



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

Trabajo de Titulación, Previo a la Obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

**“Evaluación de la técnica de secuenciación de alto rendimiento
TASPERT (Target-Specific Reverse Transcript) en la detección de
PVY (Potato Virus Y), TMV (Tobacco Mosaic Virus) y TBSV
(Tomato Bushy Stunt Virus) en *Solanum lycopersicum* L.”**

Elaborado por
Paredes Villafuerte, Gabriela Stefany

Director
Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D

Fecha
18 de agosto del 2023



Tabla de contenido

1

Introducción

2

Objetivos

3

Materiales y métodos

4

Extracción de ARN

5

Secuenciación con Minlon-ONT

6

Comparación mediante PCR Multiplex

7

Conclusiones y recomendaciones



Introducción- Enfermedades virales

No es posible controlar las enfermedades virales directamente mediante el uso de viricidas

Se emplean estrategias indirectas como:

Eliminación de las plantas enfermas

Reducción de los insectos vectores.

Evitar la siembra de semillas infectadas.

Métodos de detección e identificación de virus son fundamentales para el manejo de las enfermedades virales.



Estos métodos deben ser:

- Convenientes
- Efectivos
- Específicos
- Rápidos

(Alemu, 2015)

Los métodos de detección pueden ser por:

- Sintomatología
- Plantas diferenciales
- Serología- ELISA
- Métodos moleculares- PCR
- Secuenciación de alto rendimiento (HTS)

(Bernal, 2010)

Inconvenientes- limitaciones

- Empírico y resultados poco fiables
- Tiempo y espacio
- Ventana de seroconversión
- Especificidad y sensibilidad limitada
- Análisis de datos

(Alemu, 2015)



Introducción- Detección

Secuenciación de alto rendimiento (HTS)



Permite leer de millones de secuencias (*reads*) de forma simultánea



En un tiempo relativamente corto y a un menor costo por base

(Wei et al., 2018).

(Maitra et al., 2012)



2001

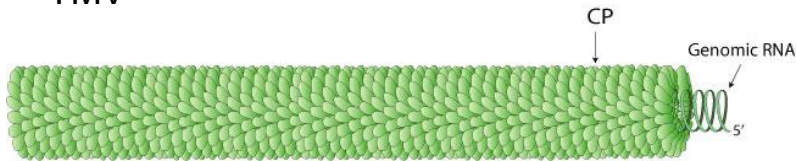
2013

\$ 8000 dólares

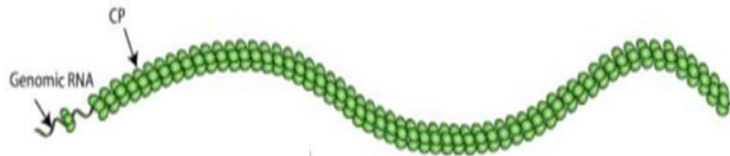
\$ 0.10 centavos

(Mikheyev & Tin, 2014)

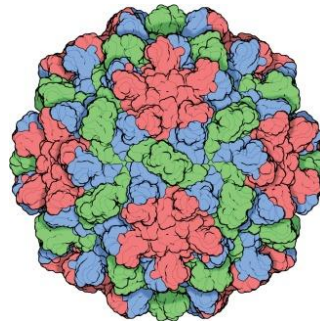
TMV



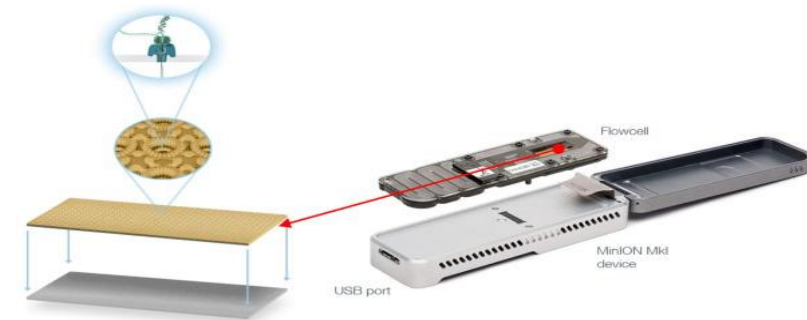
PVY



TBSV



2014



(Oxford Nanopore Technologies, 2022)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

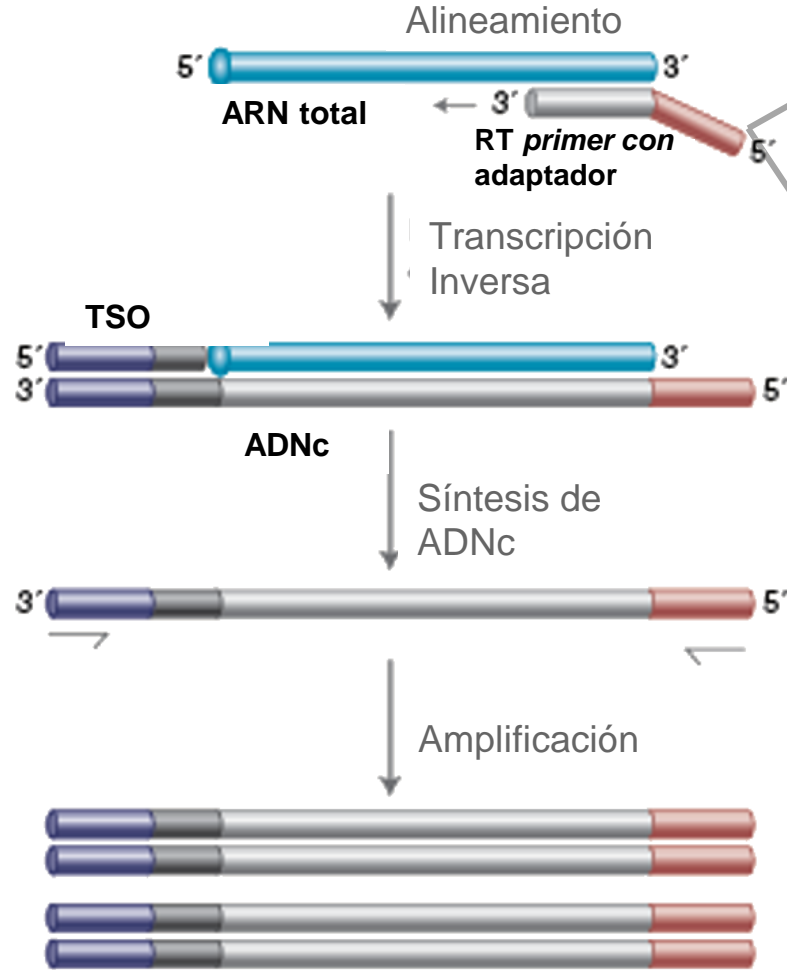
Introducción- TASPERT

Target-Specific Reverse Transcript (por sus siglas en inglés)

1) Alineamiento

2) Transcripción inversa (RT)

3) Amplificación



RT Primers

- Primer Flap
- Primer de literatura
- Primer Two Steps

Adaptador opcional al final de 5'

- 1) 3 minutos 70C
- 2) 90 minutos at 42°C
5 minutos at 85°C
- 3) 2h y 30 minutos



© Bio-Rad Laboratories. (2023)

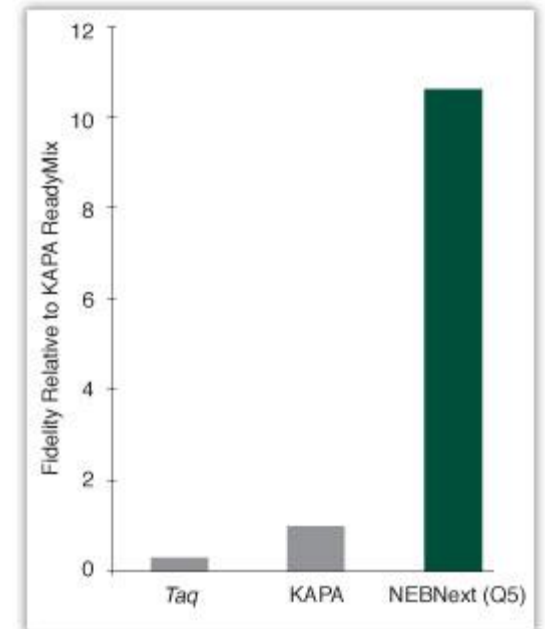


Tabla de contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Materiales y métodos

4 Extracción de ARN

5 Secuenciación con Minlon-ONT

6 Comparación mediante PCR Multiplex

7 Conclusiones y recomendaciones



Objetivo General

Evaluar de la técnica de secuenciación de alto rendimiento TASPERT (TARget-SPECific Reverse Transcript) en la detección de PVY (Potato Virus Y), TMV (Tobacco Mosaic Virus) y TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus) en *Solanum lycopersicum* L.

