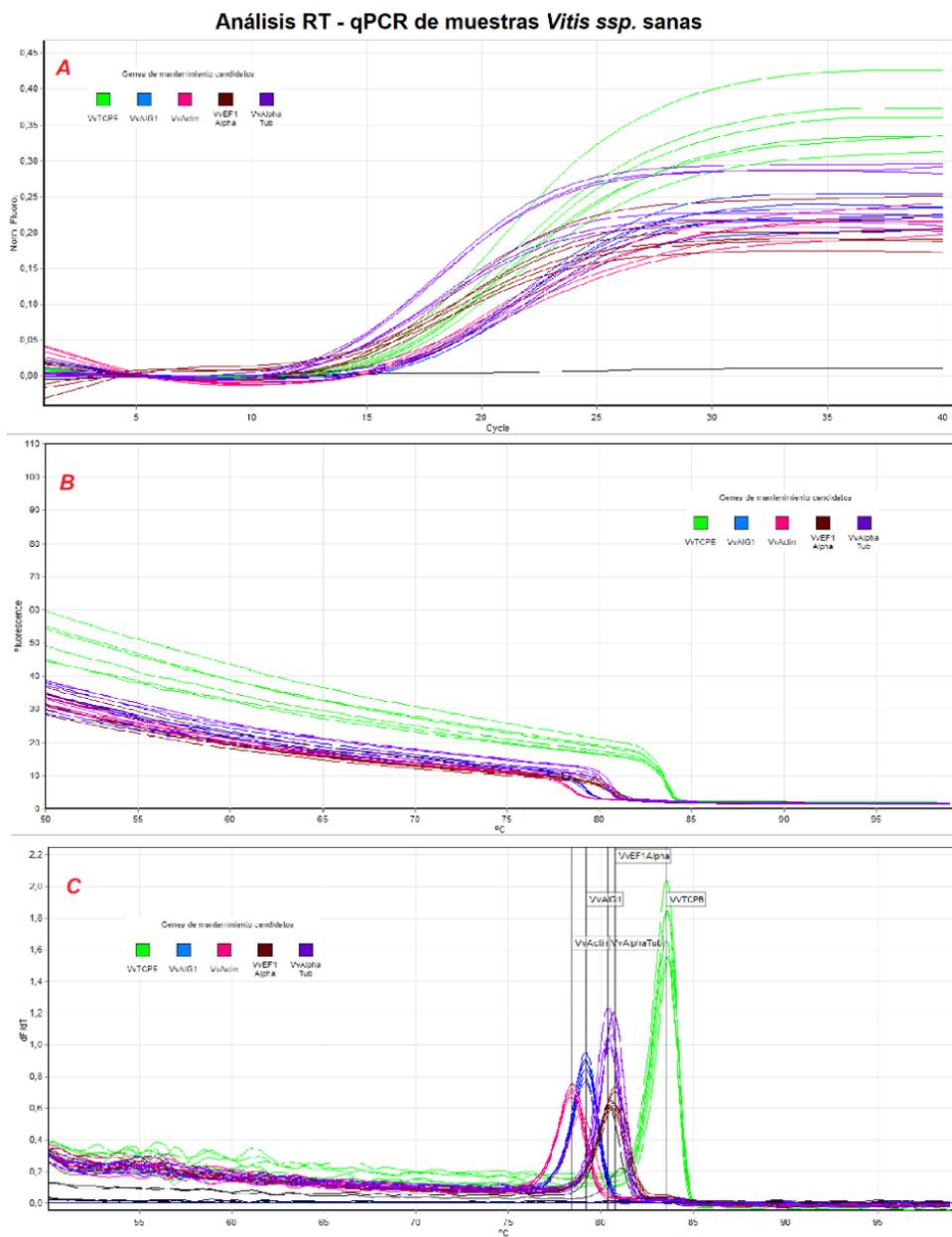
Genes de mantenimiento candidatos.	Datos descriptivos de la curva estándar RT – qPCR				
	R	R <sup>2</sup>	M	B	Eficacia
VvAIG1	0.9325	0.86	-1.797	20.281	2.60
VvTCPB	0.9506	0.90	-2.075	18.207	2.03
VvEF1- alpha	0.9540	0.91	-3.056	12.123	1.12
Vvalpha – Tub	0.9618	0.92	-3.704	16.238	1.12
VvActin	0.9270	0.85	-1.86	21.687	2.45

*Nota.* Los valores aproximados a 1 del coeficiente de determinación R<sup>2</sup> determinan si el ajuste de la curva es el correcto; el valor M hace referencia a pendiente de la curva estándar; B determina el valor de intercepción y por último la eficacia es calculada

mediante la fórmula: Eficacia =  $\left[10^{\left(\frac{1}{M}\right)}\right] - 1$ .

