

Resumen

La detección de patógenos virales ha evolucionado a lo largo del tiempo, desde de métodos empíricos hasta diagnósticos más avanzados como q-PCR y Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS). En esta investigación, se evaluó la técnica de secuenciación de alto rendimiento TArget-Specific Reverse Transcript (TASPERT) utilizando el dispositivo MinIon para detectar virus en plantas de tomate. Para ello, se cultivó e inoculó plantas de tomate con Potato Virus Y (PVY), Virus del mosaico del tabaco (TMV) y Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) de manera independiente y simultánea. Luego, se extrajo el ARN utilizando el kit de Qiagen y se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo. Después, se seleccionaron las mejores muestras para la síntesis de ADNc utilizando diferentes tipos de *primers* diseñados para el protocolo de TASPERT, como *primer Flap*, *Two Steps* y *primers* de literatura. La preparación de librerías de ADNc se realizó con el kit Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) para la secuenciación. Los datos generados fueron recopilados y clasificados utilizando el software minimap2. Se seleccionaron las plantas inoculadas que mostraban síntomas de infección viral para la extracción y secuenciación de ARN. Mediante la secuenciación con TASPERT, se logró detectar los virus inoculados con una cobertura de genoma superior al 95%, independientemente del tipo de cebador utilizado. Sin embargo, existió diferencias significativas en la abundancia relativa de las secuencias virales según el tipo de *primer*. El *primer Flap* mostró una mayor abundancia relativa para PVY, *Two Steps* para TMV, y no se encontraron diferencias en el caso de TBSV. Finalmente, se comparó el ADNc sintetizado con TASPERT con el ADNc sintetizado con el *Gold Standard* mediante q-PCR y este generó falsos positivos y negativos, además de tener valores de Ct más altos en comparación con los obtenidos con TASPERT. TASPERT superó al método *Gold Standard* en términos de detección y sensibilidad, lo que lo convierte en una herramienta prometedora para el diagnóstico de enfermedades virales en plantas.

Palabras clave: HTS (secuenciación de alto rendimiento), MinIon, Oxford Nanopore Technologies, diagnóstico molecular, TASPERT (Target-Specific Reverse Transcript).

Abstract

The detection of viral pathogens has evolved over time, from empirical methods to more advanced diagnostics such as q-PCR and High-Throughput Sequencing (HTS). In this research, the high-throughput sequencing technique called Target-Specific Reverse Transcript (TASPert) was evaluated using the Minlon device to detect viruses in tomato plants. To do this, tomato plants were cultivated and inoculated independently and simultaneously with Potato Virus Y (PVY), Tobacco Mosaic Virus (TMV), and Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV). Subsequently, RNA was extracted using the Qiagen kit, and nucleases-free water was used as a negative control. The best samples were then selected for cDNA synthesis using different types of primers designed for the TASPert protocol, such as Flap primer, Two Steps primer, and literature primers. The preparation of cDNA libraries was performed using the Direct cDNA Native Barcoding kit (SQK-DCS109) for sequencing. The generated data were collected and classified using the minimap2 software. Inoculated plants showing symptoms of viral infection were selected for RNA extraction and sequencing. Through TASPert sequencing, the inoculated viruses were successfully detected with a genome coverage of over 95%, regardless of the primer type used. However, there were significant differences in the relative abundance of viral sequences depending on the primer type. Flap primer showed higher relative abundance for PVY, Two Steps for TMV, and no differences were found in the case of TBSV. Finally, the cDNA synthesized with TASPert was compared to the cDNA synthesized with the Gold Standard method using q-PCR, and the latter generated false positives and negatives, as well as higher Ct values compared to those obtained with TASPert. TASPert outperformed the Gold Standard method in terms of detection and sensitivity, making it a promising tool for the diagnosis of viral diseases in plants.

Keywords: HTS (High Throughput Sequencing), Minlon, Oxford Nanopore Technologies, molecular diagnostics, TASPert (TARget-SPECific Reverse Transcript)