Objetivos específicos

Extraer material genético de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con PVY, TMV y TBSV, con calidad suficiente para el uso de tecnología Nanopore-MinION en TASPERT

Detectar a los virus PVY, TMV y TBSV mediante la técnica de Target-Specific Reverse Transcript (TASPERT) pool.

Comparar la técnica TASPERT con PCR Multiplex en la detección de los virus PVY, TMV y TBSV.

Tabla de contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Materiales y métodos

4 Extracción de ARN

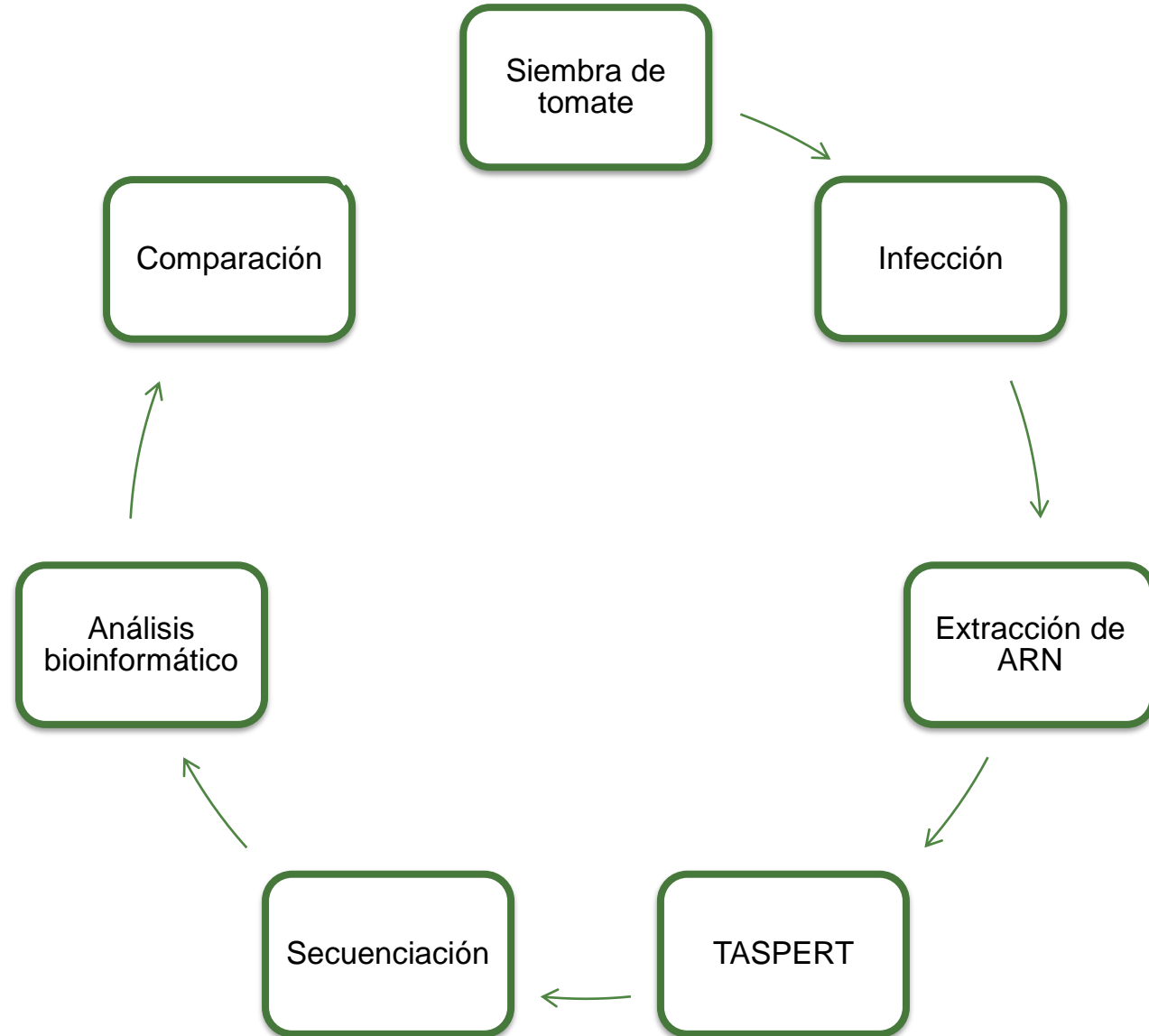
5 Secuenciación con Minlon-ONT

6 Comparación mediante PCR Multiplex

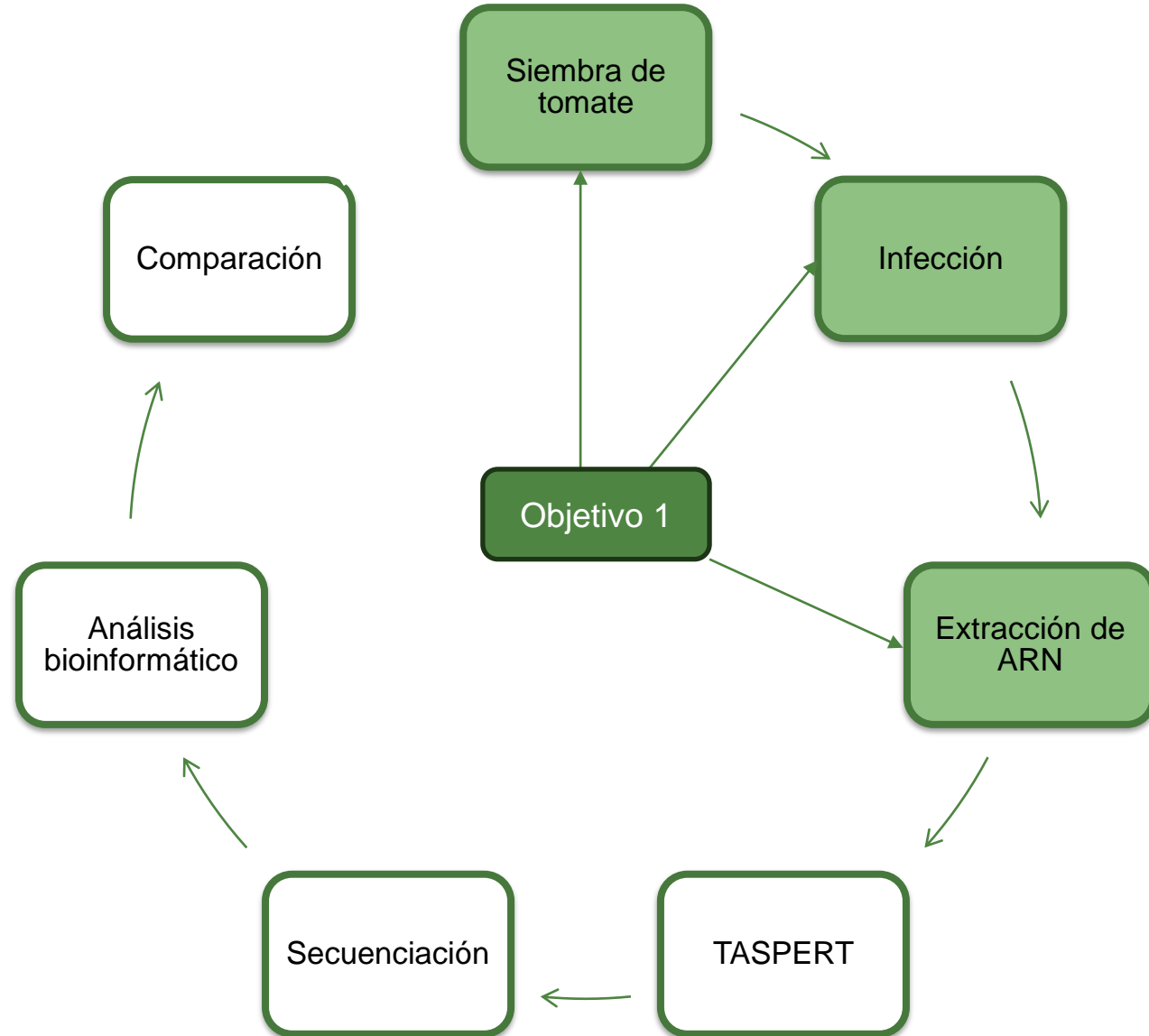
7 Conclusiones y recomendaciones