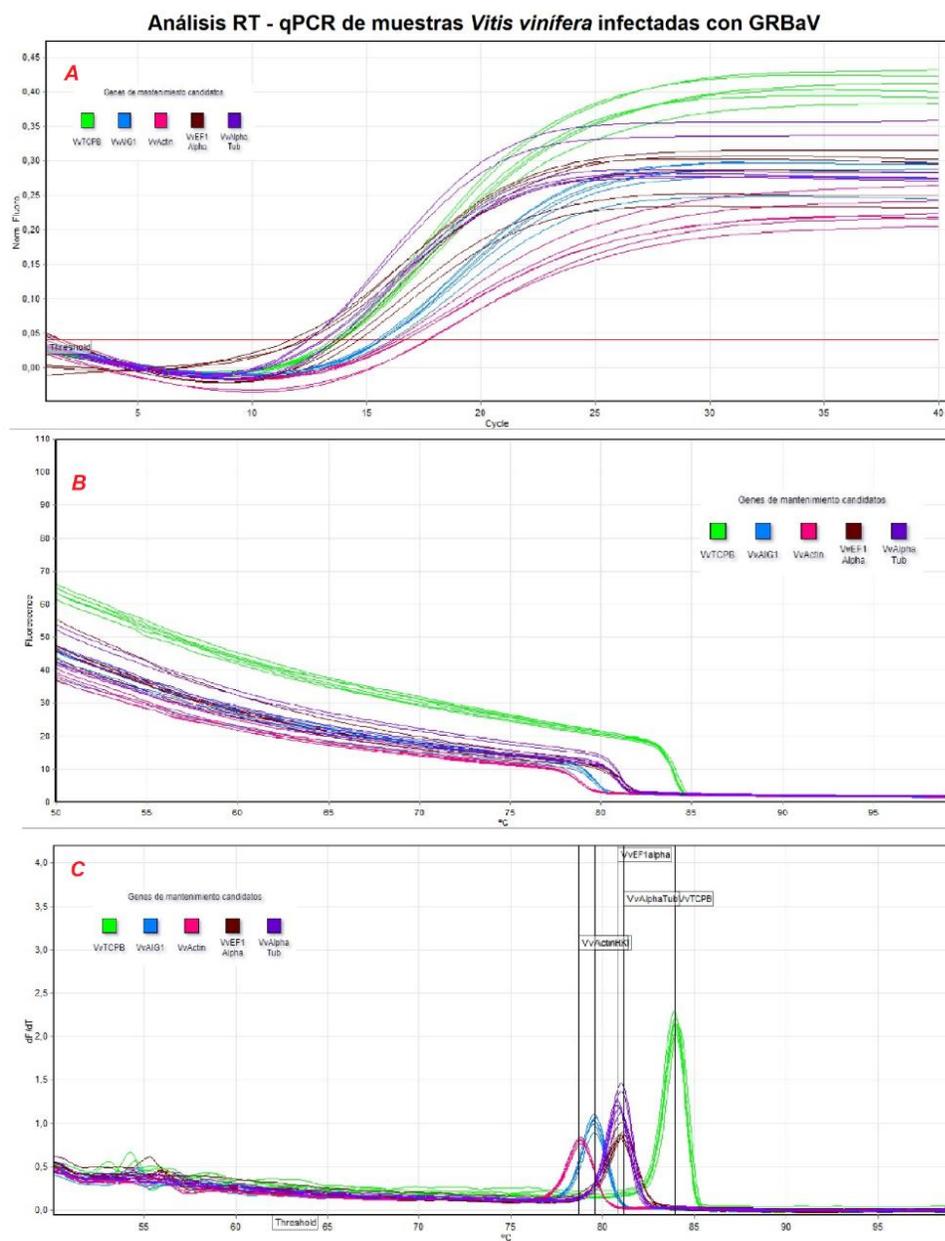
**Figura 9.**

*Amplificación RT – qPCR y HRM de muestras Vitis spp. sanas.*



*Nota.* A) Análisis Ciclos vs Norm. Fluorescencia; B) Análisis T° vs Fluorescencia; C) Análisis T° vs dF/dT.

Figura 10.

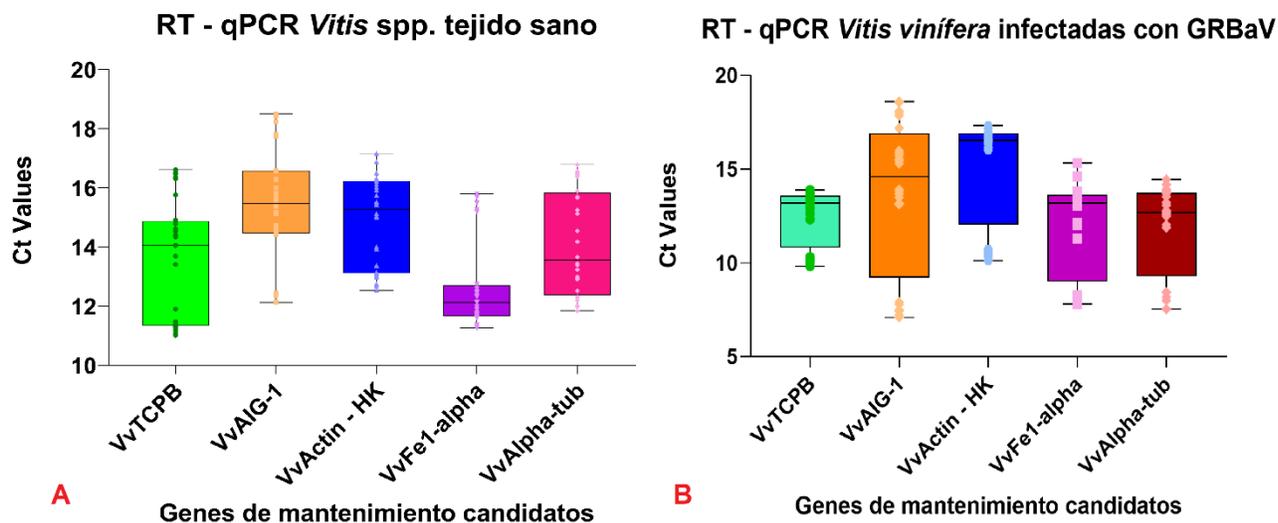
Amplificación RT – qPCR y HRM de muestras *Vitis vinífera* infectadas con GRBaV.

