



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Detección de GLRaV (*Grapevine leafroll-associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) mediante Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS)

Sempértégui Bayas, Daniela Johanna

Departamento de Ciencia de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería En Biotecnología

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

Ing. Flores Flor, Francisco Javier PhD.

8 de marzo del 2021



Document Information

Analyzed document ParaUrkund_DSempertegui.txt (D97495589)
Submitted 3/7/2021 5:39:00 PM
Submitted by
Submitter email fjflores2@espe.edu.ec
Similarity 0%
Analysis address fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28686140/>
Fetched: 3/7/2021 5:39:00 PM





DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Detección de GLRaV (*Grapevine leafroll-associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) mediante Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS)**” fue realizado por la señorita **Sempértegui Bayas, Daniela Johanna** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad 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, 08 de marzo del 2021

Firma:



Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.
C. C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Sempértégui Bayas, Daniela Johanna**, con cédula de ciudadanía n° 1721776894, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Detección de GLRaV (*Grapevine leafroll-associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) mediante Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS)”** 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.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 08 de marzo del 2021

Firma:

Sempértégui Bayas, Daniela Johanna

C.C.: 1721776894



DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Sempértegui Bayas, Daniela Johanna** con cédula de ciudadanía n°1721776894, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Detección de GLRaV (*Grapevine leafroll-associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) mediante Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS)**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 08 de marzo del 2021

Firma:

Sempértegui Bayas, Daniela Johanna

C.C.: 1721776894

Dedicatoria

A Dios,

pilar fundamental de nuestro caminar.

A mis padres, Luz y Jhon,

porque han estado en cada momento de mi vida dándome fuerza para nunca

desfallecer.

A mi hermana, Ana María,

por ser mi amiga que ha sabido apoyarme emocionalmente durante todo este tiempo.

A mis abuelitas Mami Maruja y Mami Anita,

por ser mis compañeras y por siempre estar ahí para defenderme y darme todo su

cariño.

A mi novio Erik,

Por ser mi compañero y amigo en este camino.

Daniela Johanna Sempértegui Bayas

Agradecimientos

Agradezco a mi tutor de tesis, al Ing. Francisco Flores, PhD. por su tiempo, guía y confianza en mi trabajo. Porque con su experiencia amplió mis horizontes.

A MSc. Alma Koch, por ser una gran profesora y amiga, que hizo florecer mi amor por la ciencia.

Al Department of Entomology and Plant Pathology y Institute of Biosecurity and Microbial Forensics (IBMF) de Oklahoma State University (OSU), por abrirme las puertas y mostrarme un mundo lleno de oportunidades. A Carla Garzón, PhD. por su guía y preocupación.

A Ing. Andrés Espíndola PhD. por creer en mí, darme la oportunidad de participar en sus investigaciones, siempre estar pendiente de mí y dispuesto a escucharme.

A Ing. Lizbeth Peña PhD., por su apoyo su cariño, sabiduría, confianza y una mano amiga.

A mis amigos de IBMF en especial Nicolás, Will, Andrea y Ishtar por brindarme todo su apoyo, ayuda profesional y personal.

Al Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a todos los docentes que forman de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por brindarme toda su paciencia y enseñanzas.

A Marbel Torres PhD. y Ligia Ayala PhD. por ayudarme a desarrollar mis habilidades en el laboratorio, brindarme su experiencia y sabiduría.

A mis padres por siempre ser mi ejemplo, confiar y creer en mí, por sus valores y principios que me inculcaron desde muy niña y por haberme dado mi mejor herencia mi educación.

A mi hermana; Ana María; agradecerle por ser la fuerte, la que me cuida, ser la

persona que más se emociona por mis logros. Gracias por cada momento que hemos vivido y por confiar en mí.

A mi cuñado; Edgar; por apoyarme e impulsarme a luchar por mis metas y objetivos.

A mi sobrina, la luz de mis ojos por sacarme una sonrisa y llenar mi vida de colores.

A Erik Cruz, por abrazar mis inseguridades y ser mi apoyo en varias etapas de mi vida, mostrando un amor sincero, incondicional y protector; que me ha alegrado mi vida y ha llenado cada pedacito vacío que tenía en mi corazón.

A Camila por su ayuda y guía para mejorar mis destrezas de escritura, le agradezco por su paciencia y noches de trabajo juntas.

A mis amigos Saraí, Alejandro, Renato, Michelle Marcela y Lizbeth; por darse el tiempo de conocerme y comprenderme, acompañarme en mis logros y fracasos, celebrar mis alegrías, darme fuerza en mi dolor y sobre todo por no juzgarme por mis errores y defectos.

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 Tabla.....	12
Listado de Figura.....	14
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Formulación del problema.....	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos de la investigación.....	20
Capítulo II: Marco Referencial	21
<i>Vitis vinífera</i>	21
Enfermedades de <i>Vitis vinifera</i>	22
GLRaV (<i>Grapevine leafroll associated virus</i>).....	22
GRBaV (<i>Grapevine red blotch-associated virus</i>).....	26
Pruebas de diagnóstico.....	28

Prueba de referencia: Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR)	29
Pruebas de Diagnóstico Para Probar	30
Secuenciación con MinION-ONT	30
E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA).....	31
Hipótesis.....	32
Capítulo III: Materiales y métodos	33
Instituciones participantes.....	33
Colaboradores científicos.....	33
Área de Estudio	33
Material biológico.....	33
Extracción total de ARN.....	35
Estandarización de la síntesis de ADNc-dc.....	35
Generación de controles positivo in silico.....	36
Controles Positivos <i>in vitro</i>	37
Pruebas de diagnóstico.....	40
Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR).....	41
E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA).....	43
HTS.....	45
Validación de pruebas de diagnóstico.....	46
Capítulo IV: Resultados.....	49

Extracción total de ARN	49
Estandarización de la síntesis de ADNc-dc.....	50
Controles Positivos <i>In silico</i>	52
Controles Positivos <i>In vitro</i>	54
Secuenciación con MinION-ONT	56
Validación de HTS con q-PCR y EDNA	56
Capítulo V: Discusión	60
Capítulo VI: Conclusiones	64
Capítulo VII: Recomendaciones	66
Capítulo VIII: Bibliografía	67

Listado de Tabla

Tabla 1 Lista de Cepas de GLRaV-4 identificadas. La longitud del genoma y donde se lo reportaron.....	24
Tabla 2 Controles positivos de virus de uva, obtenidos de Cornell University en Nueva York.....	34
Tabla 3 Localización de muestras de uva sanas e infectadas el 01 de julio del 2020	34
Tabla 4 Modificaciones de procedimiento con Direct cDNA Native Barcoding (ANEXO 3)	39
Tabla 5 Detalles observados en las pruebas diagnósticas: propósito de la prueba, objetivo y criterio de resultados de las tres pruebas de diagnóstico evaluadas.....	40
Tabla 6 Detalle de los primers utilizados en la q-PCR de los virus GLRaV-4, GLRaV-3 y GRBV	41
Tabla 7 Detalle de las reacciones de q-PCR para GLRaV-4, GLRaV-3 y GRBaV	42
Tabla 8 Parámetros de amplificación de q-PCR para los virus GLRaV-4, GLRaV-3 y GRBaV	43
Tabla 9 Parámetros de elaboración de e-probes	44
Tabla 10 Genomas de Referencias que se utilizaron para el mapeo de metagenomas en el programa minimap2.....	46
Tabla 11 Genomas de Referencias que se utilizaron para el mapeo de metagenomas en el programa minimap2.....	48
Tabla 12 ANOVA de dos vías para la interacción que existe entre controles positivos x primers, primers, controles positivos del TRSV y replicas [%virus] después de 72h de corrida en MinION-ONT.....	51
Tabla 13 Controles positivo In silico de los virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GRBaV ...	53

Tabla 14 Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GLRaV-4(4).....	57
Tabla 15 Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GLRaV-4(6).....	57
Tabla 16 Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GLRaV-3.....	58
Tabla 17 Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GRBaV.....	59

Listado de Figura

Figura 1 Áreas vitícolas y con sus zonas de producción en todo el mundo.	21
Figura 2 Árbol filogenético realizada por genes completos HSP70h de la Familia <i>Closteroviridae</i>	23
Figura 3 Esquema de la estructura del genoma de los miembros del género <i>Ampelovirus</i>	26
Figura 4 Genoma circular monocatenario de los miembros del género <i>Grablovirus</i>	27
Figura 5 Tabla 2x2 para obtener DSp y DSe, VPP, VPN y P.	28
Figura 6 Esquema de la reacción de dos variantes de q-PCR.....	29
Figura 7 Dispositivo de Secuenciación MinION-ONT y sus componentes.	31
Figura 8 Diagrama de Flujo de EDNA del funcionamiento.	32
Figura 9 Procedimiento de elaboración de controles positivos in silico en SnapGene.	37
Figura 10 Mapa genómico del vector pCR-XL-2-TOPO™	38
Figura 11 Parámetros de MiDetect en la plataforma MIFI, Microbe Finder	45
Figura 12 Esquema de 8 diluciones de RNA partiendo de una planta sana y una planta enferma (control positivo) para secuenciación HTS.....	47
Figura 13 Geles de agarosa al 1%(m/v) con TAE 1X, indicador la integridad presente en la variación de la extracción de RNA	50
Figura 14 Diagrama de cajas del TRSV con los rangos de significancia establecidos por la prueba de Turkey para los promedios del % de virus, con la variación a la interacción entre los 5 tipos de primers	52
Figura 15 Gel de agarosa al 2 % con producto de ADNc-cd de los virus GLRaV-4 y GLRaV-3.	55
Figura 16 Gel de agarosa al 2% con producto de PCR de plásmidos con primers específicos.	56

Lista de abreviaciones

ARN	ácido ribonucleico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADNc-dc	ácido desoxirribonucleico complementario de doble cadena
GLRaV	Grapevine Leafroll-associated virus
GRBaV	Grapevine Red Blotch associated virus
TRSV	Tabacco ringspot virus
HTS	Secuenciación de alto rendimiento (en inglés High throughput sequencing)
EDNA	E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis
GLD	enfermedad del enrollamiento de la hoja
GRBD	enfermedad de la mancha roja
ONT	Orford Nanopore Technologies
e-probe	sonda electrónica
PVP	polivinilpirrolidona
DSe	sensibilidad de diagnóstico
DSp	especificidad de diagnóstico

Resumen

La uva (*Vitis* spp.) es uno de los cultivos más importantes en Estados Unidos (USA) y a nivel mundial. En los últimos años los virus *Grapevine Leafroll-associated virus* (GLRaV) y *Grapevine Red Blotch associated virus* (GRBaV) han generado pérdidas económicas en los cultivos de uva. Estos son de difícil diagnóstico debido a las dificultades en la extracción de ARN total de las plantas perennes leñosas. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo diagnosticar la presencia de los virus GLRaV y GRBaV a partir de ARN total de muestras de hojas de uva.

Se empleó una variación al Mini Kit RNeasy Plant de Qiagen, Target-specific high-throughput sequencing para la elaboración de ADN complementario de doble cadena (ADNc-dc). Asimismo, se realizó reacciones en cadena cuantitativa de la polimera en tiempo real (q-PCR) y secuenciación con MinION-Oxford Nanopore technologies (ONT). Las secuencias resultantes se analizaron por medio de E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA) y en el programa Minimap 2.

Como resultado se obtuvo que las pruebas de diagnóstico de secuenciación de alto rendimiento (HTS) y EDNA tuvieron una baja sensibilidad de diagnóstico (DSe) y alta especificidad de diagnóstico (DSp) para GLRaV. Mientras que el GRBaV presentó una DSe moderada y DSp es alta. La prueba diagnóstica de HTS depende de la evaluación del virus teniendo que suma de DSe y DSp es mayor a 100% en algunos casos de GLRaV-4(cepa 4), GLRaV-4(cepa 6) y GRBaV, lo que indica que presenta precisión de diagnóstico.

Palabras Claves

- **TS-OLIGNUCLEOTIDOS**
- **SECUENCIACIÓN CON NANOPOROS**
- **MINION**
- **EDNA**
- **qPCR**

Abstract

Grape (*Vitis* spp.) is one of the most important crops in the United States and worldwide. In recent years, *Grapevine Leafroll-associated viruses* (GLRaV) and *Grapevine Red Blotch-associated virus* (GRBaV) have caused economic losses in grape crops. These viruses are difficult to diagnose due to difficulties in the extraction of total RNA from woody perennial plants. For this reason, the present investigation aimed to diagnose the presence of GLRaV and GRBaV viruses from the total RNA of grape leaf samples.

A variation of Qiagen's RNeasy Plant Mini Kit, Target-specific high-throughput sequencing for the preparation of double-stranded complementary DNA (cDNA-dscDNA), was used. Also, real-time quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) and sequencing with MinION-Oxford Nanopore technologies (ONT) were performed. The resulting sequences were analyzed by E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA) and Minimap 2 software.

As a result, high-throughput sequencing (HTS) and EDNA diagnostic tests had low diagnostic sensitivity (DSe) and high diagnostic specificity (DSp) for GLRaV. While GRBaV presented a moderate DSe and high DSp.

The diagnostic test for HTS depends on the evaluation of the virus and the sum of DSe and DSp is greater than 100% in some cases of GLRaV-4 (strain 4), GLRaV-4 (strain 6) and GRBaV, which indicates that it presents diagnostic accuracy.

Keywords

- TS-OLIGNUCLEOTIDE
- NANOPORE SEQUENCING
- MinION
- EDNA
- q-PCR

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

En la actualidad, el cultivo de uva está adquiriendo gran importancia a nivel mundial (Bacilieri, Lacombe, Cunff , Di Vecchi-Staraz , & Laucou , 2013). La viticultura en USA en el año 2017 tuvo un impacto de 219.9 mil millones de dólares produciendo 1.7 millones de empleos y en el estado de Oklahoma se generaron 4 711 plazas de trabajo (John Dunham & Associates, 2017). Los cultivos de uva en Estados Unidos representan 6.5 mil millones de dólares en comercio, con un área cultivada de aproximadamente de un millón de acres (440 000 hectáreas), con un resultado de 750 000 toneladas de uva en el 2018 (Wine Institute, 2019).