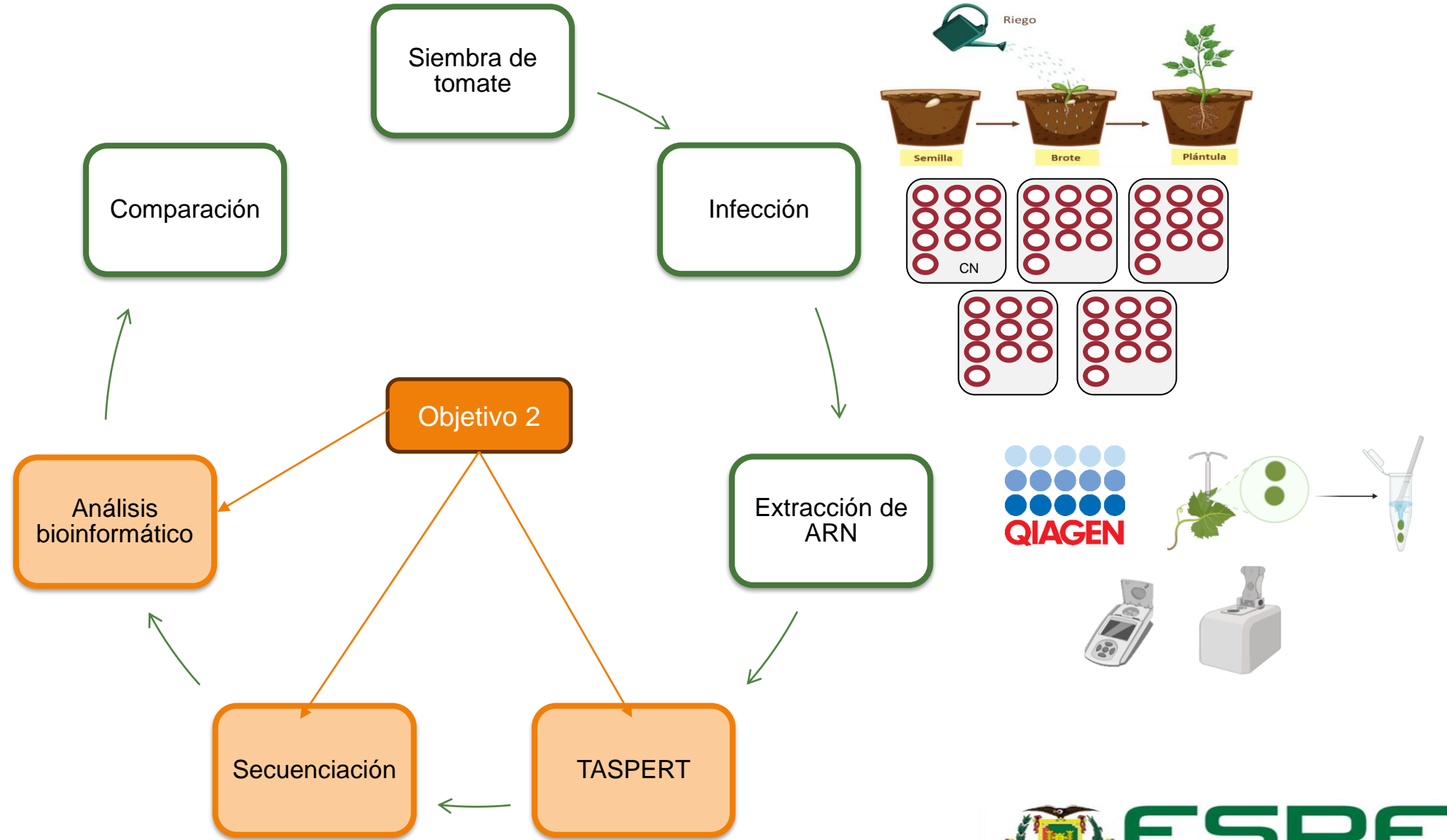
Material es y métodos



Material es y métodos



Material es y métodos

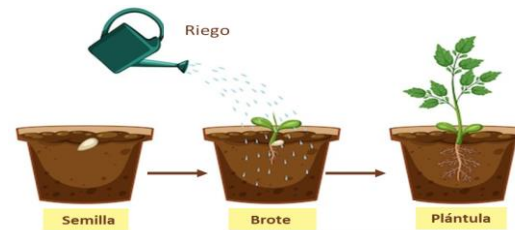


Material es y métodos

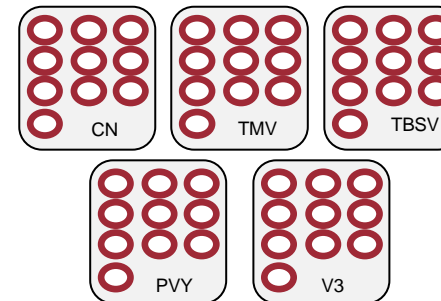
- Primer Flap
- *Primer Two Steps*
- Primers de literatura

Vs • Gold Standard

Siembra de tomate



Infección



Objetivo 3

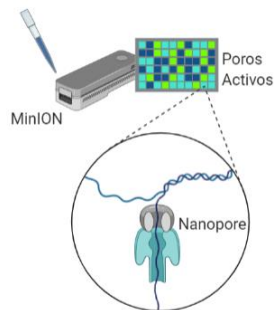
Extracción de ARN



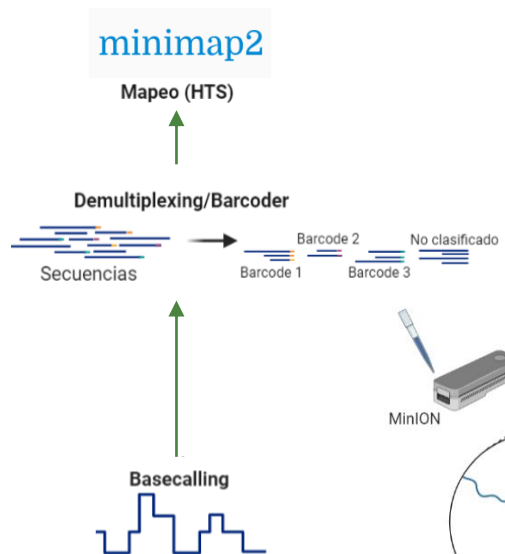
TASPERT

- Primer Flap
- *Primer Two Steps*
- Primers de literatura

Secuenciación



Análisis bioinformático



Comparación

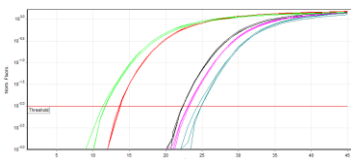


Tabla de contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Materiales y métodos