Nota. A) Análisis Ciclos vs Norm. Fluorescencia; B) Análisis T° vs Fluorescencia; C) Análisis T° vs dF/dT.

El análisis de los valores Ct para cada gen de mantenimiento candidato en el diagrama de cajas permitieron conocer la distribución de los valores Ct. La figura 11 resume la variabilidad de expresión génica para cada candidato. La variabilidad en muestras de tejido sano demostró que VvAIG1 y VvEF1 – Alpha son los candidatos que tienen una expresión más estable, mientras tanto la variabilidad de muestras infectadas con GRBaV evidenciaron que VvTCPB es el candidato que tiene un perfil de expresión más estable.

**Figura 11.**

*Visualización de valores Ct en diagrama de cajas.*



*Nota.* Diagrama realizado por Ricardo Tello (2021) en el software GraphPad Prisma 9.

### RefFinder

La evaluación de estabilidad de expresión génica logró estudiar los genes de mantenimiento candidatos en tejido de *Vitis* spp. sano y tejido *Vitis vinífera* infectado con GRBaV. Posterior a determinar la línea de umbral se evaluó cada gen candidato en la plataforma RefFinder la cual clasificó a los cinco genes candidatos de mayor a menor

estabilidad posterior al análisis de cuatro diferentes algoritmos de expresión (BestKeeper, NormFinder, GeNorm y el Método comparativo delta Ct) Tabla 10. La expresión de VvFe1 – Alpha y VvTCPB se clasificó como los genes de mayor estabilidad en muestras de tejido sano, y la expresión de VvTCPB y VvAIG – 1 se clasificó como los genes de mayor estabilidad en muestras de tejido infectado con GRBaV. En general, VvTCPB se considera el gen de mantenimiento más estable en ambos tratamientos, por lo tanto, los candidatos VvTCPB y VvAIG – 1 son los genes de mantenimiento específicos de uva seleccionados para ser utilizados como controles internos Figura 12.

**Tabla 10.**

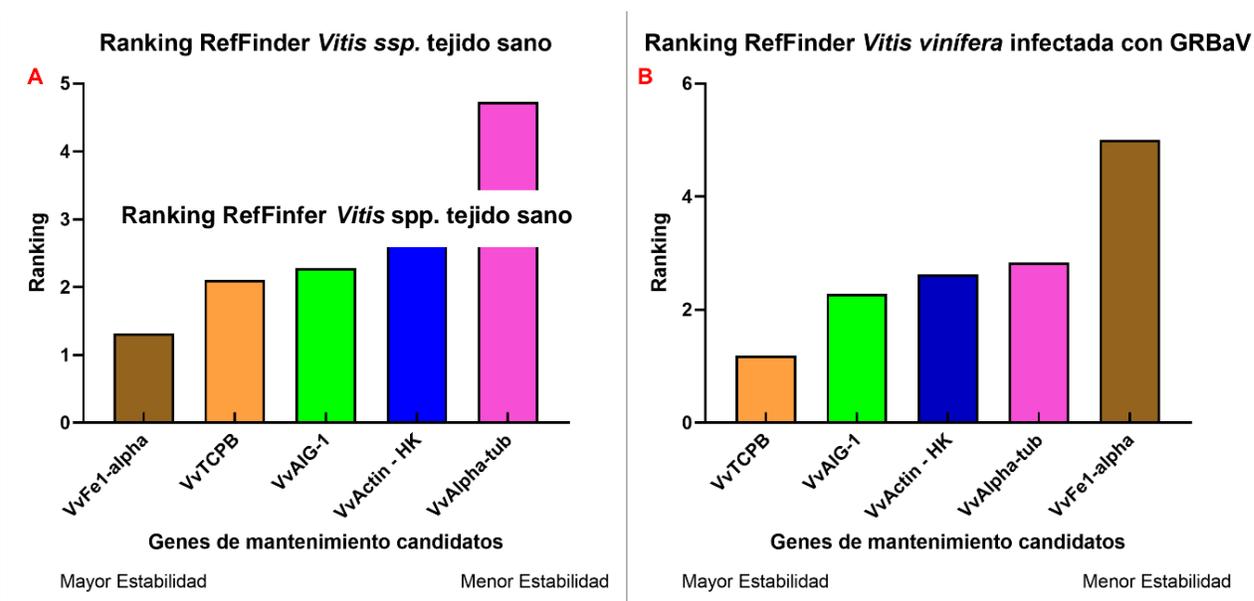
*Evaluación RefFinder de expresión de genes de mantenimiento candidatos en muestras de tejido sano Vitis spp. y tejido Vitis vinífera infectada con GRBaV.*

Método	Ranking tejido sano <i>Vitis</i> spp.				
	1	2	3	4	5
Delta Ct	VvFe1-alpha	VvTCPB	VvAIG-1	VvActin-HK	VvAlpha-Tub
BestKeeper	VvFe1-alpha	VvActin-HK	VvAIG-1	VvAlpha-Tub	VvTCPB
NormFinder	VvFe1-alpha	VvTCPB	VvAIG-1	VvActin-HK	VvAlpha-Tub
GeNorm	VvTCPB VvAIG-1	-	VvFe1-alpha	VvActin-HK	VvAlpha-Tub
Ranking RefFinder	VvFe1-alpha	VvTCPB	VvAIG-1	VvActin-HK	VvAlpha-Tub
Método	Ranking tejido <i>Vitis vinífera</i> infectada con GRBaV.				
	1	2	3	4	5
Delta Ct	VvTCPB	VvActin-HK	VvAIG-1	VvAlpha-Tub	VvFe1-alpha
BestKeeper	VvAlpha-Tub	VvTCPB	VvAIG-1	VvActin-HK	VvFe1-alpha
NormFinder	VvTCPB	VvActin-HK	VvAIG-1	VvAlpha-Tub	VvFe1-alpha
GeNorm	VvAIG-1 VvTCPB	-	VvActin-HK	VvAlpha-Tub	VvFe1-alpha
Ranking RefFinder	VvTCPB	VvAIG-1	VvActin-HK	VvAlpha-Tub	VvFe1-alpha

*Nota.* Los genes candidatos con valores ~ 1 se consideran los genes con mayor estabilidad de expresión génica.

**Figura 12.**

*Estabilidad de expresión de genes de mantenimiento candidatos calculados por RefFinder.*



*Nota.* Diagrama realizado por Ricardo Tello (2021) en el software GraphPad Prisma 9.

### Diseño de E – probes

La plataforma MiProbe generó las sondas electrónicas de 20 nucleótidos de tamaño variable focalizadas para los genes de mantenimiento seleccionados, resultando 68 e – probes para VvAIG – 1; 97 para VvTCPB y 165 para VvAIG1\_VvTCPB.

### Secuenciación MinION – ONT

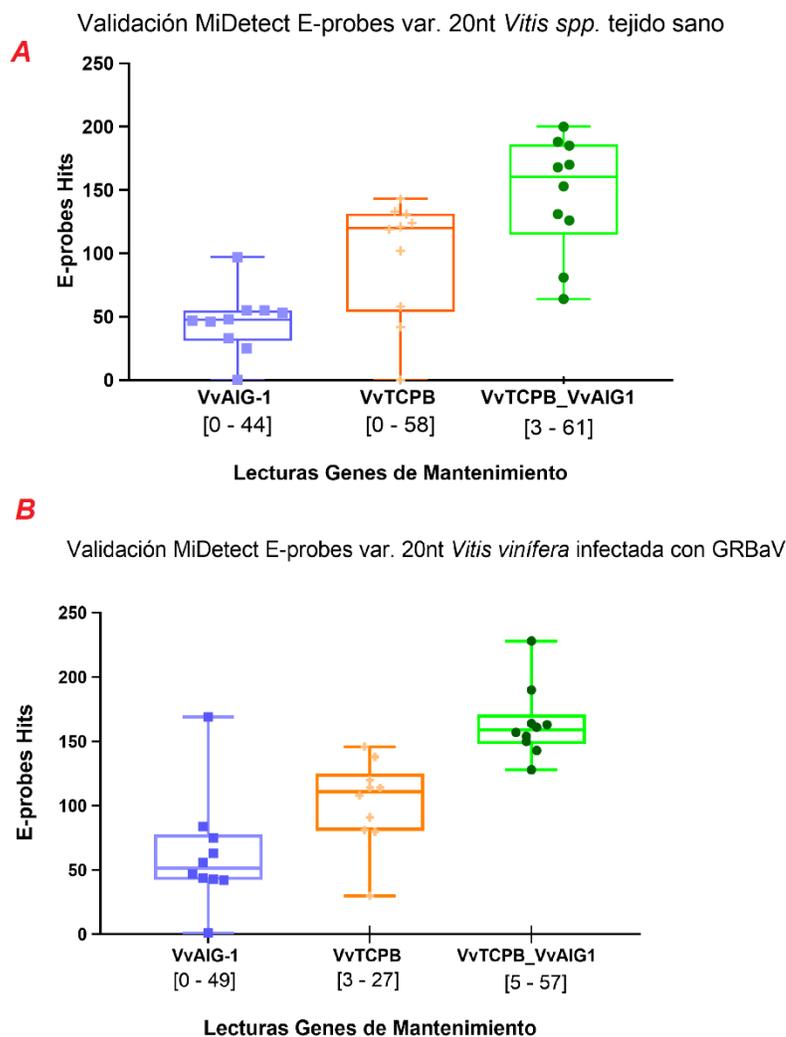
Mediante el uso del kit de librerías Direct cDNA Native Barcoding (SQK – DCS109) y las extensiones de barcode (EXP – ND104; EXP – BD114) se logró la activación de 1201 poros y un aprovechamiento del 67% de poros activados en los primeros 20 minutos de la corrida de secuenciación.

### **MiFi Microbe Finder**

La evaluación de las sondas electrónicas mediante la herramienta MiDetect permitió la detección positiva o negativa de los genes de mantenimiento seleccionados como controles internos en las muestras de *Vitis spp.* tejido sano y *Vitis vinifera* infectadas con GRBaV. La figura 13 muestra la relación entre el número de lecturas por cada gen de mantenimiento y los aciertos o hits de las sondas electrónicas. En cuanto a la detección individual de los genes de mantenimiento VvTCPB y VvAIG – 1 manifiestan una baja selectividad del método ante el analito, designando incluso una detección negativa de los controles internos seleccionados desde la concentración  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  para tejido sano y tejido infectado con GRBaV respectivamente, es por ello que tanto para el tejido sano y el tejido infectado con GRBaV la concatenación de los genes de mantenimiento VvTCPB y VvAIG – 1 permitieron el rango de detección positivo hasta la concentración diluida  $10^{-6}$  en ambos casos de estudio. Además de que la concatenación de VvTCPB y VvAIG – 1 permitió una mejor cobertura de lecturas en las secuencias de análisis.

**Figura 13.**

Diagrama de cajas E – probes hits vs Lecturas Genes de Mantenimiento.



*Nota.* Los diagramas representan la distribución de los aciertos o hits de las sondas electrónicas en el (eje y) vs el número de lecturas por cada gen de mantenimiento propuesto (eje x). A) Validación MiDetect E – probes var. 20nt *Vitis spp.* tejido sano. B) Validación MiDetect E – probes var. 20nt *Vitis vinifera* tejido infectado con GRBaV. Diagrama realizado por Ricardo Tello (2021) en el software GraphPad Prisma 9.

## Capítulo V: Discusión

El cultivo de uvas tiene una de las mejores estimaciones anuales de producción, llegando a representar en América, Asia y Europa una de las fuentes económicas de mayor valor, sin embargo, se debe considerar que las enfermedades causadas por fitopatógenos virales disminuyen la rentabilidad de la industria vitícola. Es necesario implementar pruebas de diagnóstico molecular con el fin de identificar a los agentes causales que disminuyen la rentabilidad de los cultivos de uva. La detección de fitopatógenos aislados a partir de ARN podría significar una de las razones para obtener falsos positivos debida a la alta degradabilidad del ARN. Es por ello que el uso de genes de mantenimiento como controles endógenos permiten estimar y analizar los errores que podrían suceder dentro del diagnóstico de fitopatógenos como GRBaV (Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2005).

La composición química de la planta de uva tiene una alta concentración de compuestos fenólicos, además de compuestos flavonoides, flavonoles, cumarinas, terpenos, etc. El ARN es considerada una molécula de alta degradabilidad y sumado a que los compuestos antes mencionados causan precipitación del ARN, estas características ocasionarían que los protocolos para el aislamiento de ARN no sean los más adecuados, es por ello que la adición de PVP reportada por MacKenzie, McLean, Mukerji, & Green (1997) permitió la obtención de concentraciones promedio de 97.45 [ng/uL] y un valor de pureza promedio de 1.83 ~ 2 por lo tanto se considera a las muestras obtenidas como ARN puro de alta calidad (Thermo Fisher Scientific , 2009).

En la actualidad existen muy pocos estudios sobre el perfil de expresión génica relacionada al diagnóstico molecular a partir de ARN de enfermedades virales como GRBaV en *Vitis vinífera*, es por ello que en el presente estudio se describe el uso de

genes de mantenimiento como controles internos en dos diferentes condiciones: tejido sano y tejido infectado con GRBaV (Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2005).

Mediante la RT – qPCR se evaluó 5 genes candidatos en muestras de ADNc – dc (Tabla 2) de los cuales los genes VvActin, VvFe1 – Alpha y VvAlpha – tub exhibieron niveles de expresión muy inestables ya que sus valores Ct se encontraban muy dispersos. Según Yuan y otros (2014) los genes de mantenimiento de uso común como actina o tubulina no son lo suficientemente confiables para su uso como controles internos. Gonzáles y otros (2013) demostraron que los genes endógenos de uva, VvTCPB y VvAIG – 1, no muestran variaciones significativas de expresión en diferentes estadios de la baya y diferentes tipos de tejido de la planta, confirmando los resultados obtenidos en el presente estudio ya que los genes VvTCPB y VvAIG – 1 muestran una excelente estabilidad de expresión génica en ambas condiciones de estudio. Sin embargo, en este análisis no se tomó en cuenta las variaciones entre genes candidatos, las muestras analizadas y sus repeticiones, es por ello que se realizó un análisis más profundo con el uso de la plataforma RefFinder.

En cuanto al análisis estadístico de expresión génica, estudios previos sugieren que los genes de mantenimiento de uso común deberían tener un comportamiento uniforme en distintas condiciones, sin embargo, lo reportado por Reid y otros (2006) hace referencia al análisis GeNorm en el cual a un conjunto de genes como ciclofilina, Beta – tubulina, EF1 –  $\alpha$  fueron excluidos como genes de referencia debido a que su ponderación se encontraba fuera del rango de estabilidad normal. Los resultados mencionados en este estudio coinciden con nuestro análisis en la plataforma RefFinder ya que los genes de mantenimiento VvFe1 – Alpha, VvActinHK y VvAlpha – Tub recibieron una ponderación final de 5, 2.63 y 2.83 en tejido infectado con GRBaV, mientras que en el tejido sano recibieron una ponderación de 1.32, 3.36 y 4.73, estos resultados permiten excluir a estos

genes candidatos ya que mientras su ponderación se aleja del 1 se consideran genes muy inestables (Otto, y otros, 2020).

Los genes de mantenimiento específicos de uva VvTCPB y VvAIG – 1 presentaron una ponderación RefFinder de 1.19 y 2.28 en tejido infectado con GRBaV, 2.11 y 2.28 en tejido sano, estos valores representan en el estudio grupal el ranking mas cercano a uno, convirtiéndolos en los genes de mantenimiento con un perfil de expresión más estable en las condiciones estudiadas coincidiendo con el estudio antes mencionado de Gonzáles y otros (2013). Sin embargo se debe tomar en cuenta que Hellemans y otros (2007) recomiendan optar por el uso de dos genes de referencia establecidos por GeNorm ya que esto brinda mayor fiabilidad a la detección de genes de mantenimiento y a los fitopatógenos de interés, es por ello que la concatenación de VvTCPB y VvAIG – 1 se tomó en cuenta para el mapeo y la evaluación de los genes de mantenimiento seleccionados en la plataforma MiDetect.

El uso del algoritmo minimap2 para el mapeo de las secuencias de los genes VvTCPB de 2125 pb y VvAIG – 1 de 1423 pb no logró una óptima cantidad de lecturas en ambos tratamientos, en el tejido sano se logró mapear un máximo de 44, 58 y 61 lecturas de VvAIG – 1, VvTCPB y VvTCPB\_VvAIG – 1 en las muestras más concentradas, mientras que en el tejido infectado con GRBaV se logró mapear un máximo de 27, 49 y 57 lecturas de VvTCPB, VvAIG – 1 y VvTCPB\_VvAIG – 1 en las muestras más concentradas. Estos resultados pueden haberse debido a que la secuenciación por MinION, aun cuando permite secuenciar lecturas ultra largas de hasta 2 mega bases, no genera muchas lecturas para un solo fragmento de ADN (Krehenwinkel , Pomerantz, & Prost, 2019).

En el presente estudio se utilizó TSO poly (T) como cebadores con adaptaciones en el extremo 3' para la síntesis de ADNc – dc los cuales pretenden generar copias enteras del ADNc – dc (Turchinovich, y otros, 2014). Estos cebadores permitieron que las muestras analizadas sean sensibles a la detección en la RT – qPCR (Figura 9 y 10). Sin embargo, el uso de primers inespecíficos pudo haber influido en la calidad de las muestras secuenciadas, afectando la detección de VvTCPB y VvAIG – 1 en la plataforma MiDetect. La técnica Target Specific Reverse Transcript (TASPERT) pool descrita por Espindola y otros (2021) sugiere el uso de cebadores inversos específicos para los genes de interés los cuales enriquecen el número de lecturas mapeadas, aumentan la profundidad de la secuenciación y optimizan el límite de detección (LoD) del diagnóstico de fitopatógenos como GRBaV y los controles internos seleccionados bajo la plataforma MiDetect.

## Capítulo VI: Conclusiones

1. Los valores Ct de dos genes endógenos específicos de uva y de tres genes de mantenimiento de uso común permitieron determinar que los genes candidatos específicos de la uva VvAIG – 1 y VvTCPB fueron los de expresión génica más estable.
2. A través de la plataforma RefFinder se logró determinar que los genes de mantenimiento específicos de uva VvTCPB y VvAIG - 1 son óptimos para el uso como controles internos debido a que demuestran una expresión más estable en comparación a los otros genes candidatos.
3. Se comparó la presencia de los genes de mantenimiento seleccionados con el uso del algoritmo minimap2 el cual abordó el mapeo de las secuencias de los genes VvTCPB, VvAIG – 1 y la concatenación de VvTCPB\_VvAIG – 1 en diluciones seriadas de tejido sano y tejido infectado con GRBaV, concluyendo que la cobertura de mapeo de VvTCPB\_VvAIG – 1 es mayor en comparación a las lecturas obtenidas de los genes individuales VvTCPB y VvAIG – 1.
4. Se verificó la presencia positiva de los genes de mantenimiento seleccionados, VvTPB y VvAIG – 1, con la herramienta MiDetect hasta la dilución  $10^{-6}$  tanto en tejido sano de *Vitis* spp. y tejido de *Vitis vinífera* infectado con GRBaV mediante el uso de las sondas electrónicas de 20 nucleótidos de tamaño variable obtenidas de la concatenación de los genes VvTCPB\_VvAIG – 1 en la herramienta MiProbe de la plataforma bioinformática EDNA - MiFi: Microbe Finder.

## Capítulo VII: Recomendaciones

1. Se recomienda evaluar más de diez genes de mantenimiento específicos de uva los cuales le darían mayor robustez al análisis de perfiles de expresión génica en diferentes condiciones sintomatológicas de las plantas de uva infectadas con distintos fitopatógenos.
2. Se recomienda utilizar la técnica TASPRT con cebadores específicos para los genes de mantenimiento seleccionados y conjuntamente los cebadores específicos para los fitopatógenos de interés para aumentar la especificidad de la retro transcripción y la síntesis del ADNc.
3. Validar el límite de detección (LoD) de los genes de mantenimiento seleccionados como controles internos para corroborar que el límite de detección (LoD) del diagnóstico de virus de uva sea correctamente normalizado.
4. Se recomienda implementar un nuevo algoritmo de mapeo de secuencias con un porcentaje de identidad del 99% para poder determinar que las lecturas de las secuencias sean lo más específicas posible a la secuencia de interés.
5. Fortalecer los vínculos entre la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y el Institute of Biosecurity and Microbial Forensics IBMF de Oklahoma State University para que exista una mayor cantidad de estudiantes participando en los proyectos de investigación permitiendo el fortalecimiento de los conocimientos adquiridos en las aulas.

## Capítulo VIII: Bibliografía

Andersen, C., Jensen, J., & Ørntoft, T. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*.

Bravo, M. B., Salazar, J. G., Muro, L. R., & Arciniega, S. (2016). Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*Vitis vinifera*) para mesa e industria en Aguascalientes, México. *Scielo*.

Cieniewicz, E., Perry, K., & Fuchs, M. (2017). Mancha roja de la vid: biología molecular del virus y manejo de la enfermedad. En B. Meng, G. Martelli, D. Golino, & M. Fuchs, *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer.

Ciuffreda, L., Pérez, H. R., & Flores, C. (2021). Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *ScienceDirect*.

Deepak, A., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., . . . Agrawal, G. (s.f.). Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *2007*.

Eisenberg, E., & Levanon, E. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*.

Espindola , A., Sempertegui , D., Bravo, D., Freire, V., Ochoa - Corona, F., & Cardwell, K. F. (2021). TASPERT: Target-Specific Reverse Transcript Pools to Improve HTS Plant Virus Diagnostics. *Viruses MDPI*.

- Espindola, A. S., & Cardwell, K. F. (2021). Microbe Finder (MiFi®): Implementation of an Interactive Pathogen Detection Tool in Metagenomic Sequence Data. *Plants*.
- Gehrig, H. H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A., & Taybi, T. (2012). An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Springer Link*, 5.
- Girardello, R., Cooper, M., Smith, R., Lerno, L., Bruce, R., Eridon, S., & Oberholster, A. (2019). Impact of Grapevine Red Blotch Disease on Grape Composition of *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon, Merlot, and Chardonnay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- González, M., García, M., Genova, A. D., Correa, J., Maass, A., Orellana, A., & Hinrichsen, P. (2013). Identification of two putative reference genes from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. *BMC Genomics*, 8 - 9 .
- Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, 4.
- Krehenwinkel, H., Pomerantz, A., & Prost, S. (2019). Genetic Biomonitoring and Biodiversity Assessment Using Portable Sequencing Technologies: Current Uses and Future Directions. *Genes*.
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *ScienceDirect*.

- Mackenzie, D., McLean, M., Mukerji, S., & Green, M. (1997). Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Spotlight on Diagnosis*, 3.
- Meng, B., Martelli, P. G., Golino, D., & Fuchs, M. (2017). Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. *Springer*.
- Micheli, L., Mattoli, L., Maidecchi, A., Pacini, A., Ghelardini, C., & Mannelli, L. (2018). Effect of Vitis vinifera hydroalcoholic extract against oxaliplatin neurotoxicity: in vitro and in vivo evidence. *Scientific Reports*.
- Naidu, R. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 1. En B. Meng, G. Martelli, D. Golino, & M. Fuchs, *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*.
- Olufemi, A. J., Casassa, F. L., Gutha, L. R., Larsen, R. C., Henick-Kling, T., Harbertson, J. F., & Naidu, R. A. (2016). Impacts of Grapevine Leafroll Disease on Fruit Yield and Grape and Wine Chemistry in a Wine Grape (Vitis vinifera L.) Cultivar. *Plos One*, 2-3.
- Otto, E., Kohli, P., Appelt, J., Menzel, S., Fuchs, M., Bahn, A., . . . Jahn, D. (2020). Validation of reference genes for expression analysis in a murine trauma model combining traumatic brain injury and femoral fracture. *Scientific Reports Nature Research*.
- Oxford Nanopore Technologies. (2020). *How nanopore sequencing works*. Obtenido de <https://nanoporetech.com/how-nanopore-sequencing-works>

- Panina, Y., Germond, A., Masui, S., & Watanabe, T. M. (2018). Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for qPCR Gene Expression Analysis During iPS Reprogramming Process. *Scientific reports*, 2,3.
- Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. (2005). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 4.
- Powell, K. S., Cooper, P. D., & Forneck, A. (2013). Chapter Four - The Biology, Physiology and Host–Plant Interactions of Grape Phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*. *ELSEVIER*.
- Pulgar, S. L., & Casanova, G. (2019). *Resultados y lecciones Plataforma para detección múltiple de virus en vides : Proyecto de innovación en Región Metropolitana*. Chile: Ministerio de Agricultura de Chile.
- Reid, K., Olsson, N., Schollosser, J., Peng, F., & Lund, S. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*.
- Reynolds, A. G. (2017). The Grapevine, Viticulture, and Winemaking: A Brief Introduction. *SpringerLink*.
- Ricketts, K. D., Gómez, M. I., & Fuchs, M. F. (2017). Mitigating the Economic Impact of Grapevine Red Blotch: Optimizing Disease Management Strategies in U.S. Vineyards. *American Society for Enology and Viticulture*.
- Romero, I., Hernandez, M., Gaitan, I., Escribano, M., Merodio, C., & Ballesta, M. S. (2020). Table Grapes during Postharvest Storage: A Review of the Mechanisms

Implicated in the Beneficial Effects of Treatments Applied for Quality Retention.  
*International Journal of Molecular Sciences.*

Sempertégui, D. J. (2021). *Detección de GLRaV (Grapevine leafroll-associated virus) y GRBaV (Grapevine red blotch-associated virus) mediante Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS)*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*.

Stobbe, A., Daniels, J., Espindola, A., Verma, R., Melcher, U., Ochoa-Corona, F., . . . Fletcher, W. (2013). E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA): A theoretical approach for handling of next generation sequencing data for diagnostics. *Elsevier*.

Szegedi, E., Deák, T., & Turcsán, M. (2018). Evaluation of intron containing potential reference gene-specific primers to validate grapevine nucleic acid samples prepared for conventional PCR and RT-PCR. *Journal of grapevine research*, 4.

Thermo Fisher Scientific . (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer.

Turchinovich, A., Surowy, H., Serva, A., Zapatka, M., Lichter, P., & Burwinkel, B. (2014). Capture and Amplification by Tailing and Switching (CATS) An ultrasensitive ligation-independent method for generation of DNA libraries for deep sequencing from picogram amounts of DNA and RNA. *RNA Biology*.

Turcsán, M., Deák, T., Oláh, R., & Szegedi, E. (2019). Intron-containing Housekeeping Genes as Useful Tools in Grapevine Virus Detection by PCR-based Protocols. *Research Journal of Plant Pathology*.

- Ugaglia, A. A., Cardebat, J. M., & Corsi, A. (2019). *The Palgrave Handbook of Wine Industry Economics*. Turin, Italia: Palgrave Macmillan.
- Vandesompele, J., Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N., Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*.
- Viana, A. P., Resende, M. D., & Riaz, S. (2016). Genome selection in fruit breeding: application to table grapes. *SciELO Brasil*.
- Villamor, V., Ho, T., Rwahnih, A., Martin, R., & Tzanetakis, E. (2019). High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *APS publications*, 7.
- Vinetur. (2018). *Vinetur*. Obtenido de La producción mundial de vino alcanza los 27900 millones de litros en 2018, un 13% más:  
<https://www.vinetur.com/2018112148793>
- Wallace, S. E. (2016). *DETECTION AND DIAGNOSIS OF RED LEAF DISEASES OF GRAPES (VITIS SPP)*. Obtenido de  
[https://shareok.org/bitstream/handle/11244/317688/Wallace\\_okstate\\_0664M\\_15922.pdf?](https://shareok.org/bitstream/handle/11244/317688/Wallace_okstate_0664M_15922.pdf?)
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2018). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Future Science*.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Baohong, Z. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *SpringerLink*.
- Xue, M., & Yi, H. (2017). La inducción de la resistencia a las enfermedades proporciona una nueva perspectiva sobre la conservación del dióxido de azufre en *Vitis vinifera* L. *Elsevier*.

Yuan, X., Jiang, S.-H., Wang, M., Ma, J., Zhang, X., & Cui, B. (2014). Evaluation of Internal Control for Gene Expression in Phalaenopsis by Quantitative Real-Time PCR. *SpringerLink*, 5.