Los virus de la uva producen una gran cantidad de síntomas que afectan a los cultivos, causando pérdidas significativas en cantidad obtenida de los frutos y en la calidad de los mismos (Whitham , Yang , & Goodin , 2006; Laliberte & Sanfacon , 2010). Cuando la planta presenta una infección activa por virus inhibe varias rutas metabólicas (Blanco-Ulate, et al., 2017; Karlsson & Karlsson, 2018).

Los niveles de afección dependen de: combinaciones específicas de virus-huésped, la virulencia, susceptibilidad del cultivar y edad de la planta (Mannini & Digiaro , 2017).

Específicamente, la familia *Closteroviridae* tiene como miembro *Grapevine Leafroll-associated virus* (GLRaV), que afectan a diversos cultivos de frutas perennes de importancia agrícola (Naidu, Maree, & Burger, 2015; Alabi, y otros, 2016). Las especies GLRaV-4 al GLRaV-13 del género *Ampelovirus*. A excepción de la especie GLRaV-7 cuyo género es *Velarivirus* (Dolja , Meng, & Martelli , 2017; Herrbach , y otros, 2017; Mikona & Jelkmann, 2010).

Por otra parte, el *Grapevine Red Blotch-associated virus* (GRBaV) corresponde a

la familia *Geminiviridae* y provoca bajos rendimientos en los cultivos, así como cambios significativos en la composición química del fruto; alterando su sabor y aroma (Bachder, Zalom, Jayanth, & Sudarshana, 2016).

De manera general, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) ha permitido descubrir una gran variedad de virus fitopatógenos como los que afectan a la uva y también establecer las relaciones que existen entre virus y huésped (Villamor D. E., Ho, Rwahnih, Martin, & Tzanetakiz, 2019).

Justificación del problema

Los viñedos, comparados con otras plantas, se ven amenazados por una alta diversidad de especies de virus (Ricketts , et al., 2015). Hasta el momento se han identificado más de 80 especies de virus, pertenecientes a 27 géneros (Matelli, 2017). La infección por virus causa la disminución de la calidad, producción y vigor de la planta. Fisiológicamente, la vid sufre pérdida de pigmentos, proteínas solubles y disminución de la actividad fotosintética (Fuller, Alston, & Golino, 2015).

Específicamente, la enfermedad viral GLD de la uva representa el mayor porcentaje de pérdidas económicas en la industria (Namba , et al., 1979). Los virus responsables son: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV- 4, GLRaV- 7 y GLRaV- 13 (Matelli, 2017), mientras que la enfermedad viral GRBD es producida por el virus GRBaV, descubierto en 12 estados de USA (Matelli, 2017; Xiao, Shabanian, Moore, Li, & Meng, 2018).

Para el diagnóstico de estos fitopatógenos tradicionalmente se emplean técnicas de identificación visual, ensayos biológicos o inmunoensayos; sin embargo, no permite distinguir entre especies virales. Por ello una alternativa viable es emplear tecnologías de HTS para identificar metagenomas. Actualmente, es ampliamente utilizada por su capacidad para secuenciar millones de nucleótidos en un corto período de tiempo y,

además, en combinación de bioinformática se puede utilizar para la detección de virus conocidos, mutados y nuevos (Villamor D. E., Ho , Rwahnih, & Mar, 2019).

MinION-ONT es un dispositivo que emplea HTS para la secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) basada en el uso de nanoporos y corriente iónica. Este dispositivo es pequeño, liviano y secuencia varias Gigabases de ácidos nucleicos en una sola celda de flujo (Jamy, et al., 2018; Payne, Holmes, Rakyán, Loose, & BulkV, 2018; Krehenwinkel , Pomerantz , & Prost , 2019).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Detectar GLRaV (*Grapevine leafroll-associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS)

Objetivo específico

- Estandarizar el protocolo de detección GLRaV (*Grapevine leafroll associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) para el uso de MinION.
- Generar controles positivos para HTS de GLRaV (*Grapevine leafroll associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*).
- Validar la detección de patógenos de uva (*Vitis* spp.) con MinION a través de q-PCR y métodos bioinformáticos (EDNA).

Capítulo II: Marco Referencial

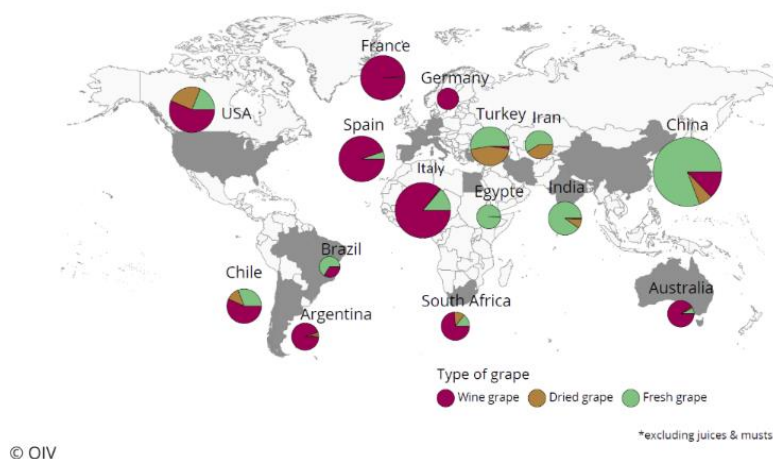
Vitis vinífera

La uva (*Vitis vinífera*) es del género *Vitis* spp. conformado por 80 especies aceptadas descritas actualmente y perteneciente a la familia *Vitaceae* (Royal Botanic Gardens, 2013; Maul, 2021). Son arbustos dicotiledóneos, trepadores y perennes, de hojas grandes con nervaduras unidas por pecíolos al tallo, la flor se caracteriza por tener su fisiología de racimo y frutas con forma de bayas. Florecen al terminar la primavera hasta el inicio del verano. Los frutos se originan a partir agosto hasta las heladas (The Ohio State University, 2021).

Esta especie es de gran importancia económica, ya que representa del 90% de la producción de uva a nivel mundial e incluso el 75% de su área de cultivo es destinada a la elaboración de vinos, mientras que el otro 25% se distribuye en fruta fresca y seca (Figura 1) (International Organization of Vine and Wine, 2017).

Figura 1

Áreas vitícolas y con sus zonas de producción en todo el mundo.



Nota. Este gráfico representa la producción mundial, actualizada hasta el 2017. Tomando de *Distribution of the world's grapevine varieties* (pag.4), OIV- International organization of vine and wine, Paris, 2017.

De la producción global se conoce que los países de China, Turquía e Italia son los mayores productores de uva de mesa (fruta fresca), que representan aproximadamente el 70% de la fruta obtenida a nivel mundial. China, de los 3.8 millones de toneladas de uva de mesa que produce, consume la mayoría; mientras que Turquía e Italia son los exportadores principales hacia países europeos. En el hemisferio sur se destacan Chile, Argentina, Brasil, Sudáfrica y Australia, como exportadores cada día más importantes (FAO, 2016).

No obstante, la propagación de la vid se da por clonación, convirtiéndola en una planta susceptible a plagas, enfermedades y estrés abiótico como el frío (Reisch & Pratt, 1996).

Enfermedades de *Vitis vinifera*

Las enfermedades pueden ser provocados por agentes infecciosos o no infecciosos (nutrición, humedad o factores climáticos). Los agentes infecciosos son organismo que atacan a la planta como los virus, bacterias, nematodos y hongos (Oklahoma State University, 2017).

Las enfermedades causadas por los virus requieren heridas (injertos o podas) o transmitirse por vectores (insectos y nematodos), este tipo de infección no suele ser letal, pero si afecta la calidad, rendimiento y vida del arbusto (Oklahoma State University, 2017). Las principales enfermedades virales son GLD (más destructiva entre todas patologías virales), enfermedad del tronco, la hoja en abanico (enfermedad degenerativa) y GRBD. Los síntomas que se producen por estas patologías suelen ser difíciles de distinguirse entre ellos (Washington State University, 2016), ya que todos generan una disminución en la actividad fotosintética de las hojas, cambios de coloración, entre otros (Zherdev, y otros, 2018).

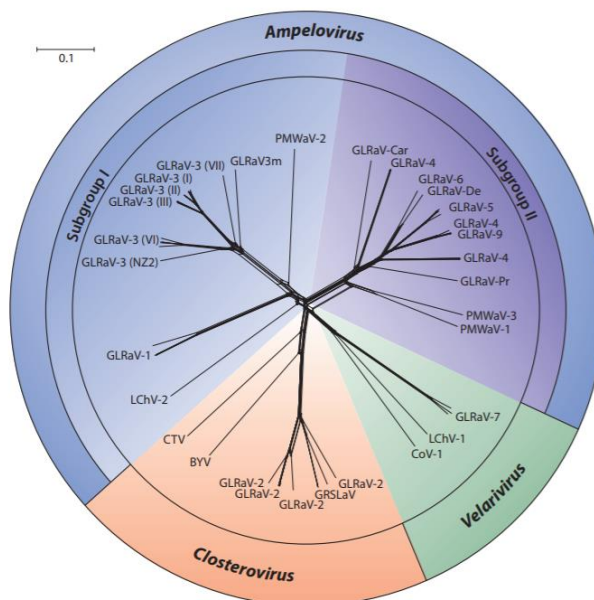
GLRaV (*Grapevine leafroll associated virus*)

Los virus GLRaV se clasifican taxonómicamente en cinco especies de la familia *Closteroviridae* divididos en tres géneros, cada uno determinado por sus secuencias específicas.

Del género *Ampelovirus* son GLRaV-1, GLRaV- 3 y GLRaV- 4. El GLRaV-2 en el género *Closterovirus*, y el GLRaV-7 en el género *Velarivirus* (Figura 2.) (Naidu, Maree, & Burger, 2015).

Figura 2

Árbol filogenético realizada por genes completos *HSP70h* de la Familia *Closteroviridae*



Nota. Tomado de *Grapevine leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem* (p.615). por R. A. Naidu, H.J. Maree y J.T. Burger, 2015, Annual Review of Phytopathology.

Las secuencias completas del genoma de los GLRaV obtenidas, indican que son virus genéticamente diversos si se toma en cuenta al tamaño del genoma, el contenido de sus marcos de lectura abiertos (ORFs) y organización (Naidu, Maree, & Burger, 2015).

El género *Ampelovirus* pertenece al grupo IV de los virus. Los viriones están formados por una sola molécula de ARN lineal, de sentido positivo y monocatenario (ARNsc+). Sus proteínas estructurales constan de una proteína de cubierta principal y una proteína de cubierta menor, sin cola de poli A en el extremo 5' (Naidu, Rowhani , Fuchs, Golino, & Martelli , 2014).

Las especies que conforman el género de *Ampelovirus* son GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4 y GLRaV-13, divididas en dos subgrupos de acuerdo a la diferencia y organización del tamaño, y la divergencia filogenética (Maliogka, Dovas , & Katis , 2008; Martelli , Agranovsky , Al Rwahnih , Dolja , & Dovas , 2012; Ito & Nakaune, 2016).

Los virus GLRaV-1 y GLRaV-3 son el subgrupo I con un tamaño entre ~ 18.5 y ~ 18.9 kilobases (kb) y codifica de nueve a doce ORFs. El subgrupo II es el GLRaV-4 con un tamaño de genoma entre ~ 13,6 y ~ 13,8 kb, codifica seis ORF y carece de la proteína de la cubierta menor. Posee varias cepas 4, 5, 6, 9, Pr, De, Ob y Car (Tabla 1).

Tabla 1

Lista de Cepas de GLRaV-4 identificadas. La longitud del genoma y donde se lo reportaron.

Cepa	Número de Accesoión	Fuente	Genoma nt
Cepa 4	MF669483.1	WA, USA	13,824
	FJ467503.1	CA, USA	13,830
Cepa 5	MF669481.1	WA, USA	13,820
	JX559639.1	Canadá	13,823
	KX828702.1	Brasil	13,823
	FR822696.2	NY, USA	13,384
Cepa 6	FJ467504.1	CA, USA	13,807

Cepa	Número de Accesoión	Fuente	Genoma nt
Cepa 9	MF669482.1	WA, USA	13,850
	KJ810572.2	España	13,858
Cepa Car	FJ907331.1	CA, USA	13,626
Cepa Pr	AM182328.4	Grecia	13,696
Cepa Ob	KP313764.1	Suiza	13,696

Nota. Recuperado de *Intra-species recombination among strains of the Ampelovirus Grapevine leafroll-associated virus 4(p.3)*, por J. Adiputra, S. Jarugula y A. Naidu, 2019. WA, Washington; CA, California; NY, Nueva York.

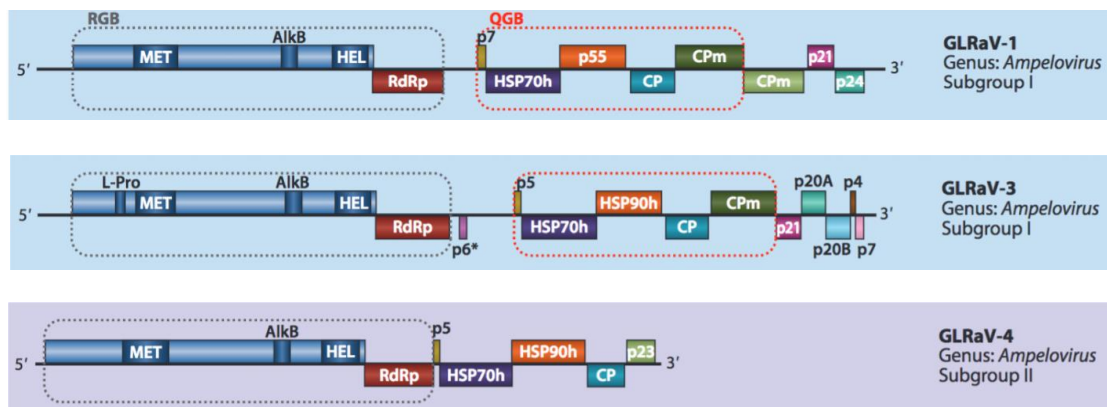
El GLRaV-13 es un *Ampelovirus* putativo. El genoma contiene once marcos de lectura abiertos putativos, mostrando características genéticas similares al subgrupo I del género *Ampelovirus* (Ito & Nakaune, 2016).