4 Extracción de ARN

5 Secuenciación con MinIon-ONT

6 Comparación mediante PCR Multiplex

7 Conclusiones y recomendaciones

Extraer material genético de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con PVY, TMV y TBSV, con calidad suficiente para el uso de tecnología Nanopore-MinION en TASPERT



Resultados- *Siembra y síntomas*

Siembra y
síntomas

Extracción/
Cuantificación

Pureza

Integridad

Mosaico

Arrugamiento

Necrosis

Síntomas

Sin síntomas visibles	15
--------------------------	----

Necrosis	7
----------	---

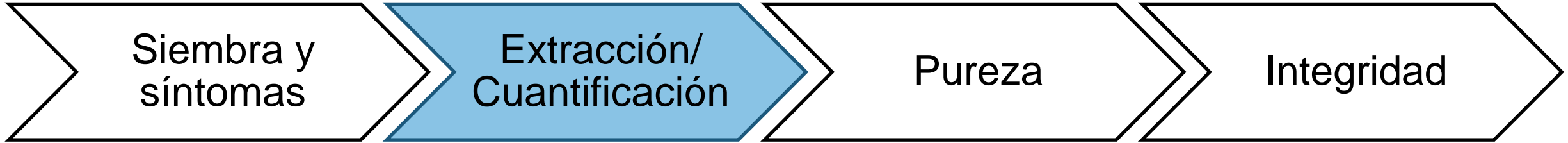
Moteado Amarillo	17
---------------------	----

Arrugamiento	16
--------------	----

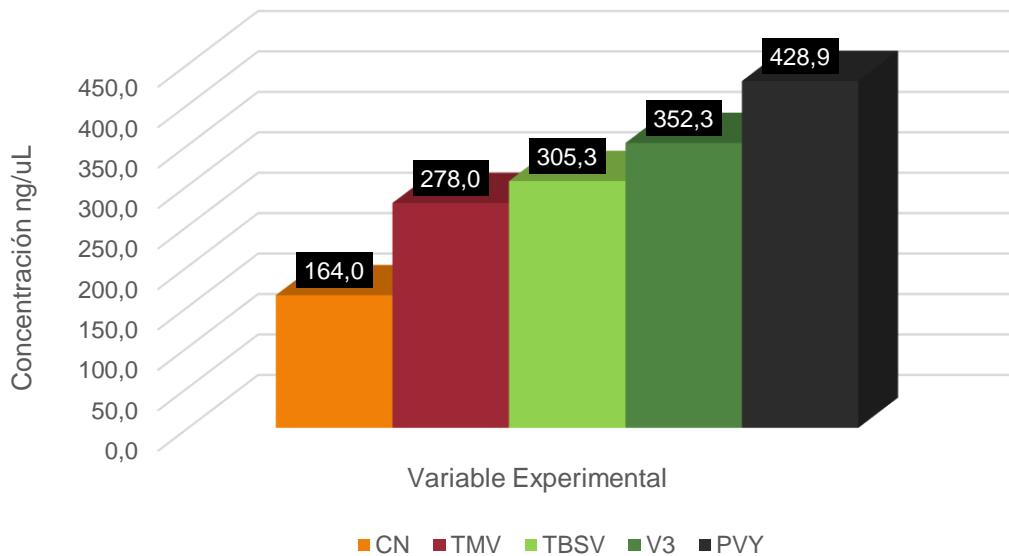
Falta de crecimiento	10
-------------------------	----



Resultados- Extracción y cuantificación



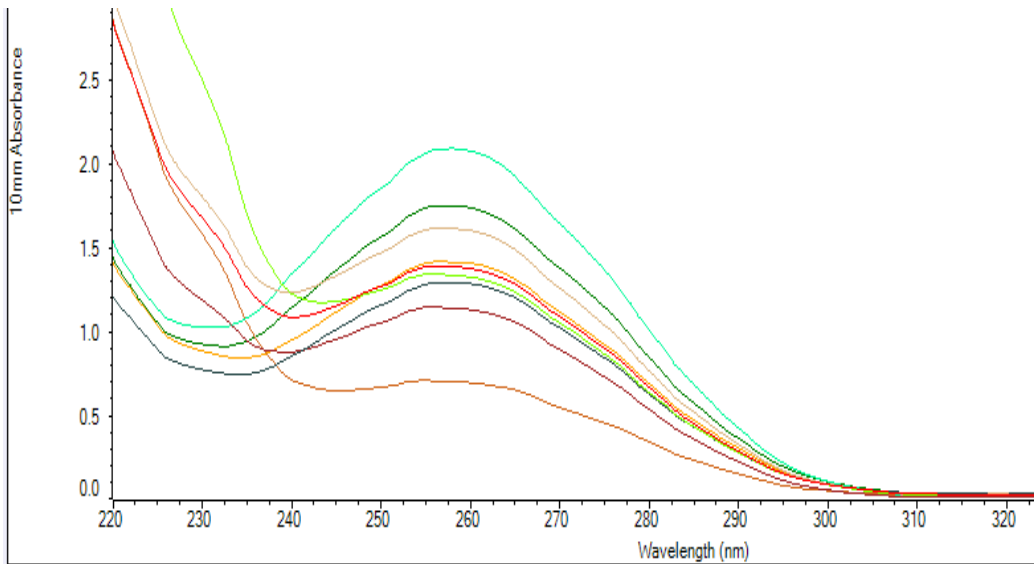
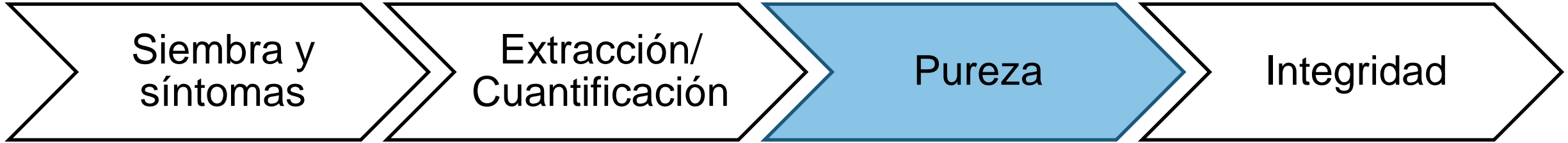
Cuantificación de ARN



	Síntomas	Extracción
Sin síntomas visibles	15	297,30 ng/μl
Necrosis	7	
Moteado Amarillo	17	
Arrugamiento	16	
Falta de crecimiento	10	

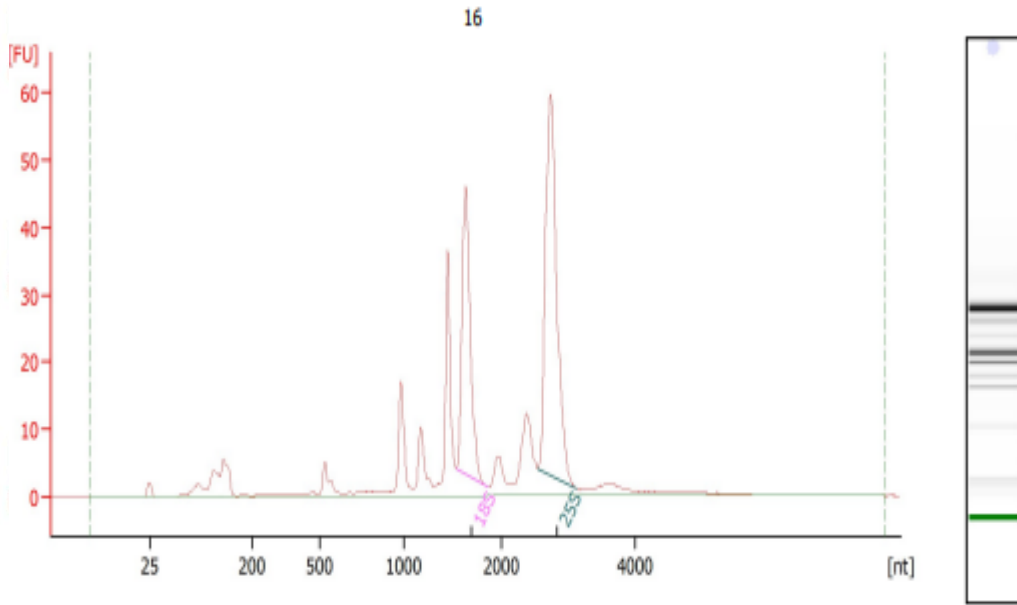
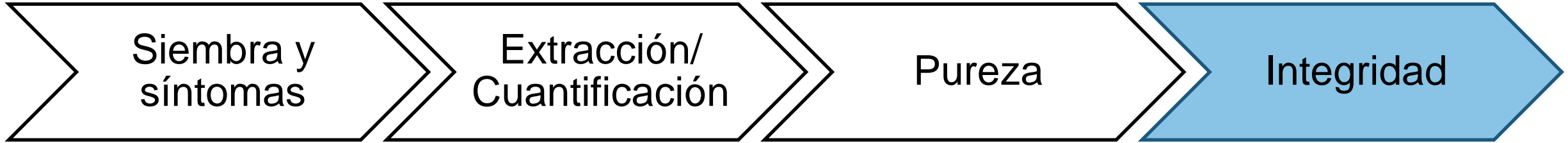


Resultados- Pureza



	Síntomas	Extracción	Pureza
Sin síntomas visibles	15	297,30 ng/μl	260/280: 2 260/230: 1,9
Necrosis	7		
Moteado Amarillo	17		
Arrugamiento	16		
Falta de crecimiento	10		

Resultados- Integridad



rRNA Ratio [25s / 18s]: 1.8

	Síntomas	Extracción	Pureza	Integridad
Sin síntomas visibles	15	297,30 ng/μl	260/280: 2 260/230: 1,9	6.5
Necrosis	7			
Moteado Amarillo	17			
Arrugamiento	16			
Falta de crecimiento	10			

Tabla de contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Materiales y métodos

4 Extracción de ARN

5 Secuenciación con Minlon-ONT

6 Comparación mediante PCR Multiplex

7 Conclusiones y recomendaciones

Detectar a los virus PVY, TMV y TBSV mediante la técnica de Target-Specific Reverse Transcript (TASPERT) pool.



Resultados- Secuenciación

Diseño de primers

Diseño de primer	Nombre	TMV	Nombre	PVY	Nombre	TBSV
* Primer Flap	TMV-6-t	TGGGCCCTACCGGSGGTAA	PVY-6-t	TTTTTTTTTTTTTTTTGTCTCCTGATTGAAGTTTACAG	TBSV-6-t	GGGCTGCATTTCTGCAATGT
Primer Two Steps	TMV-6	TGGGCCCTACCGGSGGTAACG	PVY-6	GTCTCCTGATTGAAGTTTACAG	TBSV-6	GGGCTGCATTTCTGCAATGTTT
	TMV-6-a	GGGGGATTCGAACCCCTC	PVY-6-a	TCACTGYTATGACRRAATCACA	TBSV-6-a	CGGTTGTCCGGTAGTGCTTC
Primer Literatura	TMV-F	GGAAACCTTCACCACAAGT	PVY-F	TGAAAATGGAACCTCGCC	TBSV-F	CGGTTTGTGAGAAGGTTGGG
	TMV-R	TATAGCGCTCCTTATGGC	PVY-R	AATGTGCCATGATTTGCC	TBSV-R	GTTTCGAGGCTGAATCACCC

*AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC

Datos de secuenciación

- Número de reads: 2,44 E+13
- Reads aprobados: 1,88 E+13
- % de aprobados: 77%
- Longitud media de los reads: 382,5
- Calidad de media de alineamiento: 9,25

Parámetros de selección con SQK-DCS109

Parámetro	TMV	PVY	TBSV	<i>Solanum lycopersicum</i> L	
% de cobertura	≥99.95%	≥80,7	≥92.5%	≥0.3	
# de reads	Positivo (+)	≥800	≥400	≥700	≥2100
	Negativo (-)	≤200	≤200	≤200	≤1200
Calidad de alineamiento	≥30	≥30	≥0.1	≥30	
Calidad por base	≥20	≥20	≥19,7	≥20	

Resultados- Detección TMV

OL471714.1: Tobacco mosaic virus isolate TMV BS, complete sequence

M21958.1: Tomato bushy stunt virus complete genome

NC_001554.1: Tomato bushy stunt virus, complete genome

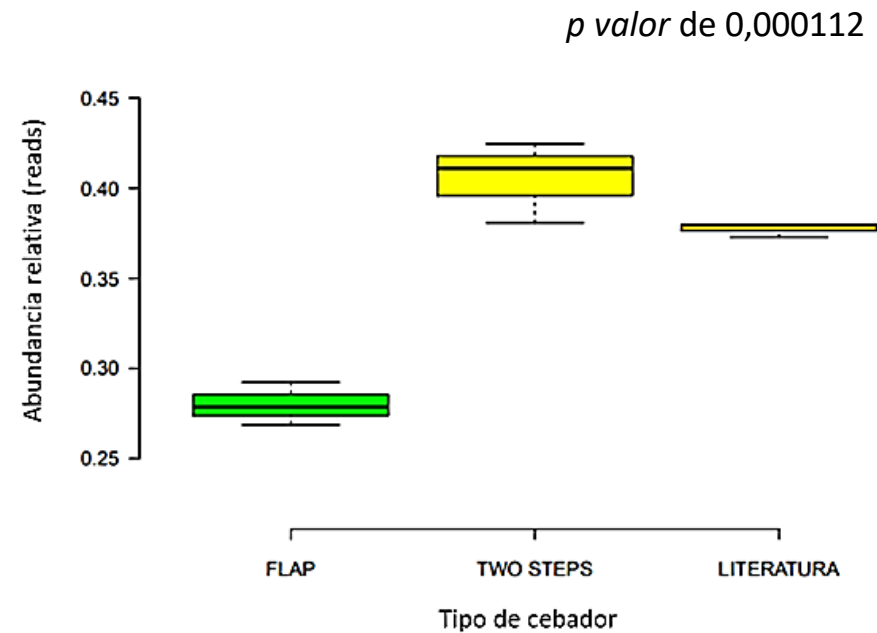
EU563512.1: Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome

NC_007898.3: *Solanum lycopersicum* chloroplast, complete genome

NC_015441.3: *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence

Detección	Mejor primer	Observaciones
TMV	<i>Two Steps</i>	Sin observaciones

Nombre del primer	Número de reads	% de Cobertura	Profundidad de seq	Calidad por base	Calidad de alineamiento
Flap	26444	100	2887,1	20,5	48,3
Two Steps	33014,7	100	5779,5	20,5	52,3
Literatura	18176,33	99,98	1126,9	20	47,57