Por otra parte, los síntomas que produce el género *Ampelovirus* es el cambio de color en el follaje, de color verde a tonalidades rojas y blancas, las venas presentan clorosis. El color rojo púrpura significa la presencia de antocianinas en gran cantidad (Naidu, Maree, & Burger, 2015). Esta sintomatología aparece en las hojas maduras, en la parte inferior del dosel alrededor del envero y posteriormente aparece en hojas más jóvenes (Coombe & McCarthy, 2000).

En cuanto a su genoma los GLRaV-1, GLRaV-3 y GLRaV-4 tiene ORFs que codifican proteínas como: proteasa (L-Pro), metiltransferasa (MET), dominio AlkB (AlkB), helicasa (HEL), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), proteína homóloga de choque térmico 70 (HSP70h), p4, p5 ,p6, p7, p20A, p20B ,p21, p24, p23, p55, cápside (CP) y cápside menor (CPm)(Figura 3). La replicación ocurre en el citoplasma, asociada con las vesículas membranosas, que se encuentran en el retículo endoplásmico (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019).

Figura 3

Esquema de la estructura del genoma de los miembros del género *Ampelovirus*



Nota. RGB es el bloque de genes de replicación, representado con una línea entrecortada gris y QGB es el bloque de genes quintuple, representado con una línea entrecortada roja. Tomado de *Grapevine leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem* (p.616). por R. A. Naidu, H.J. Maree y J.T. Burger, 2015, Annual Review of Phytopathology.

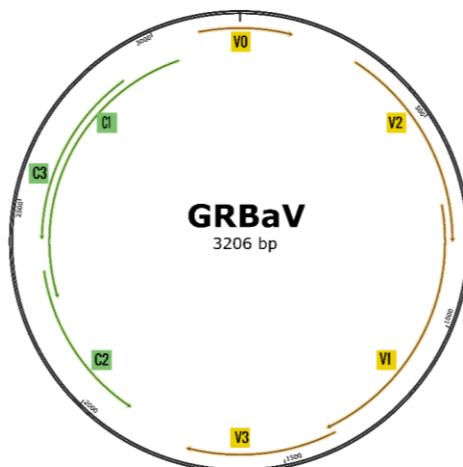
GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*)

El GRBaV pertenece al género *Grabovirus* y a la familia *Geminiviridae* (Varsani, y otros, 2017). Su genoma consiste en un ADN monocatenario circular (Figura 4) (Cieniew, Pethybridge, Gorny, & Madden, 2017).

Los síntomas que produce en la uva son coloraciones rojas en las hojas, similares a los provocados por la GLD (Cieniew, Pethybridge, Gorny, & Madden, 2017).

Figura 4

Genoma circular monocatenario de los miembros del género *Grablovirus*



Nota. Los marcos de lecturas que codifican las proteínas son: C1, Proteína Rep; C2 C-terminal de la proteína Rep; C3, desconocido; V1, cápside; V2, V3 y V0 son desconocidos. Tomado de *Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem.*(p. 615), por R. naidu, H. Maree, & J. Burger, 2015, Annual Review of Phytopathology.

El genoma está compuesto por cuatro ORFs en sentido del virión (V0, V1, V2 y V3) y tres el sentido comprimario a la hebra de ADN (C1, C2 y C3) (Cieniewicz, Perry, & Fuchs, 2017; Krenz, Thompson, McLane, & Fuchs, 2014; ICTV, 2019; Sudarshana, Perry, & Fuchs, 2015; Bachder, Zalom, Jayanth, & Sudarshana, 2016).

Métodos tradicionales de Diagnóstico de virus GLRaV y GRBaV

El diagnóstico visual es el más utilizado para enfermedades de uva, debido a que no tiene costo en materiales y reactivos, pero puede causar una identificación inexacta del patógeno. Debido a que un virus puede causar diferentes síntomas en cada variedad de uva (Magarey, 1986; Cieniewicz, Perry, & Fuchs, 2017; Burger, Maree, Gouveia, & Naidu, 2017) y en algunos casos son hasta asintomáticos.

Por otra parte, las pruebas biológicas se realizan por medio de plantas indicadoras, a las cuales se les transmite el virus mecánicamente y se espera de 7 a 10 días para observar síntomas (Naidu, Rowhani , Fuchs, Golino, & Martelli , 2014).

Finalmente, los inmunoensayos consisten en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) con resultados cualitativos e inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) como pruebas rápidas. Sin embargo, pueden producir falsos positivos por reacciones cruzadas (Zherdev, y otros, 2018).

Pruebas de diagnóstico

Para ser conocidas como válidas las pruebas de diagnóstico pasan por varias etapas comenzando con estudio experimental, continúa con características analíticas, características de diagnóstico, reproducibilidad, implementación, y robustez (World Organisation for Animal Health, 2019).

Para la caracterización de diagnóstico se utiliza una tabla de 2x2, utilizando una prueba de referencia (en inglés: Gold standard) y la nueva prueba. Para determinar la DSe, DSp, valor predictivo negativo (VPN), valor predictivo positivo (VPP) y prevalencia (P) (Figura 5) (Gómez & Pérez, 2008).

Figura 5

Tabla 2x2 para obtener DSp y DSe, VPP, VPN y P.

		Prueba de referencia	
		Positiva	Negativa
Prueba de Diagnóstico	Positiva	VP	FP
	Negativa	FN	VN

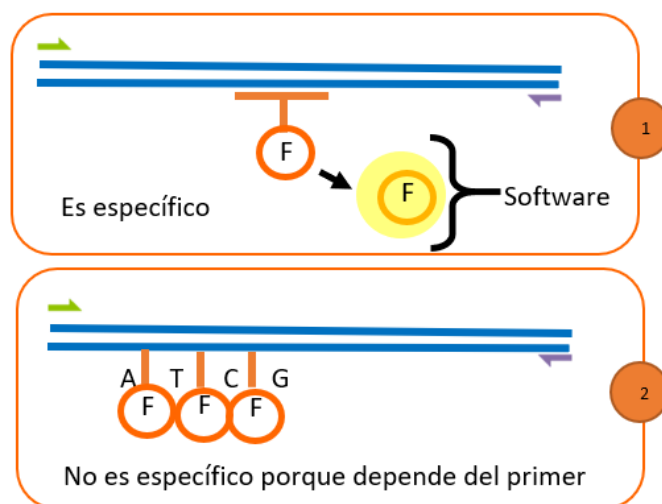
Nota. VP, Verdadero positivo; FP, Falso Positivo; FN, Falso Negativo; VN, Verdadero negativo. Curso de introducción a la investigación clínica. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia por C. Gómez, J. Pérez (509-591). J Medicina de Familia. SEMERGEN.

Prueba de referencia: Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR)

La q-PCR es una herramienta que permite el análisis y la cuantificación de la expresión génica en muestras biológicas y ambientales. Utiliza un fluoróforo que se intercala con la región de interés, entre el surco del AND/ADNc/ADNc-dc (Figura 6.2) (Valasek & Repa, 2005) o sondas marcadas con fluorocromos para detectar la amplificación de ADNc/ADNc-dc (Figura 6.1).

Figura 6

Esquema de la reacción de dos variantes de q-PCR



Nota. ; fluoróforo; ,fluoróforo excitado; -, ADN sonda; , primer inverso (reverse primer); , primer adelantero (forward primer); =, ADNdc; A/T/C/G, nucleótidos. 1, q-PCR con sondas marcadas con fluoróforo, cuando esta sonda se une a la secuencia diana conjuntamente con los primers que tiene una secuencia específica objetivo; 2, q-PCR con colorante, el colorante se une a la ADN de forma inespecífica, cuando este está libre emite baja fluorescencia y al unirse entre las cadenas aumenta a 1000 veces su fluorescencia. Realizado por Daniela Sempértégui, 2019.

La q-PCR se deriva de amplificación de curvas por Cq (quantification cycle), realizado en un termociclador, que detecta señales fluorescentes, así como un Hardware y un Software para el análisis de los datos (Bustin, et al., 2009).

Cada ciclo de PCR cuenta con tres etapas; la primera, desnaturalización, donde se separa la doble cadena del ácido nucleico (95°C); la segunda, alineación de los primers con el ADN molde (30-60°C) y la tercera, elongación o extensión, fase que produce la polimerización por una enzima sintetizadora de ADN, dNTPs (desoxirribonucleótidos) y concentraciones de iones divalentes. Generalmente se realiza entre 30 a 45 ciclos (Taylor, et al., 2019).

La cinética de amplificación por la q-PCR se puede dividir en cuatro fases; la primera, inicial o basal, la fluorescencia no supera el umbral (10 a 15 ciclos); la segunda, geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), aquí se tiene el comportamiento 2^n de la fase amplificación del ADN, es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos; la tercera, lineal, comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática; y la cuarta, estacionaria, muestra una señal saturada.

La técnica tiene diferentes aplicaciones como: análisis de expresión génica, control sanitario de alimentos, identificación de individuos (Taylor, et al., 2019) y pruebas de diagnóstico (Gold estándar) (Valasek & Repa, 2005).

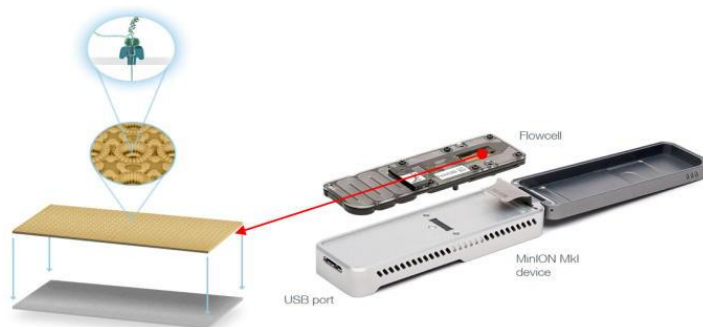
Pruebas de Diagnóstico Para Probar

Secuenciación con MinION-ONT

Minion-ONT es un dispositivo con nanoporos por donde pasa corriente iónica y mide los cambios de corriente de acuerdo con el nucleótido que atraviese el nanoporo, para así identificar a la molécula. De esta manera se obtiene un conjunto de lecturas de secuenciación (Figura 7) (Oxford Nanopore Technologies, 2020).

Figura 7

Dispositivo de Secuenciación MinION-ONT y sus componentes.



Nota. La gráfica nos indica el dispositivo MinION-ONT y la celda de flujo, donde se observa como la secuencia pasa por el nanoporo, donde por corrientes iónicas se identificará cada nucleótido. Tomado de *Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly* (p.266). por H. Lu, F. Giordano y Z. Ning, 2017, Genomics Proteomics Bioinformatic.

Debido a portabilidad, accesibilidad y velocidad en la producción de datos es adecuado para aplicaciones en tiempo real (Figura 7), lo que permite tener un constante monitoreo de los patógenos, brindando una gama de aplicaciones en diferentes ramas (Oxford Nanopore Technologies, 2020)

E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA)

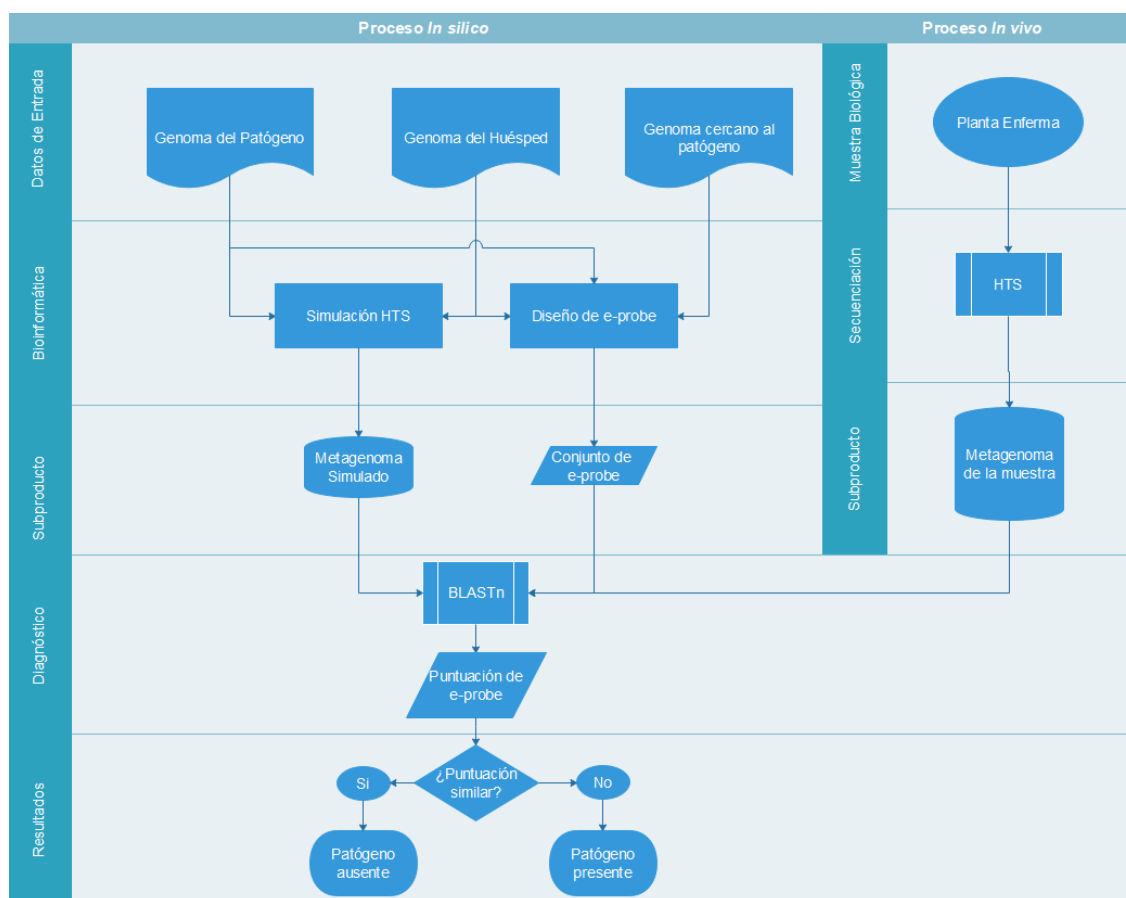
Los métodos tradicionales tienen la capacidad de detectar solamente un patógeno específico como es en el caso del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y PCR en tiempo real o hibridación de microarray. EDNA es un método bioinformático que permite tener el diagnóstico en paralelo de diferentes patógenos a través de sondas electrónicas (e-probe) (Stobbe , et al., 2013).

Todas las secuencias obtenidas se analizan por bioinformática sin realizar curaciones, debido a que las e-probe son secuencias únicas de los patógenos generadas por comparaciones genómicas entre organismos relacionados filogenéticamente (Figura

8). Las e-probes al alinearse con los metagenomas obtenidos de la secuenciación produce coincidencias o hits.

Figura 8

Diagrama de Flujo del funcionamiento de EDNA.



Nota. Realizado en Edraw Max por Daniela Sempértegui, 2021. Tomado de *E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA): a theoretical approach for handling of next generation sequencing data for diagnostics* por A. Stobbe, J.Daniels, A. Espindola, R Verma, U.Melcher, F. Ochoa-Corona, W. Schneider (p.357). J Microbiol Methods.

Hipótesis

La secuenciación con MinION detecta la presencia de GLRaV (*Grapevine leafroll-associated virus*) y GRBaV (*Grapevine red blotch-associated virus*) en plantas de uva.

Capítulo III: Materiales y métodos

Instituciones participantes

El período de duración de la presente investigación desde el 22 de junio del 2020 hasta el 28 de enero del 2021, por medio del convenio existente entre el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencia de la Vida y Agricultura, a la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y el Department of Entomology and Plant Pathology, Institute of Biosecurity and Microbial Forensics (IBMF) de Oklahoma State University con los fondos de los proyectos AG-18-RS-108 y AG-19-RS-092. Regidos por las normas de Oklahoma State University y el Department of Agriculture Food and Forestry.

Colaboradores científicos

Francisco J. Flores Flor, PhD.	Tutor de tesis.
Alma Koch Kaiser, M.Sc.	Cotutor de tesis
Andrés S. Espíndola Camacho, PhD.	Profesor asistente de investigación en el IBMF(OSU).
Carla D. Garzón. PhD.	Coordinadora de convenio (OSU).

Área de Estudio

La investigación se ejecutó en la Universidad Estatal de Oklahoma, Departamento de Entomología y Fitopatología, IBMF; ubicado en el 127 Noble Research Center, 130 Henry Bellmon Research Center, Stillwater – Estados Unidos.

Material biológico

Se utilizaron controles positivos proporcionados por Dr. Marc Fuchs, quien forma parte de Cornell University en Nueva York, Estados Unidos. El material vegetal que contiene los virus: GLRaV-4 (Cepas 4, 6), TRSV y GRBaV se mantuvo en -80°C desde 2018 hasta la actualidad (Tabla 2).

Tabla 2

Controles positivos de virus de uva, obtenidos de Cornell University en Nueva York.

Control	Muestra	Parte del Hospedero	Hospedero
TRSV	2-55	Hojas	<i>Vitis vinifera</i>
TRSV	2-56	Hojas	<i>Vitis vinifera</i>
GLRaV-4(Cepa 4)	1-13	Hojas	<i>Vitis vinifera</i>
GLRaV-4(Cepa 6)	1-12	Hojas	<i>Vitis vinifera</i>
GLRaV-3	1-47	Hojas	<i>Vitis vinifera</i>
GLRaV-3	1-48	Hojas	<i>Vitis vinifera</i>
GRBaV	2-13	Hojas y Pecíolo	<i>Vitis vinifera</i>

Nota. TRSV, *Tabacco ringsspot virus*; GLRaV, *Grapevine Leafroll-associated virus*; GRBaV, *Grapevine red botch-associated virus*.

Se realizó muestreo en el estado de Oklahoma City de plantas de uva. Las hojas (cortaron en discos) y los pecíolos se guardaron en -80°C en tubos de 15mL con sílica gel (Tabla 3).

Tabla 3

Localización de muestras de uva sanas e infectadas el 01 de julio del 2020.

Muestra	Zona	Localización	Latitud	Longitud	Hospedero
D202025	1	Fila 1, Planta 5	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	<i>Vitis</i> ssp.
D202026	1	Fila 1, Planta 5	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	<i>Vitis</i> ssp.

Muestra	Zona	Localización	Latitud	Longitud	Hospedero
D202027	1	Fila 1, Planta 8	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	<i>Vitis</i> ssp.
D202028	1	Fila 1, Planta 8	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	<i>Vitis</i> ssp.
D202029	1	Fila 4, Planta 6	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	<i>Vitis</i> ssp.
D202030	1	Fila 4, Planta 6	35°36'37.2"N	97°17'37.0"O	<i>Vitis</i> ssp.

Nota. Muestras sanas. Los números impares son tejido de hojas y los pares son muestras de pecíolos (columna de muestra).

Extracción total de ARN

Se trasladó 100 mg (dos discos) de tejidos vegetales sanos o enfermos a tubos de 1,7 mL para extraer el ARN total usando el kit Mini RNeasy Pant de Qiagen (N° de catálogo/ID: 74904) (Anexo 1). Sin embargo, para la preparación del buffer RLT se adicionó 0.04 g polivinilpirrolidona (PVP) por cada 1 mL de reactivo y se igualó el pH a 5 - 5.5 con acetato de sodio 0.2M (4:84) (Gehrig, Winter, Cushman, Borland , & Taybi , 2012; MacKenzie, McLean, & Srima , 1997)

La cuantificación y pureza de ARN total se determinó con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad del ARN se evaluó con gel de agarosa al 1%. No obstante, cuando se observó ADN genómico en el gel, se realizó un tratamiento con DNase I (N° de catálogo: EN0521). A continuación, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Estandarización de la síntesis de ADNc-dc

Para la estandarización del ADNc-dc se utilizó el virus *Tobacco ringspot virus*

(TRSV), en lugar de GLRaV y GLRaB; para poder identificar el rendimiento de este proceso con diferentes primers empleados en investigaciones en el primer paso de del portocolo Target-specific high-throughput sequencing para la síntesis de ADNc-cd.

El Target-specific high-throughput sequencing, consistió en la síntesis ADN complementario (ADNc) usando los primers oligo dT, target-specific reverse, hexámeros, icosámeros y poli-T. Después se obtuvo las dobles cadenas del ADN complementario (ADNc-dc) mediante amplificación y se cuantificaron con el equipo Quantus™ Fluorometer (Nº de catálogo: E6150) usando el kit QuantiFluor ONE dsDNA System (Nº de catálogo: E4870).

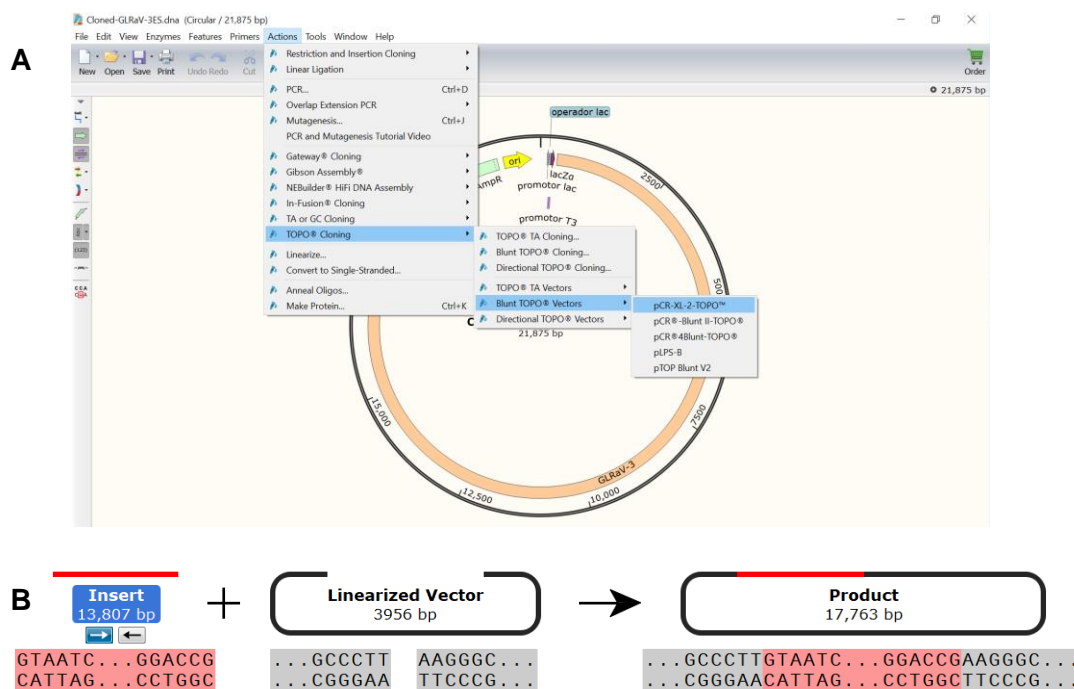
Generación de controles positivo in silico

Se usó el software SnapGene con los números de accesión FJ467503, FJ467504.1, NC_004667.1, NC_022002, MK955838.1 y MF377525.1; de los virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV (Genoma Completo, Cápside y Proteína de Replicación Rep) respectivamente.

En el software se utilizó el menú de acciones >> TOPO cloning >> Blunt TOPO® Vectors>> pCR-XL-2-TOPO™ (Figura 9A). A continuación, se realizó la obtención de sección de interés, posteriormente se linealizó el vector y se insertó el fragmento de interés en el plásmido (Figura 9B).

Figura 9

Procedimiento de elaboración de controles positivos in silico en SnapGene.



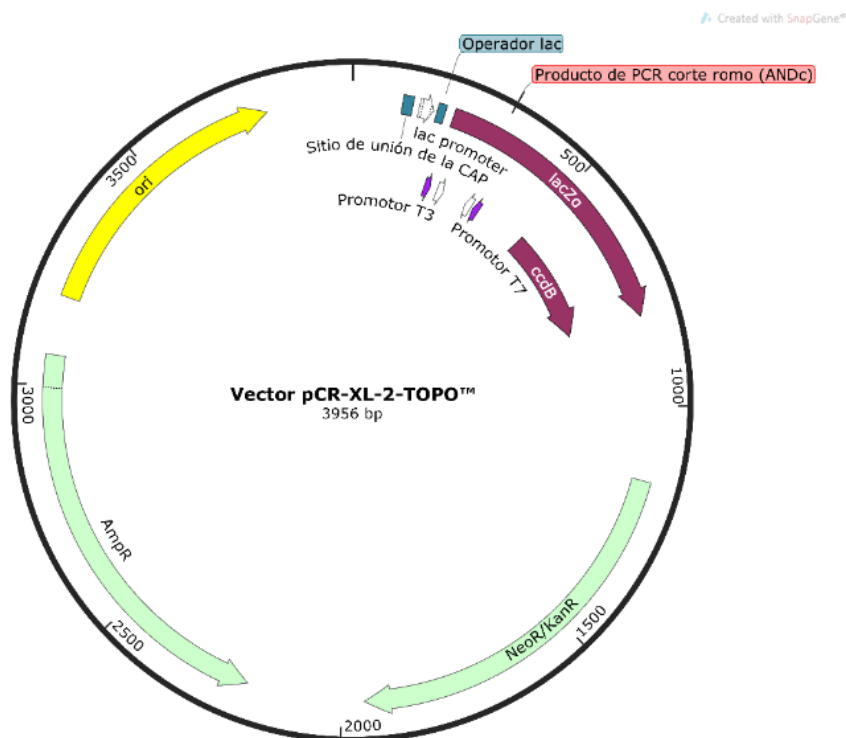
Nota. A, Pasos a seguir en el Software; B, Procedimiento de la clonación in silico, primero se realiza una PCR *in silico* con los primers específicos, posterior se linealiza al vector y por último se obtiene el producto. Obtenido por D. Sempertegui (2020) en el software SnapGene.

Controles Positivos *in vitro*

El ADNc-dc obtenido se caracterizó por tener cortes romo; por lo cual se utilizó el TOPO™ XL-2 Complete PCR Cloning Kit (N° de catálogo: K805010) para clonar el material viral en las células competentes de E.coli One Shot™ OmniMAX™ 2 T1^R en el vector pCR-XL-2-TOPO™ (Figura 10).

Figura 10

Mapa genómico del vector *pCR-XL-2-TOPO™*



Nota. ori, Origen de replicación; AmpR, Gen de resistencia a Ampicilina (β -lactamasa); NeoR/KanR, Gen de resistencia a Neomicina y Kanamicina (Aminoglucósido 3'-fosfotransferasa); ccdB, Gen de mantenimiento del vector (Toxina CcdB); lacZ α . Gen que codifica β -galactosidasa. Realizado por Daniela Sempertegui (2021) con el software SnapGene. Secuencia tomada de ThermoFisher Scientific (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcrxl2topo_seq.txt).

Se determinó la presencia del fragmento de interés mandando a secuenciar el plásmido y el producto de una purificación de gel con primers específicos del patógeno en el Centro de Investigación Henry Bellmon (Mass Spectrometry and Core Facility). Posteriormente se realizó un ensamblaje de la secuencia (software Pregap versión 1.6r de Bonfield, Smith & Staden (1995)) y búsqueda de BLAST para comprobar la

presencia del fragmento del virus.

Secuenciación con MinION-ONT

Se usó el ADNc-dc para la elaboración de las bibliotecas probando los Kits de Oxford Nanopore: Rapid PCR Barcoding Kit (SQK-RPB004), Rapid Barcoding Sequencing (SQK-RB004) y Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) con las extensiones de barcodes (EXPND104 y EXP-BD114) para determinar el mejor porcentaje de poros activos en el MinION (FLO-MIN106D) con el Flow Cell Kit (EXP-FLP002) y usando el programa MinKNOW versión 3.6.0 (Oxford Nanopore Technologies, 2020).

Como el Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) obtuvo el mejor rendimiento, las bibliotecas finales se prepararon con 24 barcodes, iniciando en el proceso End-prep (Página 4 del ANEXO 3). En donde se optimizó los volúmenes de las reacciones de End-prep y ligación de Barcodes (ANEXO3), como se muestra en la Tabla 4. Finalmente, se cargó la librería en el Minion durante 72 horas.

Tabla 4

Modificaciones de procedimiento con Direct cDNA Native Barcoding (ANEXO 3).

Reactivo	Volumen establecido	Volumen optimizado
End-prep (página 4)		
ADNc-dc	20µL	5.2 µL
Agua libre de nucleasas	30 µL	17 µL
Buffer de la enzima End-prep II (N° de catálogo: E756L)	7 µL	3.9 µL
Mix de la enzima End-prep II (N° de catálogo: E756L)	3 µL	1.7 µL

Reactivo	Volumen establecido	Volumen optimizado
Ligación de Barcode (página 5)		
End-prepped ADN	22.5µL	4.5 µL
Barcode nativo	2.5 µL	0.5 µL
Mix de Ligasa Bllunt/TA (N° de catálogo: M0367L)	25 µL	5 µL

Nota. El número de página está de protocolo ANEXO 3.

Las secuencias obtenidas en FAST5 se transformaron en FASTQ y se clasificaron las secuencias por Barcodes en el programa Guppy versión 4.2.2 (código de programación, ANEXO 4) en la supercomputadora Pete de Oklahoma State University.

Pruebas de diagnóstico

Las muestras de uva se analizaron en el laboratorio IBMF para detectar GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV mediante tres pruebas de diagnóstico q-PCR, EDNA, HTS. En la Tabla 5. se detalla las características de las pruebas.

Tabla 5

Detalles observados en las pruebas diagnósticas: propósito de la prueba, objetivo y criterio de resultados de las tres pruebas de diagnóstico evaluadas.

Prueba	Propósito de la Prueba	Objetivo	Resultado positivo	Resultado negativo
q-PCR	Detección de: GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV	Fragmentos de la tabla 6	<30 Cq	≥30Cq
EDNA	Detección de: GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV	e-probes (3 por cada patógeno)	Positivo	Negativo

Prueba	Propósito de la Prueba	Objetivo	Resultado positivo	Resultado negativo
HTS	Detección de: GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV	Secuencia Tabla 9	≥1 Lecturas	0 Lecturas

Nota. q-PCR, reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real; EDNA, E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis; HTS, secuenciación de alto rendimiento; GLRaV, *Grapevine Leafroll-associated virus*; GRBaV, *Grapevine red blotch-associated virus*.

Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR)

Se utilizó tres pares de primers. Un primer universal del GLRaV-4 que amplifica el extremo C terminal del ORF6 y una parte de la región no codificante del extremo 3' descrito por Ghanem-Sabanadzovic, Gugerli & Rowhani (2012). El segundo primer GLRaV-3 definido por Gambino & Gribaudo (2006) amplifica la cápside del virus y el último para GRBaV se diseñó en base las secuencias presentes en el NCBI de su cápside (Tabla 6).

Tabla 6

Detalle de los primers utilizados en la q-PCR de los virus GLRaV-4, GLRaV-3 y GRBV.

Nombre / Nombre original	Secuencia 5' → 3'	Temperatura de melting / Tm [°C]	Tamaño esperado [bp]
GLRaV-4(U)A-F / FLRAmp-F	ATTTAGGTAATGTWGTRGCTAC	49	485
GLRaV-4(U)A-R / FLRAmp-R	TATCCTCAGWGAGGAARCGG	58	
GLRaV-3A-F	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	60	336

Nombre / Nombre original	Secuencia 5' → 3'	Temperatura de melting / Tm [°C]	Tamaño esperado [bp]
GLRaV-3A-R	TGCGGCATTAATCTTCATTG	50	
dGRBVCA-R	AAGCCGCAGACAAATAA	56.8	576
dGRBVCA-F	AACGGAAGCAGAGAAGAA	57.6	

Las reacciones de la q-PCR se realizaron con los reactivos, concentraciones y volúmenes presentes en la Tabla 7, en tubos de 0.1mL con la programación indicada en la Tabla 8.

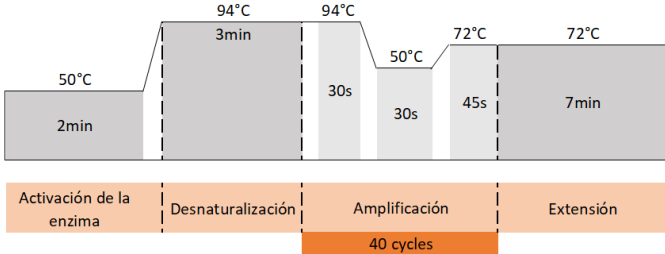
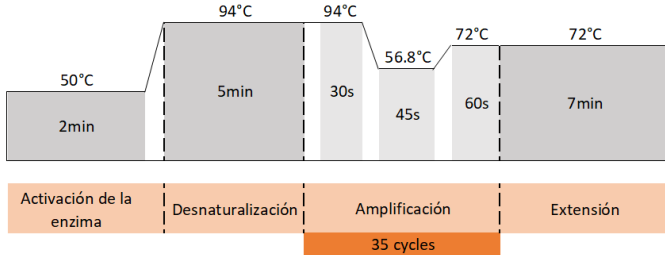
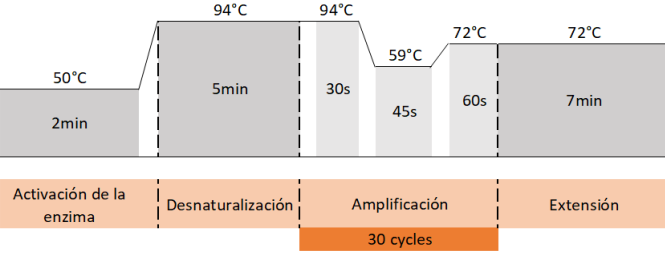
Tabla 7

Detalle de las reacciones de q-PCR para GLRaV-4, GLRaV-3 y GRBaV.

Reactivo	Concentración	Volumen 1X
ADNc-dc	~ 20 -10 ng/mL	2 µL
Primer Forward	5µM	1 µL
Primer Reverso	5µM	1 µL
Agua libre de nucleasas	-	1 µL
PowerUp SYBR Green Master Mix	2X	5 µL
TOTAL		10µL

Tabla 8

Parámetros de amplificación de q-PCR para los virus GLRaV-4, GLRaV-3 y GRBaV.

Etapa	Parámetros de Cuantificación	Fusión de alta Resolución HRM
GLRaV-4	 <p>Activación de la enzima: 50°C, 2min Desnaturalización: 94°C, 3min Amplificación: 94°C, 30s; 50°C, 30s (40 cycles) Extensión: 72°C, 45s; 72°C, 7min</p>	Rampa de 60 °C a 90° Aumento por paso de 0.25 °C
GLRaV-3	 <p>Activación de la enzima: 50°C, 2min Desnaturalización: 94°C, 5min Amplificación: 94°C, 30s; 56.8°C, 45s (35 cycles) Extensión: 72°C, 60s; 72°C, 7min</p>	Espera de 90s antes de llegar a las condiciones de HRM
GRBaV	 <p>Activación de la enzima: 50°C, 2min Desnaturalización: 94°C, 5min Amplificación: 94°C, 30s; 59°C, 45s (30 cycles) Extensión: 72°C, 60s; 72°C, 7min</p>	Espera de 2 s después de cada después de cada paso.

E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA)

Consta de una plataforma en línea denominada Mifi Microbe Finder

(<http://bioinfo.okstate.edu/login/index.php>) (Espindola & Carwell, 2021); en donde se

generaron los e-probes tomando en cuenta los siguientes parámetros: genoma del patógeno (FASTA), genoma del organismo más cercano (FASTA), tipo de e-probe, longitud de la e-probe y número mínimo de coincidencias para el diseño de la sonda. En la Tabla 9 se visualiza los valores y opciones que se usó para cada virus evaluado.

Tabla 9

Parámetros de elaboración de e-probes

Parámetros/Virus	GLRaV-4(4)	GLRaV-4(6)	GLRaV-3	GRBaV (Cápside)
Genoma del patógeno (número de accesoión)	FJ467503.1 MF669483.1 NC_016416.1	NC_016417.1	AF037268.2 JQ655295.1 MH796135.1 NC_004667.1	KY498152.1 KY498153.1 KY498154.1 KY498155.1
Genoma del organismo más cercano (número de accesoión)	NC_016417.1	NC_016081.1	FJ467503.1 MF669483.1 NC_016416.1	NC_043533.1
Tipo de e-probe	Fija	Fija	Fija	Fija
Longitud de la e-probe (bp)	20,30, 40 y 60	20,30, 40 y 60	20,30, 40 y 60	20,30, 40 y 60
Mínimo de coincidencia para el diseño de e-probe (bp)	5, 10, 15, 20, 25 y 30	5, 10, 15, 20, 25 y 30	5, 10, 15, 20, 25 y 30	5, 10, 15, 20, 25 y 30

Todas las e-probes que se realizaron fueron coladas en una lista denominada VIRUS, la que se usó para la detección del organismo de interés.

Luego la colección de secuencias en formato fasta5 obtenidas de cada barcode con ONT se compiló en un solo archivo FASTQ, el cual es transformado a formato FASTQ.GZ y se cargado en la plataforma de Mifi Microbe Finder.

MiDetect

Los metagenomas se evaluaron con los siguientes parámetros: e-valor de $1e-1$ y con un mínimo de 250 hits y la lista de e-probes llamada VIRUS (Figura 11).

Figura 11

Parámetros de MiDetect en la plataforma MIFI, Microbe Finder

The screenshot displays the MiDetect configuration interface within the MIFI Microbe Finder platform. The interface is divided into several sections:

- Navigation:** A sidebar on the left contains links for MiProbes, E-probe Libraries, Genomes, Metagenomes, Jobs, and FAQ.
- Submit Jobs:** A section with buttons for MiProbe and MiDetect, and a Quota section indicating "Your quota is 200 GB" (with 79.66 GB used).
- MiDetect Modal:** A central window for configuring a job with the following fields:
 - Give a name to your Job:** GRVcap
 - Select the E-probe list:** Virus
 - Select the E-value:** Suggested e-value for viruses (eval 1e-1)
 - Minimum number of hits:** Recommended for semi-quantification (250 hit)
 - Select your metagenome:** GrapevinProject GRBvcap_S1Pool
- Job List:** A table in the background showing a list of jobs with columns for Job name, Status, and ID. The table includes a search bar and a 'Show 10' dropdown.

HTS

El Mapeo de colecciones de genomas se efectuó con el programa minimap 2 (Li H. , 2018) con los genomas de referencias presentes en la Tabla 10 y el módulo de herramienta SAMtools (Li , y otros, 2009)(ANEXO 5) para clasificar, indexar, extraer datos y cambiar formatos.

Tabla 10

Genomas de Referencias que se utilizaron para el mapeo de metagenomas en el programa minimap2.

Virus	Número de accesión
GLRaV-4(4)	MF669483.1
	FJ467503.1
	NC_016416.0
GLRaV-4(6)	NC_016417.1
GLRaV-3	JQ655295.1
	AF037268.2
	MH796135.1
	NC_004667.1
GRBaV Cápside	KY498152.1
	KY498153.1
	KY498154.1
	KY498155.1

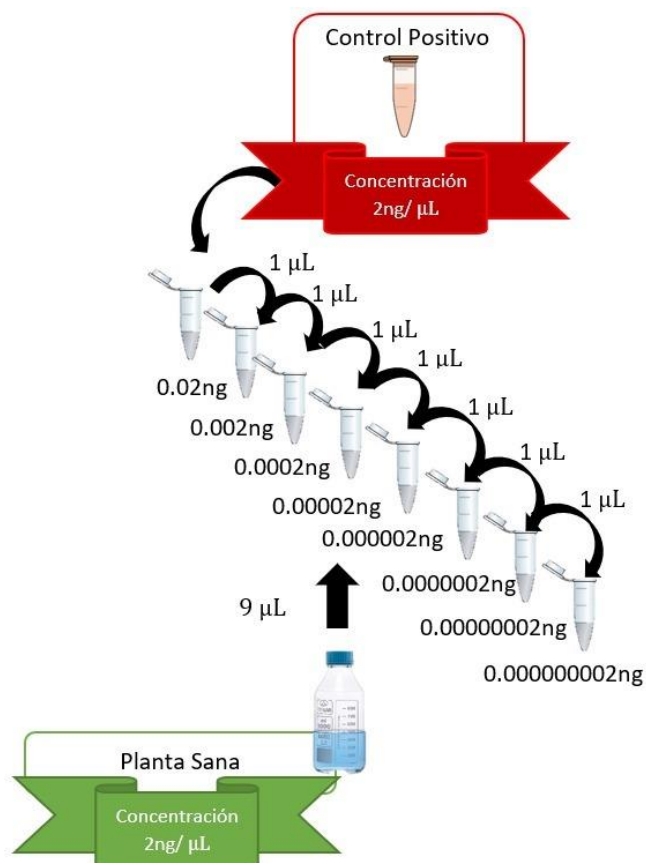
Nota. Secuencias obtenidas de Centro Nacional de Información Biotecnológica (Siglas en ingles NCBI).

Validación de pruebas de diagnóstico

Primero se realizó 8 diluciones de ARN total con los controles positivos y tejidos sanos desde una concentración de 2ng/uL hasta 2×10^{-10} ng/uL y una extracción de planta sana como se muestra en la Figura 12.

Figura 12

Esquema de 8 diluciones de RNA partiendo de una planta sana y una planta enferma (control positivo) para secuenciación HTS.



Note. Diagrama realizado por Daniela Sempértegui (2021). Los dos ARNs ; planta sana y enferma estuvieron en una concentración de 2ng/uL.

Cada prueba de diagnóstico se le realizó dos tratamientos en la obtención de ADNc-dc, la primera es con un target-specific reverse primer para cada virus y la segunda un coctel de target-specific reverse primers. El cual tenía los target-specific reverses de: GLRaV-3, GLRaV4-(4), GLRaV4-(6) y GRBaV.

Para interpretar los resultados se realizó el cálculo de DSe, DSp y prevalencia promedio de las siguientes ecuaciones tomando en cuenta la nomenclatura de la Figura 5. Como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11*Ecuaciones utilizadas para evaluar pruebas de diagnóstico*

Variable	Ecuación
Sensibilidad de diagnóstico (DSe)	$DSe = \frac{VP}{VP + FN}$
Especificidad de diagnóstico (DSp)	$DSe = \frac{VN}{VN + FP}$
Prevalencia	$P = \frac{VP + FN}{VP + FP + FN + VN}$
Aplicando teorema de Bayes	
Valor Predictivo Positivo (VPP)	$VPP = \frac{P \times DSe}{P \times DSe + (1 - P) \times (1 - DSp)}$
Aplicando teorema de Bayes	
Valor Predictivo Negativo (VPN)	$VNP = \frac{(1 - P) \times DSp}{P \times (1 - DSe) + (1 - P) \times DSp}$

Nota. Ecuaciones tomadas de *Principle and Methods of validation of Diagnostic Assay for infectious Diseases*, OIE, 2019.

Capítulo IV: Resultados

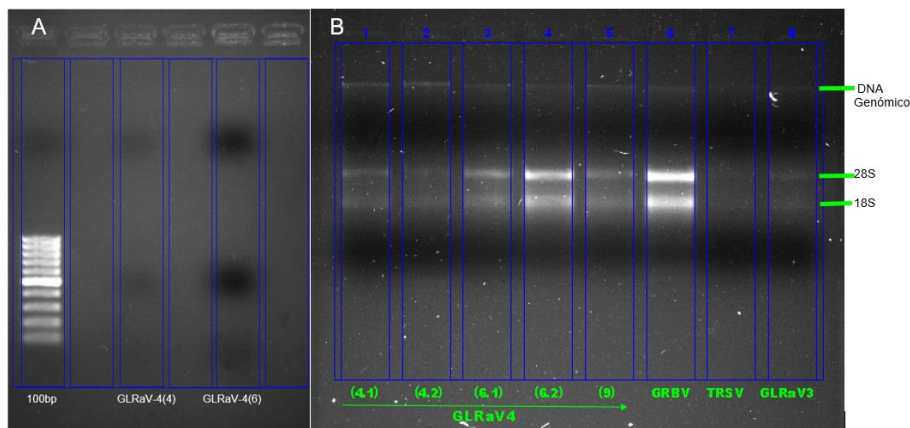
Extracción total de ARN

Al aplicar la variación con PVP en el protocolo de Mini Kit RNeasy Plant de Qiagen se obtuvo ARN de 7 controles positivos y 3 plantas sanas. La concentración obtenida fue entre 20 y 110 ng/ μ L, presentando una relación de absorbancia 260/280 entre 1.7 a 2.2; a través del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), mientras que al realizar la extracción sin variación con PVP se obtuvo de 2.3ng/ μ L a 5.53ng/ μ L, con mala calidad.

Para verificar que la variación en el buffer RTL con la adición de PVP fue eficiente se realizó una comparación de la integridad de ARN (Figura13) en donde se pudo observar que usando solo el buffer RTL no se obtienen las bandas correspondientes a las bandas de las subunidades 28S y 18S, indicadores de una extracción pura (Figura13 A). Por otra parte, la adición del PVP permitió identificar las bandas de ARN ribosomal como se muestra en la figura 13B. No obstante, se observó contaminación con ADN genómico

Figura 13

Geles de agarosa al 1%(m/v) con TAE 1X, indicador la integridad de extracciones de ARN.



Nota. A, Gel de agarosa con Mini Kit RNeasy Plant de Qiagen; B Gel de agarosa con Mini Kit RNeasy Plant de Qiagen y la variación de PVP.

Estandarización de la síntesis de ADNc-dc

El ADNc-dc obtenido fue cuantificado por el equipo Quantus™ Fluorometer obteniéndose concentraciones de 15 a 130 ng/μL.

Se analizaron los primers que se usaron en la transcripción inversa del ARN en el protocolo Target-specific high-throughput sequencing por medio del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (Tabla 12), en el cual se evaluó el porcentaje de virus de los metagenomas secuenciados. El resultado fue que no existe diferencia significativa entre controles positivos, repeticiones y primers x controles positivos (p-valor = 0.4249, p-valor= 0.5131 y p-valor =0.9684). Sin embargo, se encontró una diferencia elevada entre los primers (p-valor <0.0001). Y por ello se realizó la prueba de Turkey con una confianza del 95% para cada ARN del TRSV.

Tabla 12

ANOVA de dos vías para la interacción entre controles positivos x primers, primers, controles positivos del TRSV y réplicas [%virus] después de 72 h de corrida en MinION-ONT.

Fuente de Variación	DF	ARN 1			ARN 2		
		SS	F	P-Valor	SS	F	P-Valor
Primers X							
Controles Positivos	4	0.756	0.131	0.9684 ^{ns}	0.064	0.009	0.968 ^{ns}
Primers	4	104.300	18.180	<0.0001 ^{****}	172.600	26.000	<0.0001 ^{**} ^{**}
Controles Positivos	1	0.963	0.788	0.4249 ^{ns}	0.135	0.0957	0.424 ^{ns}
Repeticiones	4	4.890	0.852	0.5131 ^{ns}	5.622	0.846	0.513 ^{ns}
Residual	16	22.960			26.560		
Total	29	133.870			204.981		

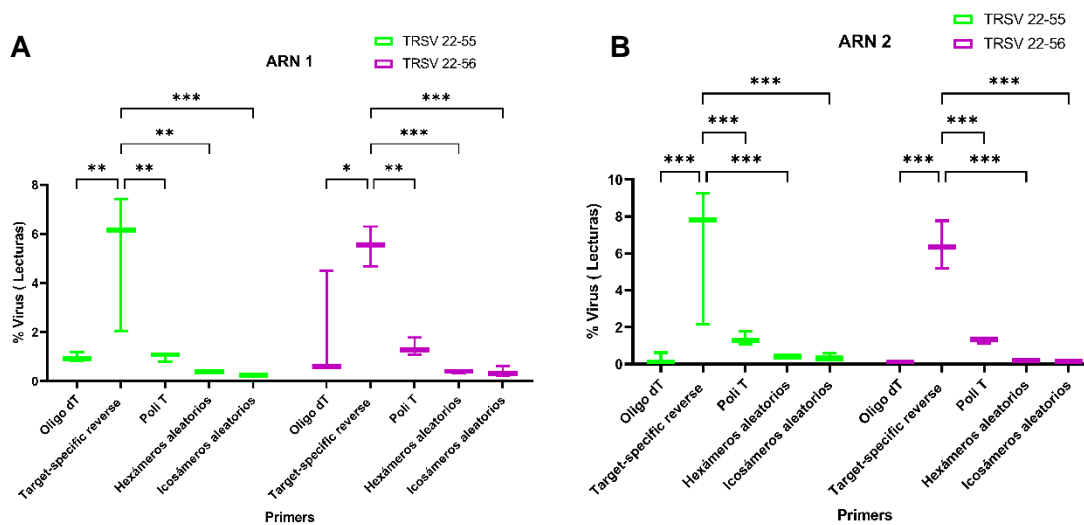
Nota. DF, Grados de libertad; SS, Suma de cuadrados; F, ns: no hay significancia (0.1234); niveles de significancia: *(0.0332), **(0.0021), *** (0.0002), ****<0.0001. El análisis estadístico se realizó en el Software GraphPad Prisma 9 por Daniela Sempértegui (2021).

El promedio de los datos para los dos ARNs del virus bipartito TRSV (ARN1 y ARN2), son significativamente diferentes al relacionar Oligo dT, Hexámeros aleatorios, Icosámeros aleatorios y Poli-T con Target-specific reverse primer. El ADNc-dc que fue

realizado con el Target-specific reverse primer obtuvo más cantidad de lecturas del virus (Figura 14).

Figura 14

Diagrama de cajas del TRSV con los rangos de significancia establecidos por la prueba de Turkey para los promedios del % de virus, con la variación a la interacción entre los 5 tipos de primers.



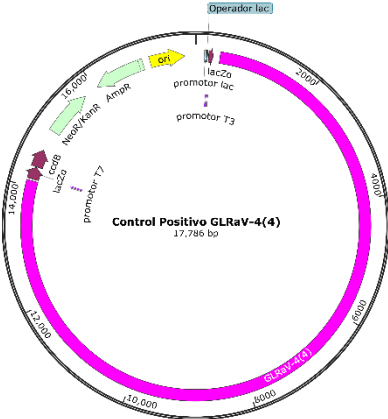
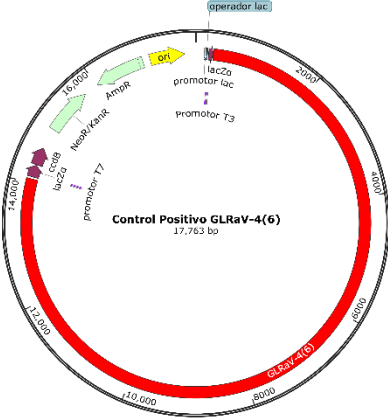
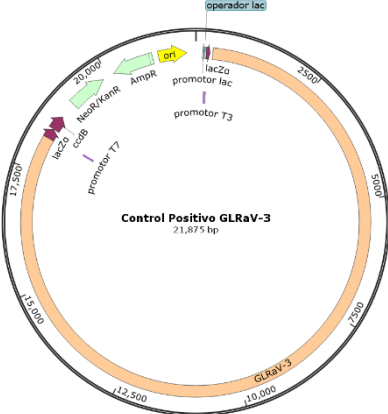
Nota. A. Diagrama de caja de ARN 1 del TRSV con dos controles positivos; A. Diagrama de caja de ARN 2 del TRSV con dos controles positivos. ns: no hay significancia (0.1234); niveles de significancia: *(0.0332), **(0.0021), *** (0.0002), ****<0.0001. Gráfico realizó en el Software GraphPad Prisma 9 por Daniela Sempértégui (2021).

Controles Positivos *In silico*

Se obtuvieron controles positivos desde 231 bp hasta 17 864 bp como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

Controles positivo *In silico* de los virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GRBaV

Virus	Tamaño del fragmento	Mapa
GLRaV-4(4) Genoma completo Número de accesión: FJ467503	13 691 bp	
GLRaV-4(6) Genoma completo Número de accesión: FJ467504.1	13 772 bp	
GLRaV-3 Genoma completo Número de accesión: NC_004667.1	17 864 bp	

Virus	Tamaño del fragmento	Mapa
GRBaV	2 886 bp	
Genoma completo		
Número de accesión:		
NC_022002		
GRBaV	576 bp	
Cápside		
Número de accesión:		
MK955838.1		
GRBaV	231 bp	
Proteína de replicación		
Rep		
Número de accesión:		
MF377525.1		

Nota. Realizado por Daniela Sempértégui (2021) con el software SnapGene.

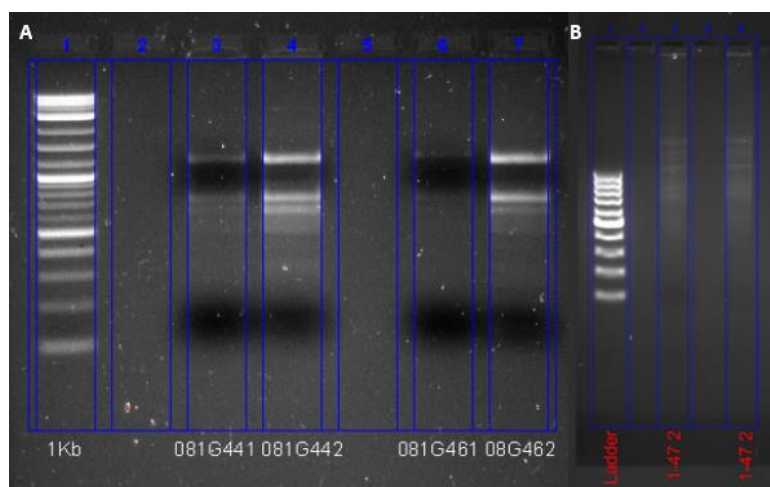
Controles Positivos *In vitro*

La eficiencia de la transformación promedio de las células competentes es: $9E+11CFU/\mu g$, $1.56+12CFU/\mu g$, $3E+12CFU/\mu g$ y $2.4E+12CFU/\mu g$, de acuerdo con el volumen colocado en la caja Petri respectivamente 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L y 100 μ L.

No se obtuvieron controles positivos para los virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GLRaV-3 porque no se logró insertar en el vector los fragmentos de interés para cada virus (Figura 15).

Figura 15

Gel de agarosa al 2 % con producto de ADNc-cd de los virus GLRaV-4 y GLRaV-3.



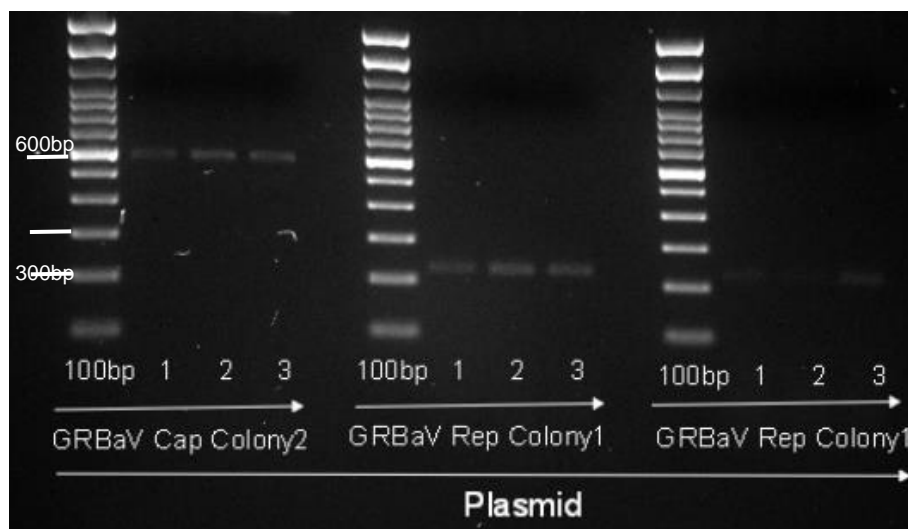
Nota. A: 1Kb, Marcador Thermo Scientific™ 1Kb, 081G441, 081G442 son ADNc-cd del GLRaV-4(4); 081G461, 081G462 son ADNc-cd del GLRaV-4(6). B: Ladder, Marcador Thermo Scientific™ 100bp, 1-47 2 es ADNc-cd del GLRaV-3.

Por otra parte, se lograron obtener controles positivos para GRBaV, correspondientes a la cápside y proteína de replicación Rep del virus. Así mismo, se comprobó la presencia de los fragmentos del GRBaV por medio de PCR de punto final. En donde se obtuvieron fragmentos ~231pb (Proteína Rep) y ~576pb (Cápside) (Figura 16), que luego fueron secuenciados. Después estas se analizaron por búsqueda en BLAST; en donde la primera y segunda secuencia se alinearon a cápside (score de 880

a 725 y e-valor de 0) y a la proteína de replicación Rep (315 a 183 y e-valor de $9E-82$ a $3E-43$) respectivamente del GRBaV, como se observan en los ANEXOS 5 y 6.

Figura 16

Gel de agarosa al 2% con producto de PCR de plásmidos con primers específicos.



Nota. Foto tomada por Daniela Sempértregui (2021).

Secuenciación con MinION-ONT

Se evaluó el porcentaje de poros que se activan para realizar la secuenciación por corrida; en donde con Rapid PCR Barcoding Kit (SQK-RPB004) se obtuvo un 25% (ANEXO 8), con Rapid Barcoding Sequencing (SQK-RB004) un 6% y con Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) con las extensiones de barcodes (EXPND104 y EXP-BD114) un 80% (ANEXO 9).

Validación de HTS con q-PCR y EDNA

Se aplicó HTS y EDNA a 9 muestras de *Vitis vinífera* enfermas con los Virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV. Para el GLRaV-4(4) se obtuvo una mayor DSe (33.33%) con Target-specific reverse primer que el coctel de Target-specific reverse primers (12.50%) y mayor DSp (100%) en el coctel de Target-specific reverse primer que con el de Target-specific reverse primers. Con la prueba de diagnóstico

EDNA se obtuvo menos DSe (11,11%) que HTS con el Target-specific reverse primer, mientras con el coctel se consiguió una DSe y DSp similar. En la Tabla 14 se puede observar los resultados.

Tabla 14

Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GLRaV-4(4)

Target-specific reverse primer de GLRaV-4(4)									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	1	0	8	0	11.11%	0.00%	100.00%	0.00%	100.00%
HTS	3	0	6	0	33.33%	0.00%	100.00%	0.00%	100.00%
Coctel de Target-specific reverse primers									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	1	0	7	1	12.50%	100.00%	100.00%	12.50%	88.89%
HTS	1	0	7	1	12.50%	100.00%	100.00%	12.50%	88.89%

Nota. VP, Verdaderos positivos; FP, Falsos positivos; FN, Falsos Negativos; VN,

Verdaderos negativos; VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo;

P, Prevalencia.

Para GLRaV-4(6) las pruebas HTS y EDNA obtuvieron los mismos resultados cuando se usó el coctel de Target-specific reverse primers; mientras que con el Target-specific reverse primer HTS tuvo 28.57% de DSe y su DSp fue igual al encontrado en EDNA (Tabla 15).

Tabla 15

Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GLRaV-4(6)

Target-specific reverse primer de GLRaV-4(6)									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	0	0	7	2	0.00%	100.00%	0.00%	22.22%	77.78%
HTS	2	0	5	2	28.57%	100.00%	100.00%	28.57%	<u>77.78%</u>

Coctel de Target-specific reverse primers									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	1	0	7	1	12.50%	100.00%	100.00%	12.50%	88.89%
HTS	1	0	7	1	12.50%	100.00%	100.00%	12.50%	88.89%

Nota. VP, Verdaderos positivos; FP, Falsos positivos; FN, Falsos Negativos; VN,

Verdaderos negativos; VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo;

P, Prevalencia.

Así mismo, al aplicar las dos pruebas de diagnóstico al GLRaV-3 en todos los casos se calcularon DSe y DSp de 0% y 100% respectivamente (Tabla 16).

Tabla 16

Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de

Target-specific reverse primers en el GLRaV-3

Target-specific reverse primer de GLRaV-3									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	0	0	7	2	0.00%	100.00%	0.00%	22.22%	77.78%
HTS	0	0	7	2	0.00%	100.00%	0.00%	22.22%	77.78%

Coctel de Target-specific reverse primer									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	0	0	8	1	0.00%	100.00%	0.00%	11.11%	88.89%
HTS	0	0	8	1	0.00%	100.00%	0.00%	11.11%	88.89%

Nota. VP, Verdaderos positivos; FP, Falsos positivos; FN, Falsos Negativos; VN,

Verdaderos negativos; VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo;

P, Prevalencia.

Al realizar las pruebas en GRBaV (Cápside) se identificó que los dos tratamientos presentaron los mismos valores para DSe (28.57%) y DSp (100%). En el caso del Target-specific reverse primer se tuvo una mayor DSe para HTS (100%) comparada con lo obtenido en EDNA (33%) y la DSp de 100% con EDNA, mientras que con HTS tiene 83.33% (Tabla 17).

Tabla 17

Resultados aplicando EDNA y HTS con Target-specific reverse primers y coctel de Target-specific reverse primers en el GRBaV

Target-specific reverse primer de GRBaV									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	1	0	2	6	33.33%	100.00%	100.00%	75.00%	33.33%
HTS	3	1	0	5	100.00%	83.33%	75.00%	100.00%	33.33%
Coctel de Target-specific reverse primers									
Test	VP	FP	FN	VN	DSe	DSp	VPP	VPN	P
EDNA	2	0	5	2	28.57%	100.00%	100.00%	28.57%	77.78%
HTS	2	0	5	2	28.57%	100.00%	100.00%	28.57%	77.78%

Nota. VP, Verdaderos positivos; FP, Falsos positivos; FN, Falsos Negativos; VN,

Verdaderos negativos; VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo;

P, Prevalencia.

Capítulo V: Discusión

La industria de la uva es uno de los mercados más dinámicos y de alto crecimiento en los últimos años, por lo que es importante la detección de organismo que afecten el crecimiento de la planta (Úrbez-Torres, Peduto, Smith, & Gubler, 2013; Hoeffert & Gifford, 1967). Por tal motivo es necesario desarrollar una prueba diagnóstica para la identificación rápida de corta duración.

Las hojas de la uva están compuestas químicamente por flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, cumarinas, estilbenos, triterpenoides, polisacárido, polifenoles, ácidos fenólicos y catequinas entre otros compuestos (Dani, et al., 2010; Kozak, Krzanowski, & Tartanus, 2012). La presencia de estos compuestos hace que la extracción de RNA tenga dificultades en especial con los fenoles y ácidos fenólico. Por otra parte, los polisacáridos poseen características físicas y químicas similares a los ácidos nucleicos se precipitan junto al RNA (Liu, et al., 2018). Por lo que se utilizó el PVP como resina de intercambio catiónico, con el objetivo de quelar los polifenoles y polisacáridos (MacKenzie, McLean, & Srima, 1997). Obteniendo un aumento de un rango de concentración de ARN total de 2.3 ng/μL al 5.53ng/μL; a un rango de 20 hasta 110 ng/μL.

Para transcripción en inversa, clonación, secuenciación y otras aplicaciones moleculares es necesario tener una alta concentración de ARN, rango de pureza bueno e integridad (Liu, et al., 2018; Miranda & Steward, 2017; Ma, et al., 2015; Pk Dash, 2013). El ARN total extraído tiene una pureza entre 1.7 a 2.2, dentro del ~2.0 indica que ARN es puro sin presencia de proteínas (Thermo Fisher Scientific, 2009). Existe integridad porque en el gel de 1% se observó la presencia de las bandas claras 28S y 18S (Figura 13B), sin fenómeno de degradación lo que sugiere que la modificación de MacKenzie, McLean & Srima (1997). Por lo contrario, al realizar la extracción de ARN

total con Mini Kit RNeasy Plant de Qiagen no se visualiza la presencia de bandas (Figura 13A).

La estandarización de la obtención de ADNc-dc se realizó con el TRSV, virus bipartito presenta de ARN con cola de Poli-A (Swiss Institute of Bioinformatics, 2020; Sanfaçon, 2018; Zhao, et al., 2015). Con el fin de poder comparar el rendimiento del el target-specific reverse primer con los primers utilizados en similares procesos de obtención de ADNc-cd.

El Protocolo Target-specific high-throughput sequencing dio una diferencia significativa entre los diferentes primers (p -valor <0.0001) en la transcripción inversa. El mayor porcentaje de virus fue el target-specific reverse primer debido a que posee una secuencia específica del patógeno mientras que los primers oligo dT, Hexámero, Icosámeros y Poli-T; se unen a secuencias al azar y pueden producir ADNc vacío (en inglés empty cDNA) (Turchinovich, Harald , Serva, & Zap, 2014).

La extracción de ARN de tejido vegetal fresco en la mayoría de los casos se consigue con éxito, pero hay condiciones de campo o laboratorio que a veces no permiten una extracción después de la recolección y se debe almacenar los tejidos de la planta en $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por periodos largos de tiempo (Pérez-Portela & Riesgo, 2013). Por lo que el tejido vegetal de los contrales positivos de GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GLRaV-3 están a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ desde el 2016 hasta la actualidad.

Para la conservación del ARN se debe colocar sílica gel (100:1) para mantener una humedad relativa del 30% (Center For Plant Conservation-CPC, 2020) y se debe considerar que se va a producir variabilidad en la concentración de ARN. Pero la relación huésped-virus se tuvo es baja la cantidad de virus y alta cantidad de uva, como se puede apreciar en la Figura 15 al no visualizarse fragmentos esperados de los patógenos. Se observan bandas de diferentes tamaños que pueden ser ARN

subgenómico del virus con fragmentos de huésped (Bar-Joseph & Mawassi, 2013) o degradación del genoma del virus.

El tamaño de los fragmentos objetivos es de ~17Kb para GLRaV-3, ~12 a 13 Kb para GLRaV-4, por lo que se existe dificultad en amplificarse el genoma completo, insertarse la secuencia objetivo al vector y la célula competente no puede replicar esa cantidad de ADNc-dc extraño (GenScript, 2021). Los controles obtenidos del GRBaV fueron de son ~231pb (Proteína Rep) y ~576pb (Cápside) (Figura 17).

El Rapid PCR Barcoding Kit y Rapid Barcoding Sequencing tienen un rango bajo de 25% a 6% porcentaje de poros activos. Debido a la presencia de las transposas (enzima) que escinden los ácidos nucleicos de la muestra, mientras el kit Direct cDNA Native Barcoding (80%) liga a los barcodes a la muestra (Oxford Nanopore Technologies, 2020).

En esta investigación se evaluó el rendimiento de dos pruebas de diagnóstico diferentes (HTS, EDNA) y una prueba de referencia (q-PCR) para detectar GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV. Las pruebas se aplicaron en 8 diluciones de ARN y una planta sana, esto se realizó para cada virus, los cuales partieron de un ARN total huésped-virus. Para las pruebas no deben influir en los resultados DSe y DSp en los diferentes objetivos de las pruebas (Janse, et al., 2019). Por el contrario, las pruebas de diagnóstico si se ven influenciadas dependiendo del virus y esta variante se puede observar de acuerdo con el tamaño del patógeno.

En los resultados de validación no se obtuvo las características analíticas, debido a que no se tiene el número adecuado de controles positivos para someter a las pruebas de diagnóstica. Según OIE (2019) se necesita un mínimo de 15 muestras diferentes positivas para tener una estimación de DSe o DSp del 95% y un error del 5%

de DSe y DSp. La sensibilidad analítica no se puede calcular sin tomar en cuenta este parámetro.

La especificidad analítica permite diferenciar el ácido nucleico o anabólico objetivo y te permite identificar reacciones cruzadas (OIE, 2019). Evalúa selectividad (hospedero), exclusividad (organismo más cercano) e inclusividad (cepa diferente). En el caso de la exclusividad en el virus GRBaV, no se pudo probar con un organismo cercano (ejemplo: Grapevine virus A (GVA)) porque se carecía de muestras vegetales con GVA, de igual manera no se otra cepa diferente del virus GRBaV como el GLRaV-3, por ello no se puede probar inclusividad.

En el GLRaV-3 y GLRaV-4(6) en las dos pruebas de diagnóstico con el coctel y el primer específico la DSe es baja (0% a 28.57%), la prevalencia es alta (77.78% a 88.89%) y el VPN es bajo (11.11% a 28.57%), esto indica que la prueba negativa carece de valor (Gómez & Pérez, 2008).

Capítulo VI: Conclusiones

1. Se estandarizó el protocolo de detección de GLRaV y GRBaV, aumentando de una concentración de ARN promedio de 2.3ng/ μ L a una concentración promedio de 50 ng/ μ L; elevando el porcentaje de virus de 5.35% en el ARN1 del TRSV y en el ARN2 tiene 5.37%, en comparación de: oligo dT, Hexámero, Icosámeros y Poli-T que tienen 0.1% a 4.55% en el ARN1 y 0.06% a 1.78% en caso que el ARN2 y teniendo una mayor eficiencia por porcentaje (80% en el pico más alto) de poros activos con Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) con las extensiones de barcodes (EXPND104 y EXP-BD114).
2. Se generó controles positivos con una eficiencia general de clonación $9E^{11}CFU/\mu g$ a $3E^{12}CFU/\mu g$, solo se obtuvo controles positivo *in vitro* para GRBaV de la cápside y de la proteína de replicación Rep, con un tamaño de fragmento de ~576bp y ~231bp, mientras con los virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GLRaV-3 no se logró obtener el fragmento de interés o se insertaba fragmentos del huésped.
3. Los resultados de las pruebas de diagnóstico HTS y EDNA no tiene un porcentaje alto de DSe y DSsp para detectar a GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GLRaV-3 o las enfermedades GRL, mientras que la detección del GRBaV tiene 100% de DSe y 83% de DSsp con la prueba de diagnóstico HTS y target-specific reverse primers, lo que muestra la capacidad de detectar la enfermedad GRB.
4. El coctel de target-specific reverse primers disminuye a la mitad la DSe de las pruebas de diagnóstico de HTS.
5. La prueba de diagnóstico EDNA y HTS en referencia del virus GLRaV-3 no posee valor de diagnóstico ya que la suma de DSe y DSsp no tiene un valor mayor a 100%,mientras que para los virus GLRaV-4(4), GLRaV-4(6) y GRBaV

tienen una suma mayor a 100%, lo que nos indica que tiene valor de diagnóstico.

Capítulo VII: Recomendaciones

1. Realizar un control interno para determinar si la extracción de ARN influye en la secuenciación.
2. Utilizar un Basecaller y Basecoder que tenga parámetros más estrictos para aumentar lecturas obtenidas del patógeno por cada barcode.
3. Realizar tres muestras para validación: una concentrada, una sana y una difusión intermedia para cada patógeno (GLRaV-4(4), GLRaV-4(6), GLRaV-3 y GRBaV), y estas realizarlo por triplicado.
4. Validar la prueba de diagnóstico incrementando el número de controles positivos a un mínimo de 15 muestras para poder determinar especificidad y sensibilidad analítica.
5. Obtener controles positivos con tejido vegetal fresco, para obtener el genoma completo del GLRaV-4 y GLRaV-3.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Bacilieri, R., Lacombe, T., Cunff, L., Di Vecchi-Staraz, M., & Laucou, V. (2013). Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biol.*, 13-25.
- Dolja, V. V., Meng, B., & Martelli, G. P. (2017). Evolutionary aspects of grapevine virology. *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management.*, 659–688.
- Ito, T., & Nakaune, R. (2016). Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Springer*, 2555–2559.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 3094-3100.
- Mannini, F., & Digiario, M. (2017). The effects of viruses and viral diseases on grapes and wine. *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management.*, 453–482.
- Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., & Martelli, G. P. (2014). Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. *The American Phytopathological Society*, 1172 - 1185.
- Turchinovich, A., Harald, S., Serva, A., & Zap, M. (2014). Capture and Amplification by Tailing and Switching (CATS). *RNA Biol*, 817–828.
- Adiputra, J., Jarugula, S., & Naidu, R. A. (2019). Intra-species recombination among strains of the ampelovirus Grapevine leafroll-associated virus 4. *Virology* 16, 139.
- Al Rwahnih, M., Dave, A., Anderson, M., & Rowhani, A. (2013). Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology*, 1069-1076.
- Alabi, O. 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* 11. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149666>
- Bachder, B. H., Zalom, F. G., Jayanth, M., & Sudarshana, M. R. (2016). Phylogeny of Geminivirus Coat Protein Sequences and Digital PCR Aid in Identifying *Spissistilus festinus* as a Vector of Grapevine red blotch-associated virus. *The American Phytopathological Society*, 1223-1229.
- Bar-Joseph, M., & Mawassi, M. (2013). The defective RNAs of Closteroviridae. *Front Microbiol.*
- Blanco-Ulate, B., Hopfer, H., Figueroa, R., Ye, Z., Rivero, R. M., Albacete, A., . . . Cantu, D. (2017). Red blotch disease alters grape berry development and metabolism by interfering with the transcriptional and hormonal regulation of ripening. *Journal of Experimental Botany*, 1225–1238.
- Bonfield, J. K., Smith, K. F., & Staden, R. A. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res*, 4992-4999 .
- Burger, J. T., Maree, H. J., Gouveia, P., & Naidu, R. A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus3. . *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, 167-195.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., & Mueller, R. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*.
- Center For Plant Conservation-CPC. (2020). *CPC Best Plant Conservation Practices*.
Obtenido de Guidelines for Tissue Collection and Storage Related to Genetic Studies of Rare Plants: <https://saveplants.org/best-practices/guidelines-tissue-collection-and-storage-related-genetic-studies-rare-plants/>

- Cieniew, E. J., Pethybridge, S. J., Gorny, A., & Madden, L. V. (2017). Spatiotemporal spread of grapevine red blotch-associated virus in a California vineyard. *Virus Research*, 156-162.
- Cieniewicz, E., Perry, K., & Fuchs, M. (2017). Grapevine Red Blotch: Molecular Biology. *Springer International Publishing*, 303-314.
- Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6:, 131-135. .
- Dani, C., Oliboni, L. S., Agostini, F., Funchal, C., Serafini, L., Herinques, J. A., & Salvador, M. (2010). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusa* var. Bordo and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, 148-153.
- Espindola, A. S., & Carwell, K. F. (2021). Microbe Finder (MiFi ®): Implementation of an Interactive Pathogen Detection Tool in Metagenomic Sequence Data. *Plants (Basel)*, 1-14.
- FAO. (2016, 05 21). *FAO*. Retrieved from Statistical Yearbook 2014: <http://www.fao.org/3/a-i3621e.pdf>
- Fuller, K., Alston, J., & Golino, D. (2015). The economic benefits from virus screening: a case study of Grapevine Leafroll in the North Coast of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66: 112–119.
- Gambino, G., & Gribaudo, I. (2006). Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 1223-1229.
- 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. *Plant Mol Biol Rep*, 369–376.

- GenScript. (2021). *GenScript*. Obtenido de Top 5 reasons molecular cloning can fail – and solutions from GenScript:
https://www.genscript.com/reasons_cloning_fails_solutions.html
- Ghanem-Sabanadzovic, N. A., Sabanadzovic, S., Gugerli, P., & Rowhani, A. (2012). Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. *Virus Research*, 120-128.
- Gómez , C., & Pérez, J. F. (2008). Curso de introducción a la investigación clínica. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 509-519.
- Herrbach , E., Alliaume, A., Prator , C., Daane, K., Cooper , M., & Almeida, R. (2017). Vector transmission of grapevine leafroll-associated viruses. . *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management.* , 483–503.
- Hoeffert, L. L., & Gifford, E. M. (1967). Trabeculae in the grapevine infected with leafroll virus. . *Amer*, 257-261.
- ICTV. (2019). *Genus: Grablovirus*. Retrieved from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/580/genus-grablovirus
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2019). *Genus: Ampelovirus*. Retrieved from Virus de ARN de sentido positivo: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/closteroviridae/1292/genus-ampelovirus
- International Organization of Vine and Wine. (2017). Distribution of the world's grapevine varieties.
- Jamy, M., Foster, R., Barbera, P, P., Czech, L., Kozlov, A., Stamatakis, A., . . . Burki, , F. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.*, 36, 338.

- Janse, M. D., Guarrancino, M., Carson, M., Modahl, I., Taksdal, T., Sindre, H., . . . Tavorpanich, S. (2019). Field Evaluation of Diagnostic Test Sensitivity and Specificity for Salmonid Alphavirus (SAV) Infection and Pancreas Disease (PD) in Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway Using Bayesian Latent Class Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 419.
- John Dunham & Associates. (2017). The National Association of American Wineries. *Wine Industry Economic Impact Reports*.
- Karlsson, P., & Karlsson, B. (2018). *Las 10 uvas de vino más populares en los EE. UU.* Obtenido de Forbes: <https://www.forbes.com/sites/karlsson/2018/06/08/the-most-popular-wine-grapes-in-the-us-chardonnay-and-cabernet-the-full-top-10-list/#738b7749fbfb>
- Kozak, M., Krzanowski, W., & Tartanus, M. (2012). Use of the correlation coefficient in agricultural sciences: problems, pitfalls and how to deal with them. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1147-1156.
- Krehenwinkel, H., Pomerantz, A., & Prost, S. (2019). Genetic Biomonitoring and Biodiversity Assessment Using Portable Sequencing Technologies: Current Uses and Future Directions. *Genes*, 858.
- Krenz, B., Thompson, J. R., McLane, H. L., & Fuchs, M. (2014). Grapevine red blotch-associated virus is Widespread in the United States. *Phytopathology*, 1232-1240.
- Laliberte, J., & Sanfacon, H. (2010). Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 48, 69–91.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., . . . Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 2078-9.

- Liu, L., Han, R., Yu, N., Zhang, W., Xing, L., Xie, D., & Peng, D. (2018). A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense*. *PloS one*,. doi:<https://doi.org/10.1371/j>
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 265-279.
- Ma, Z., Huang, B., Xu, S., Chen, Y., Li, S., & Lin, S. (2015). Isolation of High-Quality Total RNA from Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *PLoS One*.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., & Srma, M. (1997). Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease*, 222.226.
- Magarey, P. A. (1986). Grape-vine yellows-aetiology, epidemiology and diagnosis. S, 7(2), 90-100. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 90-100.
- Maliogka, V. I., Dovas, C. I., & Katis, N. I. (2008). Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus. *Virus Res*, 125–35.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., & Dovas, C. I. (2012). Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *J Plant Pathol*, 7–19.
- Matelli, G. P. (2017). An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. *Springer*, 31–46.
- Maul. (2021, 01 19). *Vitis spp.* Obtenido de www.vivc.de
- Mikona, C., & Jelkmann, W. (2010). Replication of Grapevine leafroll-associated virus-7

- (GLRaV-7) . *Cuscuta species and its transmission to herbaceous plants.* , 471–476.
- Miranda, J. A., & Steward, G. F. (2017). Variables influencing the efficiency and interpretation of reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR): An empirical study using Bacteriophage MS2. *Journal of Virological Methods*, 1-10.
- Naidu, A. R., Maree, H. J., & Burger, J. T. (2015). Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. *Annual Review of Phytopathology*, 613-634.
- Namba , S., Yamashita , S., Doi , Y., Yora, K., Terai , Y., & Yano, R. (1979). Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. *Ann. Phytopathol*, 497–502.
- OIE. (2019). Principle and Methods of Validation of Diagnostic Assay for Infectious Diseases. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 1.18.
- Oklahoma State University. (2017). *Grapevine Disease Testing Services*. Obtenido de Types of plant Diseases: <https://extension.okstate.edu/fact-sheets/grapevine-disease-testing-services.html>
- Oxford Nanopore Technologies. (2020, 02 04). Retrieved from MinION: <https://nanoporetech.com/products/minion>
- Payne, A., Holmes, N., Rakyan, V., Loose, M., & BulkV, F. (2018). A graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics*, 36, 338.
- Pérez-Portela, R., & Riesgo, A. (2013). Optimizing preservation protocols to extract high-quality RNA from different tissues of echinoderms for next-generation sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 884-889.
- Pk Dash. (2013). h. High quality RNA isolation from ployphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). *Biotech*, 109-114.
- Reisch, B., & Pratt, C. (1996). *Grapes. In Fruit breeding. 2nd edition*. New York: Wiley.

- Ricketts , K. D., Gomez , M. I., Atallah , S. S., Fuchs M, M., Martinson , T. E., Battany , M. C., . . . Cooper , M. L. (2015). Reducing the economic impact of Grapevine Leafroll Disease in California: identifying optimal disease management strategies. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66: 138–147.
- Royal Botanic Gardens. (2013). The Plant List: *Vitis*.
- Sanfaçon, H. (2018). Nepoviruses (Secoviridae). *Life Sciences*, 405-413.
- Stobbe , A. H., Daniels, J., Espindola, A. S., Verma , R., Melcher , U., Ochoa-Corona , F., . . . Schneider , W. (2013). E-probe Diagnostic Nucleic acid Analysis (EDNA): a theoretical approach for handling of next generation sequencing data for diagnostics. *J Microbiol Methods.*, 356-366.
- Sudarshana, M. R., Perry, K. L., & Fuchs, M. F. (2015). Grapevine Red Blotch-Associated Virus, an Emerging Threat. *Phytopathology*, 1026-1032.
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2020). *ViralZone*. Retrieved from Nepovirus: https://viralzone.expasy.org/300?outline=all_by_species
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 761-774.
- The Ohio State University. (2021). *Ohio Perennial and Biennial Weed Guide*. Obtenido de Wild Grapes(*Vitis* spp.): https://www.oardc.ohio-state.edu/weedguide/single_weed.php?id=48#:~:text=Distinguishing%20characteristics%20include%20large%20leaves,appearance%20to%20commercially%20available%20grapes.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2013). Phomopsis dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California.

Plant disease, 1571-1579.

- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real time PCR. *Physiol. Educ*, 151-159.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, I., & Briddon, R. W. (2017). Capulavirus and Grablovirus: Two new genera in the family Geminiviridae. *Archives of Virology*.
- Villamor, D. E., Ho, T., Rwahnih, M. A., & Mar, R. R. (2019). High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *APS*.
- Villamor, D. E., Ho, T., Rwahnih, M. A., Martin, R. R., & Tzanetakiz, I. E. (2019). High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and*. doi:<https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW>
- Washington State University. (2016). *Viticulture & Enology*. Obtenido de VIRUS DISEASES: <http://wine.wsu.edu/extension/grapes-vineyards/grape-diseases/virus-diseases/>
- Whitham, S. A., Yang, C., & Goodin, M. M. (2006). Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant-Microbe Interact* 19, 1207–1215.
- Wine Institute. (2019). *United States Wine and Grape Industry FAQs*. Obtenido de General Industry Stats: <https://wineamerica.org/policy/by-the-numbers/>
- World Organisation for Animal Health. (2019). *OIE-Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. 2019.
- Xiao, H., Shabanian, M., Moore, C., Li, C., & Meng, B. (2018). Survey for major viruses in commercial *Vitis vinifera* wine grapes in Ontario. *Virol Journal*, 15: 127.
- Zhao, F., Hwang, U. S., Lim, S., Yoo, R. H., Igori, D., Lee, S. H., . . . J, S. M. (2015). Complete genome sequence and construction of infectious full-length cDNA

clones of tobacco ringspot Nepovirus, a viral pathogen causing bud blight in soybean. *Virus Genes*, 163–166.

Zherdev, A. V., Vinogradova, S. V., Nadezhda, B. A., Porotikova, E. V., Anastasia, M. K., & Dzantiev, B. B. (2018). Methods for the Diagnosis of Grapevine Viral Infections: A Review. *Agriculture*.