Resultados- Detección TBSV

OL471714.1: Tobacco mosaic virus isolate TMV BS, complete sequence

M21958.1: Tomato bushy stunt virus complete genome

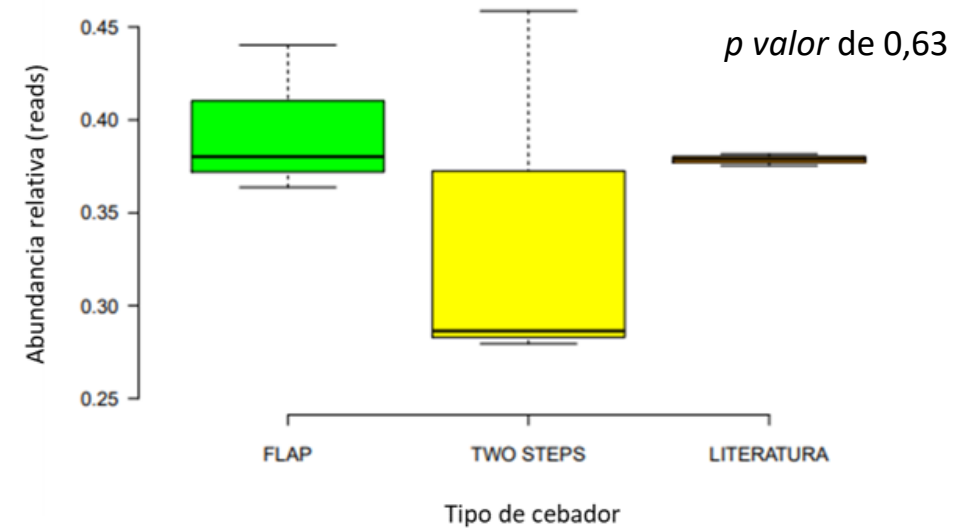
NC_001554.1: Tomato bushy stunt virus, complete genome

EU563512.1: Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome

NC_007898.3: *Solanum lycopersicum* chloroplast, complete genome

NC_015441.3: *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence

Nombre del primer	Número de reads	% de Cobertura	Profundidad de seq	Calidad por base	Calidad de alineamiento
Flap	2520,3	92,8	192,4	19,57	0,81
	2568	96,5	194,3	19,6	1,04
Two Steps	31581	94,8	2262,6	19,5	0,4
	31628	94,4	2274,26	19,37	0,45
Literatura	12439	100	448,8	20	1
	12329	100	447	20	0,9
	1874	17,7	1,9	19,6	6,6



Detección	Mejor primer	Observaciones
TMV	<i>Two Steps</i>	Sin observaciones
TBSV	No se encontró diferencias significativas	<i>Two Steps</i> logró mayor profundidad de secuenciación



Resultados- Detección PVY

OL471714.1: Tobacco mosaic virus isolate TMV BS, complete sequence

M21958.1: Tomato bushy stunt virus complete genome

NC_001554.1: Tomato bushy stunt virus, complete genome

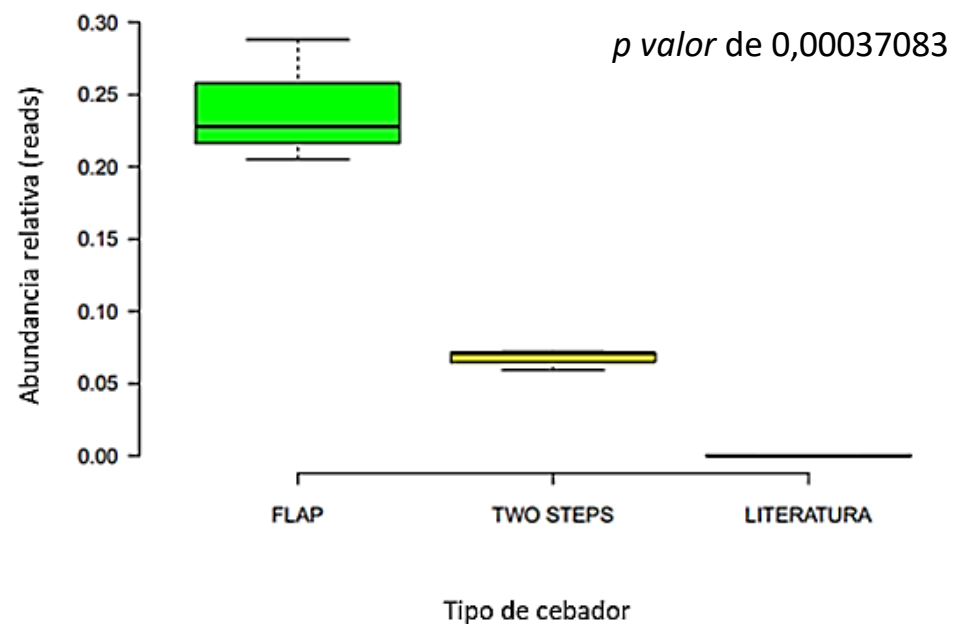
EU563512.1: Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome

NC_007898.3: *Solanum lycopersicum* chloroplast, complete genome

NC_015441.3: *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence

Detección	Mejor primer	Observaciones
TMV	<i>Two Steps</i>	Sin observaciones
TBSV	No se encontró diferencias significativas	El primer <i>Two Steps</i> logró una mayor profundidad
PVY	Flap	Sin observaciones

Nombre del primer	Número de reads	% de Cobertura	Profundidad de seq	Calidad por base	Calidad de alineamiento
Flap	1802,3	92,4	148,7	20	35,5
Two Steps	568,3	99,3	22,2	20,4	39,3
Literatura	26444	100	2887,1	20,5	48,3



Resultados- Detección CN

OL471714.1: Tobacco mosaic virus isolate TMV BS, complete sequence

M21958.1: Tomato bushy stunt virus complete genome

NC_001554.1: Tomato bushy stunt virus, complete genome

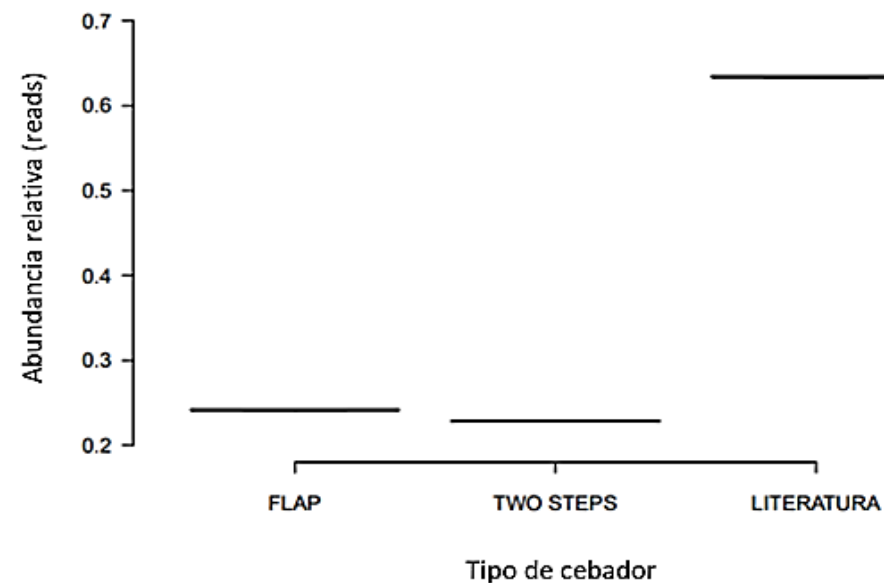
EU563512.1: Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome

NC_007898.3: *Solanum lycopersicum* chloroplast, complete genome

NC_015441.3: *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence

Detección	Mejor primer	Observaciones
TMV	<i>Two Steps</i>	Sin observaciones
TBSV	No se encontró diferencias significativas	<i>Two Steps</i> logró mayor profundidad de secuenciación
PVY	Flap	Sin observaciones

Nombre del primer	Número de reads	% de Cobertura	Profundidad de seq	Calidad por base	Calidad de alineamiento
Flap	2553	0,37	0,008691	21,3	48,8
	302	91,9668	34,6481	20,8	48
<i>Two Steps</i>	2186	0,36	0,00793573	21,5	49
	261	99,2484	29,1223	20,7	48,6
Literatura	2611	0,33	0,00985357	20,8	51,8
	215	99,953	21,609	20	45,3



Resultados- Detección V3

OL471714.1: Tobacco mosaic virus isolate TMV BS, complete sequence

M21958.1: Tomato bushy stunt virus complete genome

NC_001554.1: Tomato bushy stunt virus, complete genome

EU563512.1: Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome

NC_007898.3: *Solanum lycopersicum* chloroplast, complete genome

NC_015441.3: *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence

Nombre del primer	Número de reads	% de Cobertura	Profundidad de seq	Calidad por base	Calidad de alineamiento
Two Steps	18176	100	1127	20	48
	542	97,27	34,55	19,35	0,09
Literatura	1854	90,98	105.658	19.8	39,9
	8327	99.8	448.366	19.2	0,05

Tabla de contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Materiales y métodos

4 Extracción de ARN

5 Secuenciación con Minlon-ONT

6 Comparación mediante PCR Multiplex

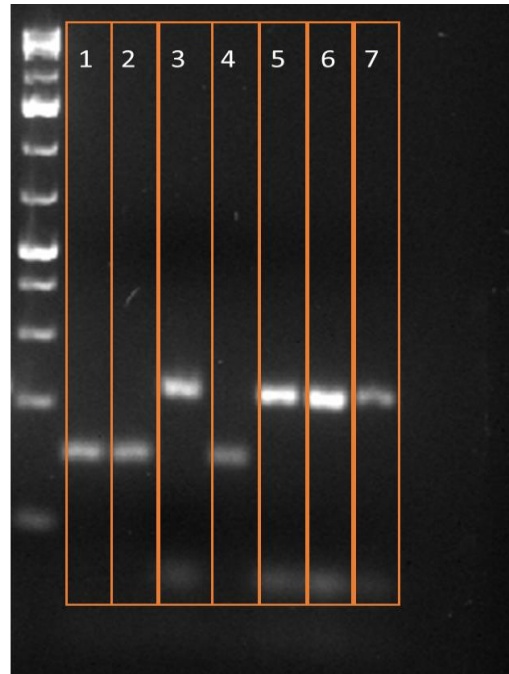
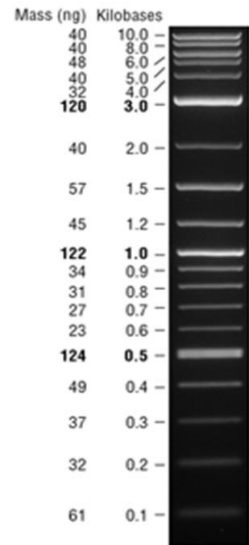
7 Conclusiones y recomendaciones

Comparar la técnica TASPERT con PCR Multiplex en la detección de los virus PVY, TMV y TBSV.



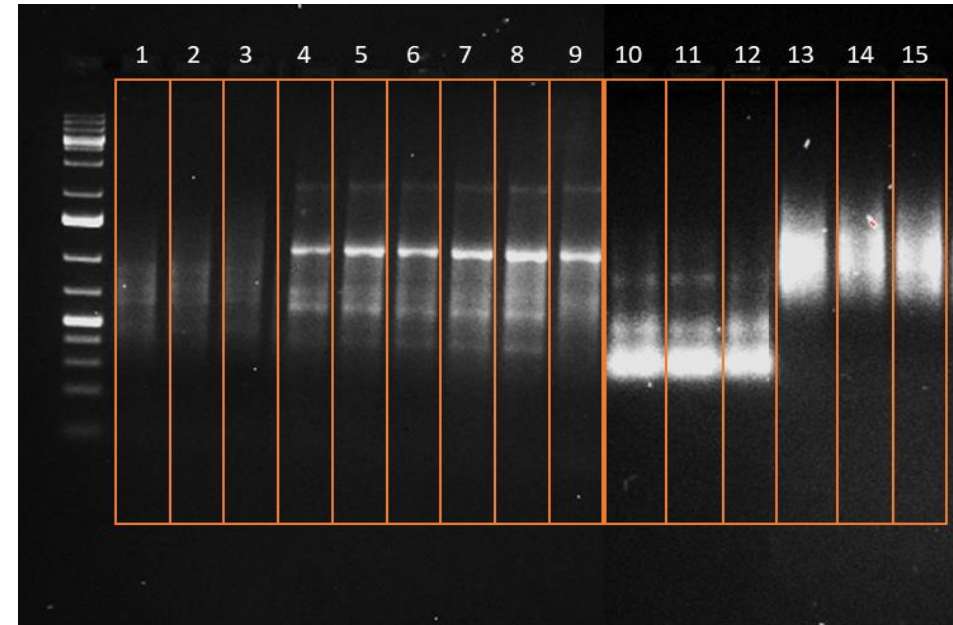
Resultados- Multiplex

Síntesis de ADNc de doble cadena con Random Hexamers



1. TMV
2. TBSV
3. PVY
4. CN
5. PVY
6. V3
7. V3

Síntesis de ADNc de doble cadena con primers diseñados para TASPERT



- | | | |
|-----------|------------|------------|
| 1. CN F | 6. TMV L | 11. PVY TS |
| 2. CN TS | 7. TBSV F | 12. PVY L |
| 3. CN L | 8. TBSV TS | 13. V3 F |
| 4. TMV F | 9. TBSV L | 14. V3 TS |
| 5. TMV TS | 10. PVY F | 15. V3 L |

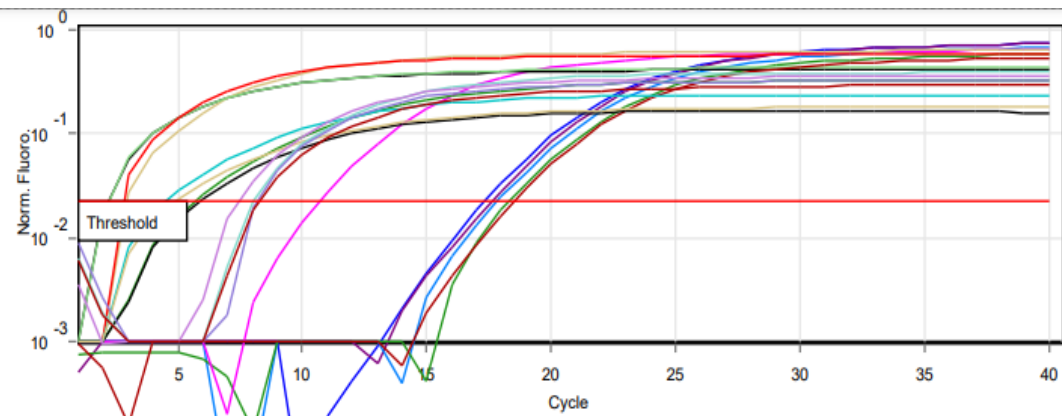
Nota: (F) Flap, (TS) Two Steps, (L) Literatura. Modificado de Imagen Lab por © Bio-Rad Laboratories, 2023



Resultados- q-PCR

Virus	Ct		Tm
	+	-	
TMV	2,31	25,47	78,22
TBSV	11,42	22,28	83,53
PVY	14,5	24,7	80,45

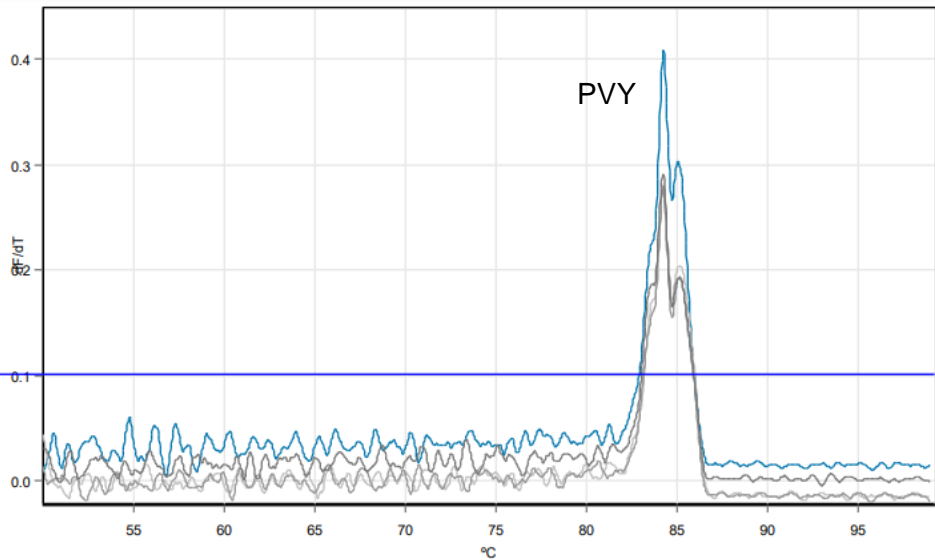
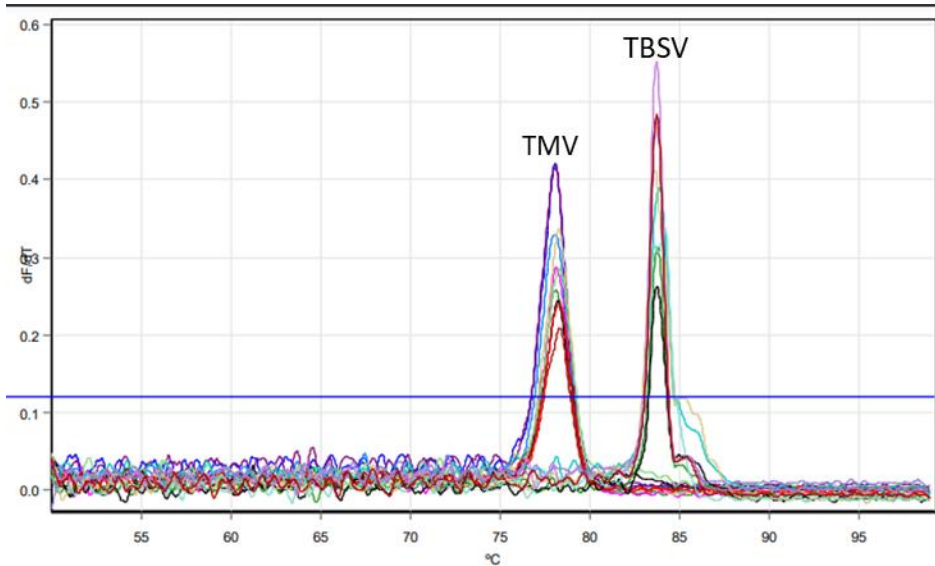
} ± 1°C



Virus	Tipo de primer				Tipo de primer			
	Ct [ciclos]				Tm [°C]			
	TS	Flap	Literatura	GS	TS	Flap	Literatura	GS
TMV	6,34	1,95	2,65	13,79	78,01	78,32	78,22	78,85
TBSV	5,84	6,59	7,53	15,82	83,76	82,83	83,71	83,98
PVY	28,04	27,69	21,35	21	83,3	83,61	83,53	82,9
CN _{PVY}	24,375	24,335	11,76	28,335	SD	SD	83,7	SD
CN _{TMV}	10,435	13,515	7,695	12,915	78,125	78,18	SD	77,98
CN _{TBSV}	26,3	20,45	23,31	20,29	84,14	SD	84,12	SD
V3 _{TMV}	SD	5,24	8,83	21,98	SD	78,53	SD	79,22
V3 _{TBSV}	24,76	15,76	7,07	12,2	83,99	84,1	84,03	84,72
V3 _{PVY}	13,13	6,58	12,51	SD	84,7	SD	84,69	SD



Resultados- q-PCR



Virus	Tipo de primer				Tipo de primer			
	Ct [ciclos]				Tm [°C]			
	TS	Flap	Literatura	GS	TS	Flap	Literatura	GS
TMV	6,34	1,95	2,65	13,79	78,01	78,32	78,22	78,85
TBSV	5,84	6,59	7,53	15,82	83,76	82,83	83,71	83,98
PVY	28,04	27,69	21,35	21	83,3	83,61	83,53	82,9
CN _{PVY}	24,375	24,335	11,76	28,335	SD	SD	83,7	SD
CN _{TMV}	10,435	13,515	7,695	12,915	78,125	78,18	SD	77,98
CN _{TBSV}	26,3	20,45	23,31	20,29	84,14	SD	84,12	SD
V3 _{TMV}	5,24	SD	8,83	21,98	78,53	SD	SD	79,22
V3 _{TBSV}	15,76	24,76	7,07	12,2	83,99	84,1	84,03	84,72
V3 _{PVY}	13,13	6,58	12,51	SD	84,7	SD	84,69	SD



Resultados- Comparación

Sanger para q-PCR

Virus	Forward	Reverse
TMV	GGAAACCTTCACCACAAGT	TATAGCGCTCCTTATGGC
TBSV	CGGTTTGTGAGAAGGTTGGG	GTTTCGAGGCTGAATCACCC
PVY	TGAAAATGGAACCTCGCC	AATGTGCCATGATTTGCC

Virus	Tipo de primer			Tipo de primer		
	Secuenciación			q-PCR		
	TS	Flap	Literatura	TS	Flap	Literatura
TMV	+	+	+	+	+	+
TBSV	+	+	+	+	+	+
PVY	+	+	+	F-N	F-N	F-P
CN _{PVY}	-	-	-	-	-	F-P
CN _{TMV}	+	+	+	+	+	+
CN _{TBSV}	-	-	-	-	-	F-P
V3 _{TMV}	+	-	+	+	-	F-N
V3 _{TBSV}	+	-	+	+	-	+
V3 _{PVY}	-	-	-	-	-	-

Tabla de contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Materiales y métodos

4 Extracción de ARN

5 Secuenciación con MinIon-ONT

6 Comparación mediante PCR Multiplex

7 Conclusiones y recomendaciones



Conclusiones

1. TASPERT permite secuenciar muestras con parámetros de calidad estándar con confiabilidad, demostrando eficacia en la detección de patógenos mediante el uso de Minlon de ONT

2. TASPERT mejora la detección de virus en plantas superando límites de q-PCR, identificando cepas específicas y adaptaciones genéticas.

3. TASPERT muestra sensibilidad y especificidad significativas, reduciendo falsos negativos en comparación con técnicas tradicionales.



Agradecimientos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**FERGUSON COLLEGE
OF AGRICULTURE**

Francisco J. Flores Flor, PhD.
Tutor de tesis



Andrés Espíndola, PhD
Cotutor de tesis



Francisco Ocho Corona, PhD.
Asesor externo



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA