



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.

Paredes Villafuerte, Gabriela Stefany

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

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

15 de mayo del 2023

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

MIC-PI-Profesionalizante y Tesis Malla Antigua

NOMBRE DEL ALUMNO

GABRIELA STEFANY PAREDES VILLAFUERTE

NOMBRE DEL ARCHIVO

tesis sin imagenes.docx

SE HA CREADO EL INFORME

30 jun 2023

Resumen

Fragmentos marcados	4	0,4 %
Fragmentos citados o entrecomillados	1	0,1 %

Coincidencias de la Web

scielo.org.co	2	0,3 %
nih.gov	1	0,1 %
medigraphic.com	1	0,1 %
genome.jp	1	0,1 %

1 de 5 fragmentos

Fragmento del alumno

MARCADO

...a nuevos enfoques para la detección de virus. Estos **métodos se basan en el uso de microscopía electrónica, técnicas serológicas y enfoques moleculares**

Mejor coincidencia en la Web

Actualmente, existen diferentes **métodos** orientados a la detección de virus, los cuales **se basan en el empleo de microscopía electrónica, en técnicas serológicas y en enfoques moleculares.**

Evaluación de métodos para la inoculación y diagnóstico del virus ... http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612021000100092

2 de 5 fragmentos

Fragmento del alumno

MARCADO

Las técnicas serológicas tienen una baja sensibilidad, lo cual provoca inconvenientes en la detección viral y finalmente las técnicas moleculares ofrecen una detección más eficiente y sensible,...

[Mejor coincidencia en la Web](#)

La microscopía electrónica es limitante debido a que solo determina la morfología de la partícula viral (), **las técnicas serológicas tienen una sensibilidad limitada, lo cual genera posibles ...**

Evaluación de métodos para la inoculación y diagnóstico del virus ... http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612021000100092

3 de 5 fragmentos

Fragmento del alumno

CITADO

...veces (Tamay de Dios et al., 2013). Los **métodos** específicos utilizan **el principio de Transferencia de Energía por Resonancia** de Fluorescencia (FRET, **por sus siglas en inglés**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

Estos **métodos** siguen **el principio** conocido como «**transferencia de energía de resonancia fluorescente**» (FRET, **por sus siglas en inglés**) para generar la señal; este método consiste.

Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ... <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>

4 de 5 fragmentos

Fragmento del alumno

MARCADO

EU563512.1: **Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome**OL471714.1: Tobacco mosaic virus isolate TMV BS, complete sequenceM21958.1: Tomato...

[Mejor coincidencia en la Web](#)

Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome. DBLINKS. ViralZone: family, genus. Known hosts (4) ...

Potato virus Y strain C <https://www.genome.jp/virushostdb/12217>

5 de 5 fragmentos

Fragmento del alumno

MARCADO

...stunt virus, complete genomeNC_007898.3: Solanum lycopersicum chloroplast, complete genomeNC_015441.3: **Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 chromosome 10, SL3.0, whole genome shotgun sequence 65,633,393 bp linear DNA NC_015447.3 GI:1440910673.

1440910673 - Nucleotide Result - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1440910673>



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “**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.**” fue realizado por la señorita **Paredes Villafuerte Gabriela Stefany**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 3 de junio de 2023



.....
Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

C.C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, Paredes Villafuerte Gabriela Stefany, con cédula de ciudadanía n° 1724440274, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "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." es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 9 de julio de 2023

Paredes Villafuerte Gabriela Stefany
C.C. 1724440274



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Paredes Villafuerte Gabriela Stefany, con cédula de ciudadanía N° 1724440274, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "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." en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 9 de julio de 2023



Paredes Villafuerte Gabriela Stefany
C.C. 1724440274

Dedicatoria

A mis padres, Franklin Vinicio Paredes Coloma y Oliva Emilia Villafuerte García y a mi abuelo José Gabriel Paredes Mora.

Por estar a mi lado en cada paso del camino, brindándome su sabiduría, paciencia y orientación. Han sido mis mentores más valiosos y mi mayor fuente de fortaleza. Su ejemplo de perseverancia y determinación ha sido mi inspiración para superar los desafíos y nunca renunciar a mis sueños. Ustedes han sido mis mayores defensores y me han brindado todas las herramientas necesarias para alcanzar mis metas. Esto es solo un reflejo de todo lo que han sembrado en mí.

Gabriela Stefany Paredes Villafuerte.

“En la profundidad del invierno, aprendí que en mi interior hay un verano invencible.”

(Albert Camus)

Agradecimiento

El primer párrafo sin duda es para Camila Armas y Daniel Carrera porque sin ustedes nada de esta tesis hubiera sido posible; gracias por estar para mí en todo momento, ser una guía los momentos difíciles, fueron una fuente de inspiración y apoyo incondicional. Ustedes se convirtieron en mi familia estando lejos y tienen un lugar, por igual, en mis agradecimientos y en mi corazón. Guardaré todos los momentos buenos y malos, de risas y tristezas, de llanto y alegrías para contar cuando me pregunten por mi experiencia en Stillwater porque ustedes son y serán una parte fundamental de mi vida en ese lugar.

A mi familia por ayudarme y entenderme en todo mi proceso académico, gracias por poner atención a las cosas que les contaba a pesar de que no tuvieran idea del tema y les agradezco por poner empeño en averiguar de qué iba mi carrera.

A mi tía por recibirme en casa siempre con un plato de comida en el tiempo que viví con usted.

A mi abuelo, aunque ya no estas en este mundo para verme graduada como ingeniera, muchas de tus palabras se quedaron grabadas en mi corazón y siempre serás mi ejemplo de perseverancia.

A Carolaine Arias por ser una compañera de lucha, mi paño de lágrimas y también por ser una de las personas con la que más me he divertido en mi carrera y a Felipe López por abrirme las puertas de tu casa y por todas las veces que nos sentamos a conversar, tu forma de ver la vida es muy linda. Eres como un guía espiritual.

A mis amigos de último semestre Stefany Recalde por ser la mejor alcahueta y confidente que he tenido y a Roberto Cobo, Juan Hidrovo, Jefferson Palomo, Diego Portilla, Esteban Proaño y Erly Melo porque nos unimos de una forma muy particular y sin buscar nada tuvimos momentos increíbles.

A todos los amigos que hice dentro y fuera de la carrera especialmente a Mikaela Pérez, Dome Andrade, Daniela Acurio, Denisse Ortiz, Dome Vargas, Joselyn Castro, Fernando Montes, Christian Ibarra, Emilio Raza porque cada uno aportó con un granito de arena en mi vida.

A mis amigas del colegio Fiorela Saltos y Damaris Zurita que, aunque estuvimos separadas por años nunca se perdió la confianza y la complicidad, espero tenerles en mis agradecimientos de bodas.

A los docentes, Alma Koch, Luis Escobar, María Augusta Chávez, Lucía Jiménez por ser apasionados en sus materias y explicar tan bonito temas complejos.

Al PhD Francisco Flores por mantener el vínculo con OSU, guiarme y corregirme en mi elaboración de tesis.

Al PhD Francisco Ochoa Corona por toda su sabiduría, sus consejos cambiaron mucho la forma de ver el panorama de la vida y por siempre preocuparse por mi seguridad, confort y tranquilidad en Stillwater.

Gracias a la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas y a todo su personal docente por impartir sus conocimientos.

Finalmente, pero no menos importantes a mis gatos que su mera existencia llenaba mi vida de alegría y pelitos.

Contenidos

Paredes Villafuerte Gabriela Stefany	1
Resumen	20
Capítulo I: Introducción.....	22
Antecedentes	22
Justificación.....	23
Objetivos de grado	24
Objetivo General	24
Capitulo II: Revisión Bibliográfica	25
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	25
Enfermedades que afectan al cultivo de <i>Solanum lycopersicum</i> L.	26
Enfermedades virales y propagación	27
Tobacco mosaic virus (TMV)	29
Potato Virus Y (PVY)	32
Tomato bushy stunt virus (TBSV)	33
Técnicas de detección de enfermedades virales	34
Detección por sintomatología	35
Detección por plantas diferenciales	36
Detección por serología	37
Detección por métodos moleculares- PCR	38

Detección por secuenciación	40
Secuenciación de alto rendimiento (HTS)	41
Minlon -Oxford Nanopore Technologies.....	41
TASPERT	43
Capítulo III Metodología	45
Instituciones participantes	45
Siembra de <i>Solanum lycopersicum</i> L	45
Infección de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	46
Extracción de ARN total	47
Parámetros de calidad del ARN total	47
Diseño de <i>primers</i>	49
Síntesis de ADNc-dc (TASPERT)	51
Cuantificación de ADNc-dc.....	52
Secuenciación con MinION-ONT	53
Análisis estadístico entre tratamientos con diferentes <i>primers</i>	55
Reacción en cadena de polimerasa multiplex PCR-Multiplex.....	55
Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR)	59
Validación de la técnica de TASPERT	60
Capitulo IV: Resultados	62
Siembra e infección de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	62

Extracción de ARN total y parámetros de calidad	63
Diseño de <i>primers</i>	67
Síntesis de ADNc-dc mediante TASPERT y cuantificación.....	69
Secuenciación con MinION-ONT como método de diagnóstico.....	70
PCR Multiplex como método de diagnóstico	82
Comparación de diagnóstico con reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) y TASPERT.	84
Capítulo V: Discusión	92
Capítulo VI: Conclusiones.....	99
Capítulo VII: Recomendaciones.....	100
Capítulo VIII: Bibliografía.....	102
Capítulo IX: Apéndice.....	111

Índice de tablas

Tabla 1 Enfermedades de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	27
Tabla 2 Disposición de reactivos y pasos necesarios para realizar TASPERT.....	51
Tabla 3 Parámetros para obtener los genomas de referencia en NCBI.....	55
Tabla 4 Síntesis de ADNc-dc con random primers.....	55
Tabla 5 Volumen añadido por reactivo.....	57
Tabla 6 Primers por género para PVY, TMV y TBSV.....	58
Tabla 7 Parámetros de amplificación de q-PCR para PVY, TMV, TBSV.....	59
Tabla 8 Disposición de reactivos de q-PCR para PVY, TMV y TBSV.....	60
Tabla 9 Síntomas presentados por cada virus en <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	62
Tabla 10 Datos del Número de Integridad del ARN de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	64
Tabla 11 Muestras seleccionadas para el diagnóstico de PVY, TMV y TBSV.....	66
Tabla 12 Primers con Flap.....	67
Tabla 13 Primers Two Steps.....	68
Tabla 14 Primers de literatura para PVY TMV y TBSV.....	68
Tabla 15 Primer para <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	69
Tabla 16 Cuantificación con el sistema QuantiFluor® ONE dsDNA.....	69
Tabla 17 Datos obtenidos después de la secuenciación de muestras tratadas con TASPERT.....	71
Tabla 18 Parámetros de selección con SQK-DCS109.....	77
Tabla 19 Promedio de los datos recogidos por réplica de cada variable experimental después de establecer los parámetros de diagnóstico.....	78
Tabla 20 Tabla de resumen de la efectividad de los primers luego del análisis estadístico.....	81

Tabla 21 Valores obtenidos de los controles positivos y negativos de TMV, PVY y TBSV	84
Tabla 22 Valores de Ct y Tm obtenidos con diferentes tipos de primers comparados con el Gold Estándar mediante q-PCR	84
Tabla 23 Resultados obtenidos de secuenciación con Sanger	89
Tabla 24 Organismos detectados con Minlon y q-PCR.....	91

Índice de figuras

Figura 1 Pasos que se dan dentro de la célula durante la replicación de TMV	28
Figura 2 Organismos vectores para la transmisión de enfermedades	29
Figura 3 Estructura del género Tobamovirus	30
Figura 4 Movimiento intercelular de TMV desde una célula infectada a una sana.....	30
Figura 5 Síntomas de infección por TMV en plantas de tomate	31
Figura 6 Estructura del género Potyvirus.....	32
Figura 7 Estructura de TBSV.....	33
Figura 8 Detección por sintomatología.....	35
Figura 9 Esquema de los procesos que tienen lugar en la RT-PCR.....	39
Figura 10 El dispositivo de secuenciación MinION.....	42
Figura 11 Paso de las secuencias por un nanoporo	42
Figura 12 Proceso de crecimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> L	45
Figura 13 Representación de la distribución de macetas por cada variable experimental	46
Figura 14 Procedimiento de extracción de ARN total con RNeasy Plant mini kit.....	47
Figura 15 Descripción general de la cuantificación en formato de tubo único con el sistema de ARN QuantiFluor®.....	47
Figura 16 Resultado de una cuantificación espectrofotométrica de ARN de una muestra de ARN de alta calidad libre de contaminantes e inhibidores.	48
Figura 17 Electroferograma representativo de ARN analizado con Agilent 2100 Bioanalyzer. Número de integridad de ARN (RIN) alto.....	49
Figura 18 Procedimiento para limpieza de ADNc con AMPure XP	52

Figura 19 Descripción general de la cuantificación en formato de tubo único con el sistema QuantiFluor® ONE dsDNA.	53
Figura 20 Pipeline bioinformático.....	54
Figura 21 Bandas de electroforesis para virus de PVY, TMV y TBSV	58
Figura 22 Esquema de reacciones de q-PCR para validación de TASPERT	61
Figura 23 Crecimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> L después de dos semanas.	62
Figura 24 Hojas de <i>Solanum lycopersicum</i> L con síntomas evidentes de infección	63
Figura 25 Electroferograma representativo de ARN de <i>Solanum lycopersicum</i> L obtenido con Agilent 2100 Bioanalyzer en la determinación de RIN	66
Figura 26 Número de lecturas realizadas por hora	71
Figura 27 Número de lecturas realizadas por hora	73
Figura 28 Calidad de lectura conforme el tiempo	74
Figura 29 Distribución de la longitud de lecturas por corrida	75
Figura 30 Longitud de reads vs la calidad de lecturas	76
Figura 31 Diagrama cajas y bigotes de la detección de TMV, PVY y TBSV con diferentes tratamientos de primers.	80
Figura 32 Gel al 1.5% de agarosa con producto de PCR Multiplex.....	82
Figura 33 Electroforesis de ADNc sintetizado con diferentes primers con el método de TASPERT	83
Figura 34 Representación de las curvas (Ct) generadas por las muestras de TASPERT y el Gold Estándar	86
Figura 35 Representación de las curvas (Tm) generadas por las muestras de TASPERT y el Gold Estándar para TMV y TBSV.....	86
Figura 36 Curvas de Tm generadas por las muestras de PVY	87

Figura 37 Curvas de Tm generadas por los controles negativos de los virus 88

Abreviaturas

- A: Amplificación
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- ADNc-dc: ADN complementario de doble cadena
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- D: Desnaturalización
- dNTP: Desoxinucleótidos
- ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
- EtBr: bromuro de etidio
- Ex: Extensión
- Exf: Extensión final
- F-N: Falso Negativo
- F-P: Falso Positivo
- HTS: Secuenciación de alto rendimiento
- M-MLV RT: Enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
- NGS: Secuenciación de nueva generación
- ONT: Oxford Nanopore Technologies
- PacBio: Pacific Biosciences
- PBS: buffer fosfato salino
- PCR: Reacción en cadena de polimerasa
- poliA: cola poliadenilada

- PRSV: Papaya rings-pot virus
- PVX: el Potato virus X
- PVY: Potato Virus Y
- q-PCR: Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real o cuantitativa
- SD: Sin datos
- SMRT: Single Molecule Real Time
- ssRNA: Positive-sense single-stranded RNA; ARN monocatenario de sentido positivo
- TAE: buffer Tris-acetate-EDTA
- TASPRT: TArget-SPEcific Reverse Transcript
- TBSV: Tomato Bushy Stunt Virus
- TMV: Virus del mosaico del tabaco
- TS: Two Steps
- tSMS: Secuenciación verdadera de una sola molécula (True Single Molecule Sequencing)

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 Minlon 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), Minlon, Oxford Nanopore Technologies, diagnóstico molecular, TASPERT.

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 MinIon 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), MinIon, Oxford Nanopore Technologies, molecular diagnostics, TASPERT (TARget-SPEcific Reverse Transcript)

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Solanum lycopersicum L. (tomate) es una verdura que posee un alto valor alimenticio debido a su contenido de licopeno, este nutriente tiene propiedades anticancerígenas y antioxidantes; es por ello que este cultivo ha tomado gran importancia en los últimos años a nivel global (Wu, 2011). La producción de tomate podría limitarse por las enfermedades producidas por bacterias, fitoplasmas nemátodos, insectos, plantas parasitas, hongos o virus. Las enfermedades se desarrollan rápidamente cuando las condiciones son favorables lo cual puede generar pérdidas de hasta el 100% (Salas et al., 2022). Un claro ejemplo es el Virus del mosaico del tabaco (TMV) que es altamente contagioso, causa un pobre rendimiento de los cultivos reduciendo el crecimiento de las plantas, caimiento prematuro de las flores, frutos deformados, madurez atrasada en frutos (Abdelkhalek, 2019).

La detección de patógenos ha ido evolucionando desde la detección física mediante síntomas hacia avanzadas técnicas moleculares (Bernal, 2010; Rosa, 2007). Tradicionalmente, el diagnóstico de infección viral se ha basado en el bioensayo o la técnica serológica ELISA, teniendo serios problemas con la identificación de patógenos en etapas tempranas cuando la planta, en este caso, aún no ha desarrollado anticuerpos específicos lo que da lugar a falsos negativos (Murphy & Zehnder, 2000). Luego, con el desarrollo de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y su variante de PCR en tiempo real se ha logrado detectar un número muy pequeño de virus en muestras de interés. No obstante, la mayor dificultad que se presenta para el uso de técnicas moleculares como esta, es la gran cantidad de variantes que puede existir en entre los aislados de un mismo tipo de virus (Bernal, 2010; FIA, 2018).

Mediante experimentación se han diseñado protocolos de PCR que basan la detección viral en la parte del genoma que produce las proteínas correspondientes a la cápside, esto ha generado una detección más alta y una reproducibilidad mayor en comparación a las otras técnicas (Dovas & Katis, 2002; Murphy & Zehnder, 2000). En la actualidad el mejoramiento en el proceso de secuenciación por

Sanger se ha denominado "secuenciación de alto rendimiento" (HTS) y hace referencia a todas las tecnologías desarrolladas para analizar gran cantidad de ADN de forma masiva y paralela, pues permite la lectura de millones de secuencias de ADN en un menor lapso y a menor costo por base (Antury & Quimbaya, 2016; Rubio et al., 2020).

En el campo de la virología vegetal, HTS ha colaborado en las áreas de secuenciación del genoma, ecología, epidemiología, transcriptómica, replicación, detección e identificación.

Recientemente, con la incorporación de MinION de Oxford Nanopore Technologies (Oxford, Reino Unido), se ha logrado usar la secuenciación como método de diagnóstico rápido de patógenos.(Jain et al., 2016; Oxford Nanopore Technologies, 2022).

Las estrategias bioinformáticas para la detección sensible de virus tienen una gran influencia en los resultados, debido a esto, es fundamental tener en cuenta parámetros como: la integridad de las bases de datos de secuencias de referencia, ensamblaje e inclusive la experticia científica del operador para la interpretación de datos puesto que variaciones en un mismo resultado pueden generar diferencias significativas (Maree et al., 2018).

Justificación

Las agencias de bioseguridad fronterizo con frecuencia exponen la necesidad de tener formas de diagnóstico rápidos y económicos para elementos vivos que ingresan o salen a un país determinado. La aplicación de secuenciación de alto rendimiento (HTS) en detección de enfermedades ha presentado resultados prometedores en muchos organismos vegetales, no obstante, al ser una tecnología nueva, debe superar desafíos para llegar a ser una herramienta de uso común, por este motivo, es importante realizar investigaciones que involucren la detección de patógenos con esta tecnología en organismos vivos.

En esta investigación, se usará a *Solanum lycopersicum* L. como vegetal experimental porque su taxonomía, biofísica, estructura molecular y su comportamiento bioquímico están muy bien estudiados

lo que convierte a esta planta en un organismo modelo (Ardila et al., 2011). Algunas características que convierten al tomate en una planta de preferencia para las investigaciones básicas o aplicadas es que posee un genoma relativamente pequeño (950 Mb), tiene una alta adaptabilidad para crecer en diferentes ambientes y de forma rápida (Rodríguez et al., 2013).

Finalmente, al evaluar esta técnica, se busca determinar si TASPERT es una alternativa eficiente y confiable a los métodos de detección tradicionales, como la PCR convencional o los ensayos serológicos pues sería una contribución a la comunidad científica para generar nuevos conocimientos o sustentar hallazgos recientes, por lo tanto, es importante que se motive a estudiantes de pregrado y posgrado a realizar dichas estandarizaciones.

Objetivos de grado

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.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

Solanum lycopersicum L.

Solanum lycopersicum L., está clasificada taxonómicamente en la familia *Solanaceae* en la sección *Lycopersicum* (Florida et al., 2007). El género *Solanum* compone un clado monofilético que agrupa al tomate y a otras 13 especies herbáceas exclusivamente sudamericanas (Ardila et al., 2011). Su cultivo se da principalmente en climas secos pero es muy adaptable a diferentes ambientes porque poseen una gran cantidad de genes de resistencia a factores bióticos como: plagas o enfermedades y abióticos como el estrés hídrico y salino (Viteri & García, 2013).

El crecimiento del tomate puede ser de dos hábitos: determinado e indeterminado (Monardes, 2009). La planta con crecimiento indeterminado, está caracterizado por su crecimiento extensivo, desordenado y sin límite mientras que, el determinado es un crecimiento controlado y progresivo (Viteri & García, 2013). El tomate en su morfología presenta un sistema radicular formado por la raíz principal pivotante, potentes raíces secundarias y por las raíces adventicias, suele alcanzar hasta los dos metros (Rosa, 2007). El tallo es cilíndrico y anguloso de 2 a 4 centímetros de grosor del cual se desarrollan tallos secundarios que poseen tricomas; en la parte distal está ubicado el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares; las hojas son compuestas de color verde, con bordes dentados recubiertos de pelos glandulares, dependiendo de la especie se presenta cuatro tipos de inflorescencias de tipo racemoso, la flor es perfecta, hipógina e irregular con más de 5 sépalos e igual cantidad de pétalos que están dispuestos en intervalos de 135°, su fruto es una baya de color rojo (INFOAGRO SYSTEMS, 2022; Rosa, 2007).

El tomate en su constitución génica es diploide, con un número básico de 12 cromosomas, un genoma relativamente pequeño (950 Mb) presenta homocigosidad y alta autofertilidad, además tiene

un corto ciclo de cultivo que, sumados a la accesibilidad de herramientas genómicas y genéticas, lo convierten en uno de los modelos genéticos más efectivos (Flurido et al., 2007).

La importancia del cultivo de tomate radica en que su demanda aumenta continuamente por su alto valor nutricional y comercial (Morocho, 2003). El incremento anual de la producción ha llevado al tomate a ser la hortaliza más cultivada en todo el mundo y se debe principalmente, al aumento en el rendimiento de producción por planta y en menor proporción al aumento de la superficie de cultivo (Monardes, 2009). Estados Unidos es el mayor productor mundial con volúmenes equivalentes a más del 40% del total global, se han cultivado un total de 430000 acres, de los cuales, alrededor de 300.000 acres corresponden a tomates procesados por un valor de \$600 a \$700 millones de dólares y los 130.000 acres restantes fueron destinados para el cultivo de tomate para mercado fresco (Rosa, 2007).

La producción de tomate para procesamiento ha sido históricamente una parte significativa de la industria del tomate en el estado de Pensilvania, en donde se produce alrededor de 4.000 acres con un valor anual de entre \$15 y \$25 millones (Rosa, 2007). Otros países que destacan como productores mundiales de tomates son: Italia, Turquía, Grecia y China y son los mayores competidores de Estados Unidos (Monardes, 2009).

Enfermedades que afectan al cultivo de *Solanum lycopersicum* L.

El creciente interés por lograr una mayor productividad somete a las plantas a estrés, lo que las hace proclives a infecciones por microorganismos (FIA, 2018). La interacción entre un hospedador y un patógeno del medio ambiente da como resultado una enfermedad (Monardes, 2009). La mayoría de los patógenos poseen ciclos de vida complejos que son afectados por: la susceptibilidad de los distintos hospederos, la interacción con el medio ambiente y otros factores bióticos (R. C. Gergerich et al., 2008). Dependiendo del patógeno puede existir una

variedad de síntomas como pudriciones en la fruta, tallo y raíz, marchitamiento o manchas en las hojas (Rosa, 2007).

A continuación, se presenta una tabla de enfermedades que afectan a *Solanum lycopersicum* L.

Tabla 1

Enfermedades de Solanum lycopersicum L.

Microorganismo	Enfermedad	Patógeno
	Pudrición por el tizón temprano	<i>Alternaria solani</i>
Hongo	Pudrición por Rhizopus	<i>Rhizopus stolonifer</i>
	Antracnosis (fruta)	<i>Colletotrichum spp.</i>
	Cancro bacteriano	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>
Bacteria	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatori</i>
	Pudrición blanda bacteriana	<i>Erwinia carotovora pv. carotovora</i>
	Rizado amarillo del tomate	TYLC
Virus	Mosaico del virus del tabaco	TMV
	Virus Y de la papa	PVY

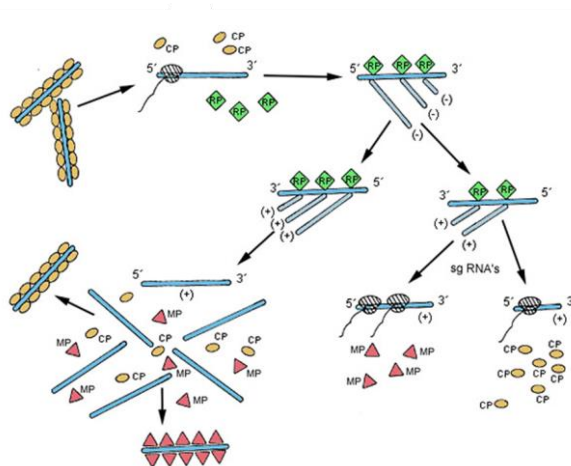
Nota. Adaptado de *The American Phytopathological Society por* (Jones et al., 2001).

Enfermedades virales y propagación

Los virus, como organismos obligados, manipulan factores del huésped para acumularse y propagarse (Broadbent, 2010). La infección usualmente se da en el citoplasma, los virus se desensamblan, replican, traducen sus ARN mensajeros a proteínas y se moviliza local y sistémicamente (Ver **Figura 1**) (Stange, 2014). Para una infección sistémica los virus usan vías simbióticas para establecer una infección en plantas susceptibles. (Butler, 1999; Liu & Nelson, 2013).

Figura 1

Pasos que se dan dentro de la célula durante la replicación de TMV

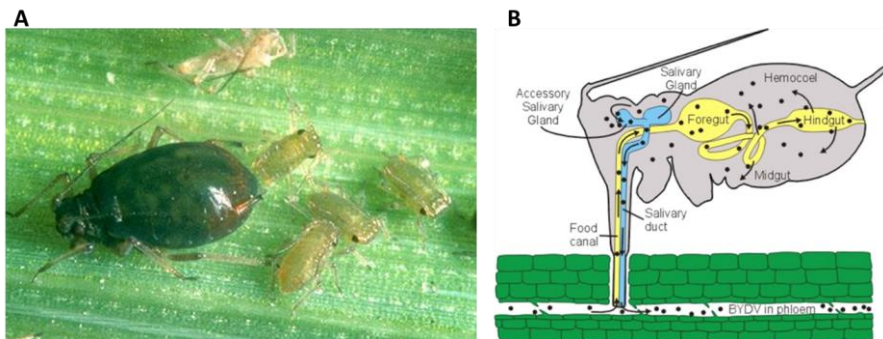


Nota. El primer paso es ingresar a la planta huésped, luego, se elimina la cápside para liberar el ARN viral y se replica para producir múltiples ARNm, dichos ARNm contienen componentes esenciales para su replicación, como la proteína de cubierta y una ARN polimerasa dependiente de ARN, además de la proteína de movimiento. Esto implica que el TMV es capaz de autoreplicar su propio material genético. Después de la síntesis, se ensamblan en viriones TMV completos. Adaptado de: *Introducción a los Virus Vegetales, El Enemigo Invisible* por R. Gergerich & Dolja, 2006.

Las enfermedades virales, pueden propagarse de diversas formas. La infección puede producirse si los virus entran a los tejidos de una planta a través de una herida, por ejemplo, cuando una planta madre está infectada los esquejes tubérculos, bulbos, rizomas o brotes pueden ser un medio de transmisión viral, la cual se denomina propagación vegetativa. Otra forma de diseminación común, es con la ayuda de otros organismos, un vector, como los insectos áfidos (pulgones), moscas blancas, trips, escarabajos, entre otros.

Figura 2

Organismos vectores para la transmisión de enfermedades



Nota. (A) Pulgón adulto sin alas y ninfas. (B) Mosca blanca, se explica la transmisión de virus, el patógeno circula través de la pared intestinal hacia la cavidad corporal, pasando a la saliva del áfido y finalmente contagiando a la planta. Tomado de: Introducción a los Virus Vegetales, El Enemigo Invisible por R. Gergerich & Dolja, 2006.

Cuando su transmisor es un animal superior, como un herbívoro, es una contaminación mecánica, al igual que el uso de herramientas de poda (Quenouille et al., 2013). Aunque existen nematodos del suelo capaces de transmitir virus a las plantas, esto no suele ser común (Fulton, 1986).

Tobacco mosaic virus (TMV)

En los Países Bajos en 1910, se indicó por primera vez una enfermedad no bacteriana la cual se denominó TMV (virus del mosaico del tabaco) y seis años más tarde fue descrita en Estados Unidos (Bloomer et al., 1978). El TMV pertenece al género *Tobamovirus*, es un virus monocatenario de sentido positivo de ARN que se compone de 6395 ± 10 nucleótidos, todo su genoma está recubierto por una cápside que está formada por 2130 moléculas de proteínas que se autoensamblan en la estructura helicoidal, esta organización estructural le da estabilidad c

Figura 3

Estructura del género *Tobamovirus*

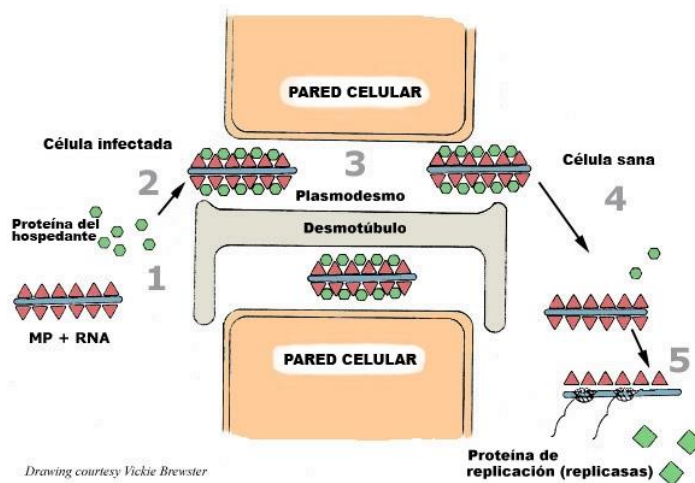


Nota. Adaptado de: *Manejo general para el Tomato brown rugose fruit virus* por González, 2018.

El género *Tobamovirus* puede infectar a una amplia cantidad de especies de plantas, en especial a los miembros de la familia *Solanaceae* como el tabaco y el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) (Liu & Nelson, 2013). TMV es el virus vegetal más infeccioso que se conoce, la infección sistémica exitosa requiere tres procesos que se repiten con el tiempo: establecimiento inicial y acumulación en las células invadidas, movimiento intercelular y transporte sistémico (Okada, 2000).

Figura 4

Movimiento intercelular de TMV desde una célula infectada a una sana

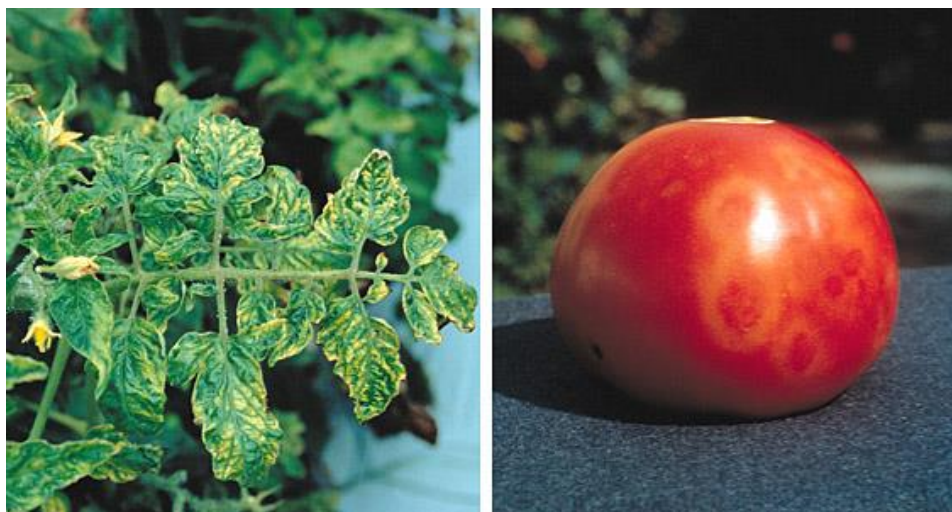


Nota. El virus produce proteínas de movimiento, estos alteran los canales del plasmodesmo y facilitan el movimiento viral hacia las células circundantes. Recuperado de: *Introducción a los Virus Vegetales, El Enemigo Invisible* por R. Gergerich & Dolja, 2006.

También es el virus más persistente en términos de su capacidad para sobrevivir fuera de las células vegetales y en tejidos muertos, aunque los síntomas generalmente varían dependiendo de la raza, luz, temperatura, intensidad y tiempo de infección (Namba & Stubbs, 1986). Las plantas jóvenes de tomate se infectan cuando se frota con savia de tomate infectada, infección provoca configuraciones distintivas, tales como decoloración y moteado en las hojas de color verde oscuro y claro (de ahí el nombre), las hojas pueden curvarse, reducirse en tamaño y exhibir deformación, dando el aspecto de una hoja de helecho, durante el lapso de incubación previo a la manifestación de los signos y síntomas, el crecimiento se ralentiza considerablemente (Atkinson & Matthews, 1970).

Figura 5

Síntomas de infección por TMV en plantas de tomate



Nota. Recuperado de: *Introducción a los Virus Vegetales, El Enemigo Invisible* por R. Gergerich & Dolja, 2006.

Potato Virus Y (PVY)

PVY es miembro del género *Potyvirus* en la familia *Potyviridae* (APHIS, 2020). Es un virus de ARN genómico es monocatenario (ssRNA), sentido positivo que tiene una forma filamentosa y flexuosa, su longitud es de 730 nm, un diámetro de 12 nm y posee simetría helicoidal, tiene aproximadamente de 9,7 kb, tiene una cola poliadenilada (poliA) en 3' (Dionel, 2010).

Figura 6

Estructura del género Potyvirus



Nota. Recuperado de *Manejo general para el Tomato brown rugose fruit virus* por González, 2018.

La enfermedad causada por PVY es grave pues limita el rendimiento de la papa y se encuentra en todo el mundo (Dionel, 2010). Es el quinto virus más importante a nivel económico pues puede causar reducciones de rendimiento del 50% al 80% en lotes de producción comercial altamente infectados (Kežar et al., 2019). De esta manera, este patógeno viral se convierte en el agente más significativo que afecta a la papa a nivel global (Quenouille et al., 2013). PVY tiene una amplia gama de huéspedes y puede infectar principalmente plantas solanáceas, incluidas la patata, el tomate, el pimiento, el tabaco y la berenjena (Quenouille et al., 2013).

Este virus se asoció con una enfermedad que causaba la degeneración de la papa a principios de 1930 (Dionel, 2010). El virus vive como un complejo de cepas que han evolucionado por acumulación de mutaciones y recombinación, lo que aprueba que el virus se adapte de forma eficiente a los cultivares de las plantas que infecta (Kežar et al., 2019).

El PVY se puede transmitir por tubérculos pues las plantas formarán tubérculos infectados. Otra forma puede ser de planta a planta por medio de 40 especies diferentes de áfidos aproximadamente, incluidos aquellos que no se alimentan a largo plazo ni colonizan la papa, como *Myzus persicae*, este es el vector con mayor eficiencia de transmisión debido a su amplia distribución geográfica (Lister, 1966).

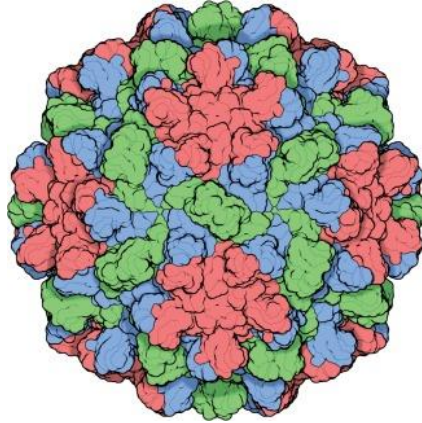
Aunque los aislamientos de PVY generalmente muestran diferencias grandes tanto en la virulencia, como el nivel cuantitativo de perjuicio en los huéspedes enfermos, los síntomas en la parte aérea de la planta incluyen: necrosis de tallo, pecíolo o las venas, arrugamiento, moteado, caída de hojas y manchas en mosaico, cuando es una transmisión por tubérculos puede ocurrir atrofia (Dionel, 2010).

Tomato bushy stunt virus (TBSV)

El TBSV fue descrito por primera vez en 1935 por Smith, pertenece al género *Tombusvirus*, familia *Tombusviridae* (Scott, 1969). Es un virus de tamaño reducido con una estructura icosaédrica y un genoma de ARN de cadena sencilla de sentido positivo, con una longitud aproximada de 4,8 kb (McCartney et al., 2005). La forma de transmisión del virus es por inoculación mecánica a una extensa gama de huéspedes experimentales mientras que la transmisión natural es a través de la semilla y el suelo, aparentemente sin vector, pues no se ha detectado vectores aéreos o terrestres debido a que los pulgones no lo transmiten (Martelli et al., 1989).

Figura 7

Estructura de TBSV



Nota. Recuperado de: *Revelando puntos de vista estructurales de la biología* por Goodsell, 2013

Los huéspedes naturales son relativamente restringidos, está limitado al género *Solanum* y plantas ornamentales anuales, no obstante, en condiciones de laboratorio tiene la capacidad de infectar a más de 123 especies (Park et al., 2002). El virus en tomate causa retraso en el crecimiento, manchas cloróticas, arrugamiento, deformación y necrosis de las hojas. Aunque causa una pérdida significativa de rendimiento en las plantas de tomate, no se considera un patógeno económicamente significativo, (Viteri & García, 2013).

Técnicas de detección de enfermedades virales

A diferencia con otros patógenos que afectan a las plantas, no es posible controlar las enfermedades virales directamente mediante el uso de viricidas u otros métodos directos, es por ello se emplean estrategias indirectas para combatir estas enfermedades, como la eliminación de las plantas enfermas, la reducción de los insectos vectores o evitar la siembra de semillas infectadas. Por esta razón, los métodos de detección e identificación de virus son fundamentales para el manejo de las enfermedades virales. Estos métodos deben ser convenientes, efectivos, específicos y rápidos para facilitar su aplicación y lograr un control adecuado de las enfermedades virales (Owens & Diener, 1979).

El desarrollo de nuevas tecnologías ha dado lugar a nuevos enfoques para la detección de virus. Estos métodos se basan en el uso de microscopía electrónica, técnicas serológicas y enfoques moleculares. Sin embargo, la microscopía electrónica tiene limitaciones, ya que solo permite determinar la morfología de las partículas virales. Además, requiere equipos costosos y la interpretación de los resultados demanda técnicos altamente capacitados (Alemu, 2015). Las técnicas serológicas tienen una baja sensibilidad, lo cual provoca inconvenientes en la detección viral y finalmente las técnicas moleculares ofrecen una detección más eficiente y sensible, superando las limitaciones de las técnicas tradicionales y serológicas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas técnicas dependen en gran medida de la calidad del ARN extraído, lo cual puede representar una limitación en su aplicación. (Jeong et al., 2014).

Detección por sintomatología

El diagnóstico visual ha sido el más utilizado de manera empírica pues no tiene costo y no necesita de materiales ni reactivos, no obstante, esta es una identificación inexacta del patógeno puesto que diferentes variedades del mismo virus pueden generar síntomas diferentes y del mismo modo, diferentes especies de virus diferentes producen síntomas semejantes. Además, las plantas pueden mostrar síntomas similares a las infecciones virales como respuesta a condiciones climáticas adversas, desequilibrios nutricionales en el suelo, infecciones causadas por patógenos no virales y daños ocasionados por insectos, ácaros y nematodos. (Bernal, 2010).

Figura 8

Detección por sintomatología



Nota. Recuperado de *Enfermedades y plagas* por la organización Hidroponía Rosario, 2015

Detección por plantas diferenciales

En 1931, Smith realizó experimentos utilizando virus en plantas de papa y demostró que los síntomas observados podían ser causados por la combinación de varios virus. A través del uso de plantas diferenciales y la transmisión por insectos, pudo distinguir entre el Potato virus X (PVX) y el Potato virus Y (PVY). Específicamente, Smith utilizó *Myzus persicae*, un áfido que transmite el PVY pero no el PVX, lo que permitió separar ambos virus. Además, mediante la inoculación mecánica en *Datura stramonium*, una planta inmune al virus Y, logró aislar el virus PVX. (Fronk, 1965). Con esta misma metodología se logró determinar la cantidad de hospederos por la diferencia entre virulencia de los aislamientos de un mismo virus por las diferencias en la sintomatología producida pues ya se manejaban variantes de virus puros (Walkey, 1967). Se ha discontinuado el uso de este método de detección por los grandes espacios que necesitan para cultivares, por la limitante de hospedadores resistentes y por sus largos tiempos de espera, no

obstante aún se usa para la detección de virus en muchos frutales como cítricos, pomáceos y rosáceos (APHIS, 2020).

Detección por serología

Por la necesidad de introducir nuevas pruebas de diagnóstico más sensibles y eficientes en plantas se introdujo pruebas ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para la identificación de patógenos (Ouchterlony, 1962). Esta técnica se basa en la interacción entre un antígeno y anticuerpos específicos. Con el tiempo, se ha convertido en un método ampliamente adoptado debido a su popularidad y rentabilidad. El ELISA ofrece a los laboratorios de diagnóstico de rutina una forma rápida, efectiva y sensible de detectar una amplia gama de virus. (Fronk, 1965).

El método de ELISA consta de dos fases: una fase sólida y una fase líquida. En la fase sólida, se recubre la superficie con la muestra de interés que contiene el antígeno. Los resultados obtenidos son cualitativos, ya que una enzima presente en la muestra convierte un sustrato en un producto coloreado. La intensidad del color producido puede correlacionarse con la cantidad de anticuerpos unidos y, por lo tanto, con la cantidad de antígeno presente (L. F. Salazar, 1990).

Una de las desventajas de esta técnica es la dependencia a la concentración de antígenos ya que puede generar falsos negativos, por ejemplo, los niveles de virus dentro de los tubérculos de patata que se analizan mediante ELISA para su uso como semilla, normalmente son bajos mientras el tubérculo está inactivo (Bernal, 2010). Otro problema que se observa en los métodos de diagnóstico basado en inmunología son los cambios a nivel genético pueden influir en la inmunogenicidad del antígeno a detectar (Bernal, 2010).

Detección por métodos moleculares- PCR

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se basa en la capacidad inherente de las ADN polimerasas para replicar millones de copias idénticas de una hebra de ADN específica dentro de un tubo de reacción. Esto se logra utilizando secuencias únicas del genoma de cada virus como marcadores para amplificar y detectar su presencia. (Ibarra & Vesquillo, 2013). La PCR cuenta con muchas aplicaciones, como el análisis de la expresión de genes, el genotipado, la clonación, la manipulación de genes, la secuenciación y la mutagénesis, también se ha utilizado como herramienta de diagnóstico para detectar enfermedades (Ibarra & Vesquillo, 2013; Jeong et al., 2014).

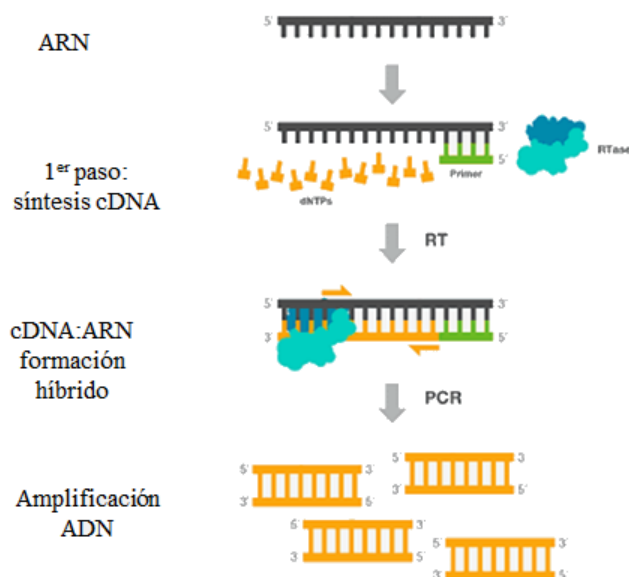
Para realizar una PCR se emplean cuatro pasos que son: desnaturalización a altas temperaturas, alineación, extensión y extensión final (Ibarra & Vesquillo, 2013; Jeong et al., 2014). La secuencia del ADN viral normalmente es sometida a 30 ciclos de copiado, con lo que en cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los siguientes ciclos, generando productos de forma exponencial, luego el producto de esta PCR puede ser observado en un gel de agarosa tiñendo el ADN con un fluoróforo que permita revelar la amplificación realizada (Pedrosa, 1999).

Otra variante es una PCR multiplex (punto final que permite detectar dos o más virus en la misma reacción. Para lograr esto, se utilizan dos o más pares de cebadores (primers) y se ajustan proporcionalmente los reactivos de la reacción. Esta técnica ahorra tiempo al permitir la detección simultánea de múltiples patógenos. (Jain et al., 2016). Sin embargo, en el caso de muestras de ARN, la PCR requiere un paso adicional en el que se realiza la retrotranscripción de la hebra de ARN a ADN complementario. Este proceso se lleva a cabo utilizando una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (Ibarra & Vesquillo, 2013). Una vez transcrito

en ADN complementario, se realiza una PCR convencional para su amplificación y se conoce como RT-PCR (Jeong et al., 2014a).

Figura 9

Esquema de los procesos que tienen lugar en la RT-PCR.



Nota. Recuperado de *Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas* por Mellado, 2020.

La técnica de PCR Tiempo Real, también conocida como PCR cuantitativa o q-PCR, integra los pasos de amplificación de ADN y detección en un solo ensayo, eliminando la necesidad de utilizar geles de agarosa. En un principio, se descubrió que el bromuro de etidio (EtBr), un compuesto que se intercala en el ADN de doble cadena, emitía fluorescencia bajo la luz ultravioleta. Esta propiedad se utilizó para registrar la acumulación de ADN mediante el uso de un sistema de grabación. Con esta técnica, se logró combinar la alta sensibilidad de la PCR con la capacidad de monitorear en tiempo real los productos

generados por la reacción, proporcionando una medición precisa y en tiempo real de la amplificación de ADN. (Alemu, 2015).

El uso de fluoróforos, sean específicos o genéricos, es indispensable para una q-PCR (Alemu, 2015). Entre los genéricos se puede nombrar al Bromuro de Etidio y a SYBR Green, este último es una molécula cargada positivamente que no emite fluorescencia por sí mismo, sin embargo, cuando se adhiere al surco menor del ADN, su fluorescencia aumenta en aproximadamente 1000 veces (Tamay de Dios et al., 2013). Los métodos específicos utilizan el principio de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés). En este principio, se emiten señales de fluorescencia únicamente cuando se detectan los productos amplificados. Para lograr esto, se requiere la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador). Cuando estas dos moléculas se encuentran separadas, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador, lo que permite su detección por parte de un fotodetector. Por otro lado, cuando el donador y el apagador están en proximidad, el apagador absorbe toda la fluorescencia emitida por el reportero. (Pedrosa, 1999).

Detección por secuenciación

Desde el desarrollo de Sanger en 1975 para secuenciar el ADN a través de la incorporación de terminales de dideoxinucleótidos mediante enzimas, se ha utilizado métodos de secuenciación para elucidar los genomas de diferentes organismos y entre ellos se destaca el Proyecto del Genoma Humano (Antury & Quimbaya, 2016). Actualmente, la secuenciación permite procesar gran cantidad de ADN de forma masiva y paralela lo que ha ayudado al progreso en el diagnóstico de enfermedades, en el conocimiento de la taxonomía, la epidemiología, entre otros.

Secuenciación de alto rendimiento (HTS)

Se ha denominado secuenciación de alto rendimiento (HTS) o secuenciación de nueva generación (NGS) al mejoramiento de la secuenciación por Sanger, estos métodos desarrollados permiten leer de millones a miles de millones de secuencias o fragmentos del ADN (*reads*) de forma paralela en un tiempo relativamente corto y a un menor costo por base (Wei et al., 2018).

Las principales plataformas desarrolladas en la segunda generación de secuenciación son: Illumina (Solexa) sequencing; Roche 454 sequencing; Ion torrent: Proton / PGM sequencing y SOLiD sequencing, que tienen la capacidad de generar lecturas de 25 a 400 pb, esto fue útil para una gran cantidad de aplicaciones de investigación, como el análisis de mutaciones específicas o las pruebas de panel de cáncer (Ibáñez Oliver, 2021). No obstante, la generación de secuencias cortas tenía limitantes para clasificar entre moléculas por lo que la tercera generación se enfocó en la secuenciación verdadera de una sola molécula (tSMS) (Maitra et al., 2012).

La diferencia más notoria entre la segunda y tercera generación radica en que en esta última no existe la necesidad de realizar una PCR antes de la secuenciación, esto redujo los costos y el tiempo de análisis además de que obtener lecturas más grandes (Peserico et al., 2019). Las tecnologías de secuenciación de tercera generación son: Single Molecule Real Time (SMRT) de Pacific Biosciences (PacBio) e Illumina Tru-seq Synthetic Long-Read (Barba et al., 2013). En 2014 cuando Oxford Nanopore Technologies integró la tecnología de nanoporos para secuenciar (Mikheyev & Tin, 2014). En resumen, a nivel económico, el costo por megabase secuenciada se ha reducido extraordinariamente pasando de 8000 dólares americanos en el 2001 a 0.10 centavos en el 2013 (Rubio et al., 2020).

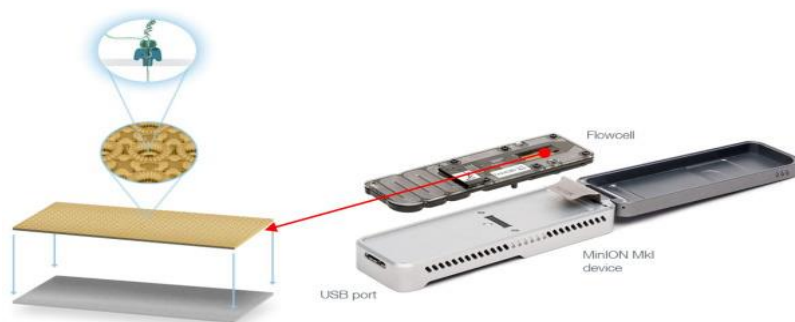
Minlon -Oxford Nanopore Technologies

El primer secuenciador comercial en utilizar tecnología de nanoporos fue lanzado en el 2014 por Oxford Nanopore Technologies (ONT), Minlon es un dispositivo portátil de 90 g que en el mercado tiene

un valor aproximado de 1000 dólares, esta tecnología puede conectarse a un puerto USB estándar en una computadora con pocos requisitos de hardware (Oxford Nanopore Technologies, 2022).

Figura 10

El dispositivo de secuenciación MinION

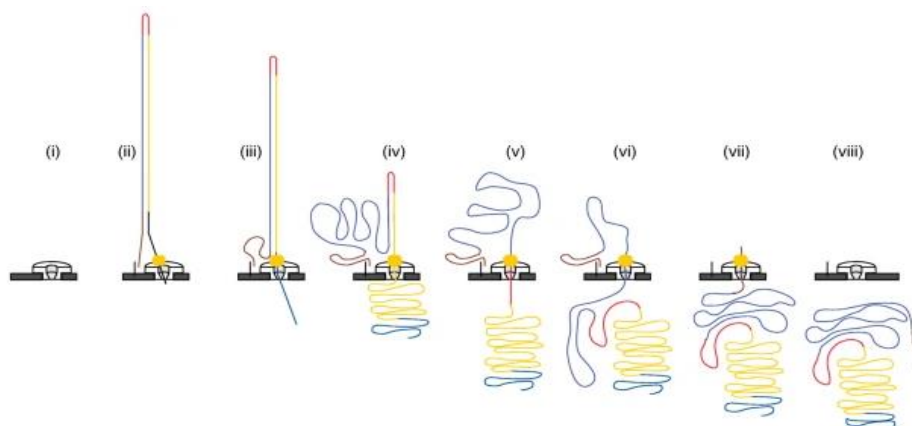


Nota. Recuperado de Secuenciación Oxford Nanopore MinION y ensamblaje del genoma Lu et al., 2016.

MinIon identifica bases de ADN midiendo los cambios en la conductividad eléctrica generados como hebras de ADN pasar a través de un poro biológico y esto define la secuencia de bases a medida que el ADN pasa a través del poro, el sensor detecta cambios en la corriente iónica causados por diferencias en las secuencias de nucleótidos cambiantes que ocupan el poro (Mikheyev & Tin, 2014). En el núcleo del dispositivo contiene una celda con 2048 nanoporos que pueden controlarse en grupos de 512 unidades mediante un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC) (Mikheyev & Tin, 2014). Al igual que otras THS, se necesita la preparación de bibliotecas, se debe usar ADN largo (>30 kb) y de doble cadena (dsDNA) para que se pueda realizar la secuenciación de ambas cadenas, esto normalmente se pueden obtener mediante métodos estándar de extracción y limpieza (Lu et al., 2016). Finalmente, el protocolo para la ejecución predeterminada de MinION de 72 h y un conjunto de comandos de Python que se inician la ejecución de la secuenciación (Maitra et al., 2012).

Figura 11

Paso de las secuencias por un nanoporo



Nota. Adaptado de *Secuenciación Oxford Nanopore MinION y ensamblaje del genoma* Lu et al., 2016.

MinION genera un archivo FAST5 por lectura, aunque muchos programas bioinformáticos utilizan archivos FASTA o FASTQ como entrada, esto no representa un problema porque al momento existen muchas herramientas que permiten convertir los archivos de entrada al formato necesario para su posterior análisis (Barba et al., 2013). Indistintamente a cualquier herramienta usada para realizar el *basecalling* se realizada de la siguiente forma: el fragmento y el adaptador se clasifican, luego se calcula una puntuación de calidad (puntuación Q; desarrollada por ONT) para cuantificar la calidad de lectura, si dicha lectura tiene una media > 9 se colocarán en una carpeta clasificadas como “aprobadas”, caso contrario cuando la lectura no supera ese valor se enviará en el directorio de “fallido”, luego con las secuencias aprobadas se realiza un clasificación comparando con otras secuencias ya existentes, finalmente el tratamiento estadístico será el pertinente para cada investigación (Lu et al., 2016).

TASPERT

En el Departamento de Entomología y Patología Vegetal en conjunto con el Instituto de Bioseguridad y Medicina Forense Microbiana (IBMF) de Oklahoma State University se desarrolló una técnica para elevar los títulos de los patógenos objetivos y limitar la amplificación del hospedador para optimizar el diagnóstico mediante secuenciación con MinION de Oxford Nanopore Technologies.

La abreviatura TASPERT significa *TARget-SPEcific Reverse Transcript* por sus siglas en inglés, la técnica consiste en realizar un conjunto de transcripciones inversas específicas de destino, una vez que los *primers* se validan para cada virus de ARN específico, se agrupan y se utilizan para generar ADNc de doble cadena de las muestras a partir de la unión de los *primers* al extremo 3'. Estos cebadores inversos enriquecen la muestra solo en patógenos de interés dando como resultado una mayor cantidad de lecturas mapeadas y una secuenciación más profunda del patógeno (Espindola et al., 2021).

En la actualidad, TASPERT solo ha sido utilizado para detectar virus en uva (*Vitis vinifera*) dando resultados significativamente superiores, en la generación de bibliotecas metagenómicas que contienen el patógeno de interés, por lo que se espera que en un futuro se pueda utilizar para diagnosticar de forma simultánea no solo patógenos virales, sino también diferentes microorganismos como hongos y bacterias que sean de interés para la bioseguridad fronteriza (Espíndola et al., 2021).

Capítulo III Metodología

Instituciones participantes

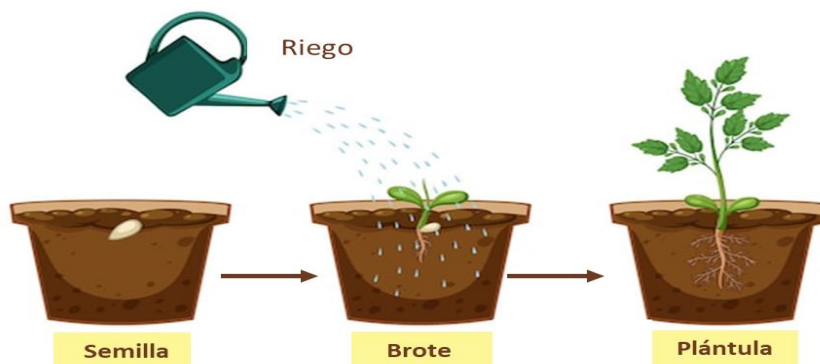
El período de duración de la presente investigación desde el 02 de mayo del 2023 hasta el 7 de julio del 2023, por medio del convenio existente entre el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencia de la Vida y Agricultura, a la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y el Department of Entomology and Plant Pathology, Institute of Biosecurity and Microbial Forensics (IBMF) de Oklahoma State University. Bajo la dirección de Francisco J. Flores Flor, PhD como tutor principal y Andrés S. Espíndola Camacho, PhD como cotutor.

Siembra de *Solanum lycopersicum* L

El cultivo de *Solanum lycopersicum* L. se realizó con ~200g de tierra ya preparada para el cultivo otorgada por Teaching Greenhouse de Oklahoma State University, en macetas de plástico blancas, esto con fin de que los rayos solares se reflejen. Se colocó dos semillas de la empresa SPRUS en cada maceta y posterior a la siembra se realizó riego por absorción. Se sembró 10 macetas para cada variable experimental: Plantas Sanas como control negativo (CN), PVY, TMV, TBSV y la combinación de los tres virus V3, es decir un total de 50 semillas más un agregado de 50 unidades extra como respaldo.

Figura 12

Proceso de crecimiento de Solanum lycopersicum L



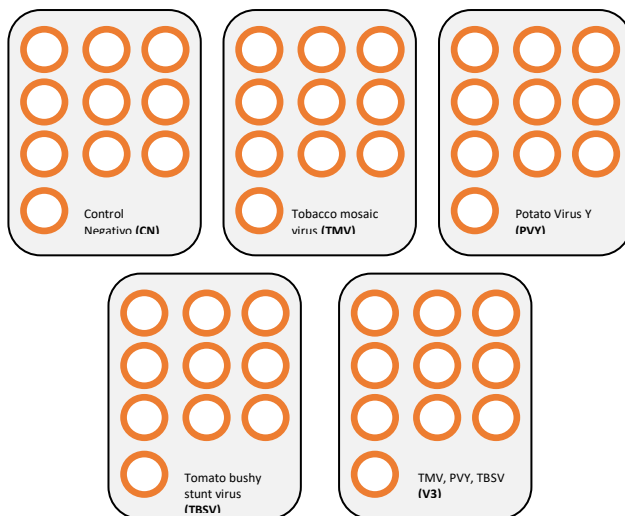
Nota. Adaptado de *Crecimiento general de plantas* por Freepik, 2023.

Infección de *Solanum lycopersicum* L

Para la infección se adquirió virus liofilizados de la empresa Agdia, los cuales fueron resuspendidos en 250 μ L de *buffer* fosfato salino (PBS siglas en inglés). Este procedimiento se ejecutó después del crecimiento primario de la planta, es decir, después de aproximadamente dos semanas posteriores a la siembra. Se clasificó a las plantas por tamaño, se separó en grupos de 10 unidades, se etiquetó con su respectiva variable experimental y en caso de que haya crecido más de una planta se procedió arrancar la planta de menor crecimiento, seguido se colocó a cada grupo en bandejas diferentes para evitar la contaminación cruzada (Ver **Figura 13**). La infección se realizó de forma mecánica espolvoreando polvo de hierro al 99.0% de 60 micras de la marca Goodfellow en las hojas, se colocó 1 μ L cada tipo de virus según el diseño experimental definido para este proyecto y se tocó levemente la hoja en sentido vertical, de arriba hacia abajo tres veces.

Figura 13

Representación de la distribución de macetas por cada variable experimental



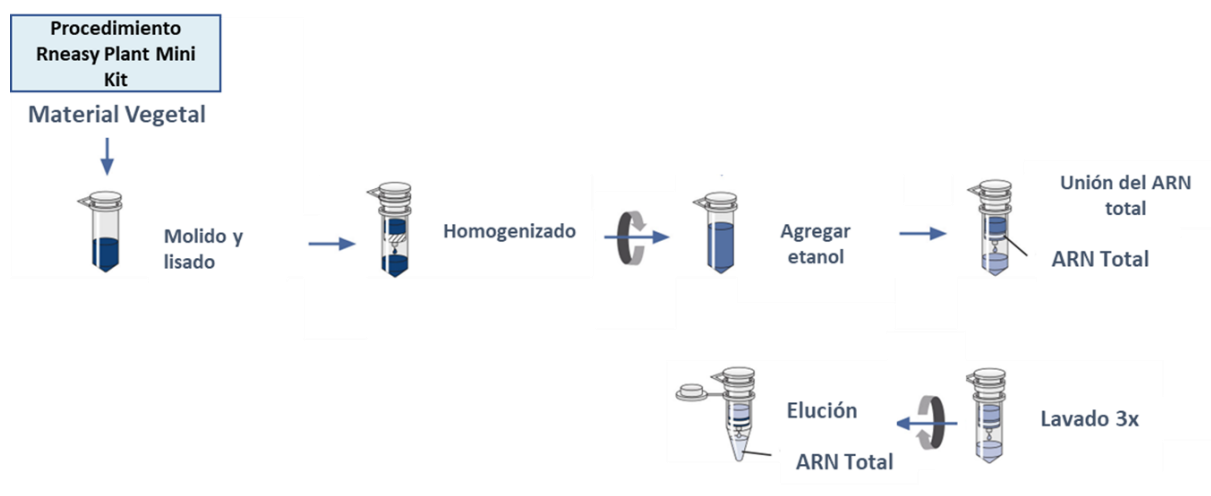
Nota. Elaborado con PowerPoint - Microsoft 365

Extracción de ARN total

Se usó 100 mg de tejidos vegetales de *Solanum lycopersicum* L. sanos o enfermos para extraer el ARN total, se empleó el kit Mini RNeasy Plant de Qiagen (N° de catálogo/ ID: 74904) y se siguió los pasos como indica el fabricante.

Figura 14

Procedimiento de extracción de ARN total con RNeasy Plant mini kit



Nota. Adaptado de *RNeasy Plant Mini Kit*, por QIAGEN, 2023.

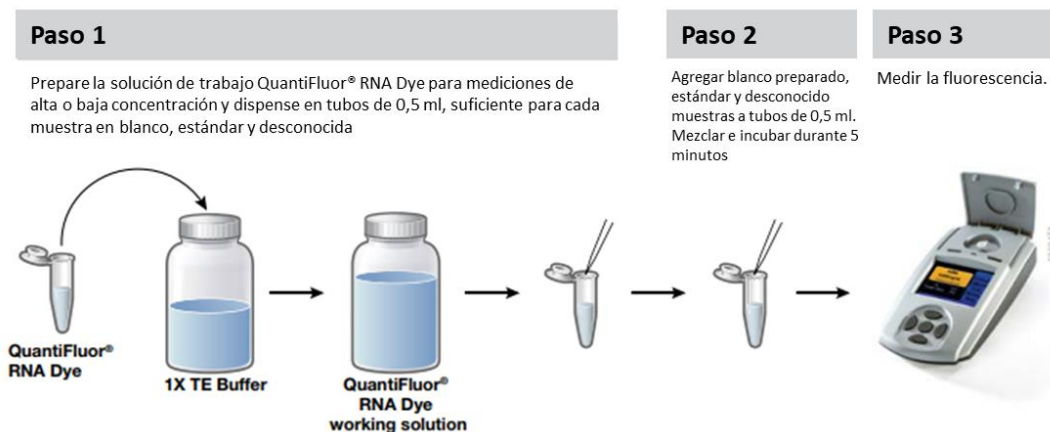
Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

Parámetros de calidad del ARN total

La cuantificación se realizó con Quantus™ Fluorometer (N° de catálogo: E6150) usando el kit QuantiFluor ARN ONE, se siguió los pasos como indica el fabricante y se obtuvo datos en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 15

Descripción general de la cuantificación en formato de tubo único con el sistema de ARN QuantiFluor®.

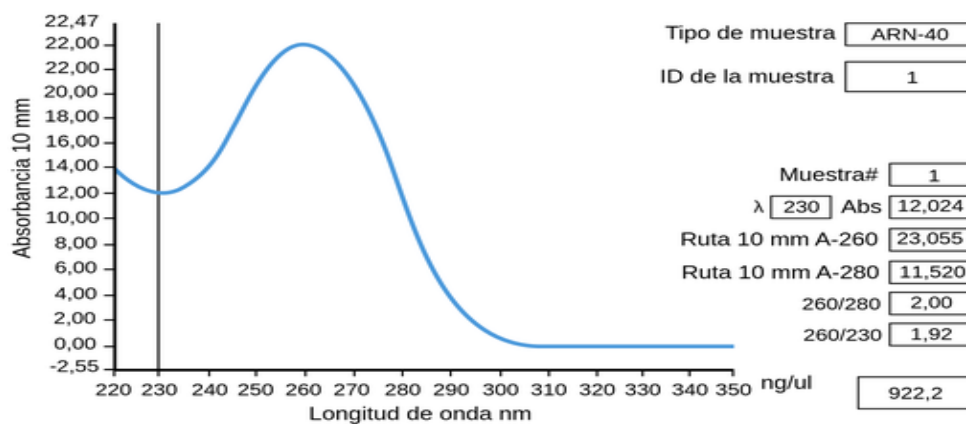


Nota. Adaptado de *QuantiFluor® RNA System Instructions for Use of Product E3310* por Promega, 2019.

La pureza de ARN total se determinó con el NanoDrop 2000 Thermo Scientific (N° de catálogo ND2000USCAN), se blanqueó el equipo con mismo eluyente de las muestras de ARN, agua libre de nucleasas, luego se colocó 1uL de la muestra en el espectrofotómetro y se verificó que no hayan compuestos inhibidores o contaminantes.

Figura 16

Resultado de una cuantificación espectrofotométrica de ARN de una muestra de ARN de alta calidad libre de contaminantes e inhibidores.

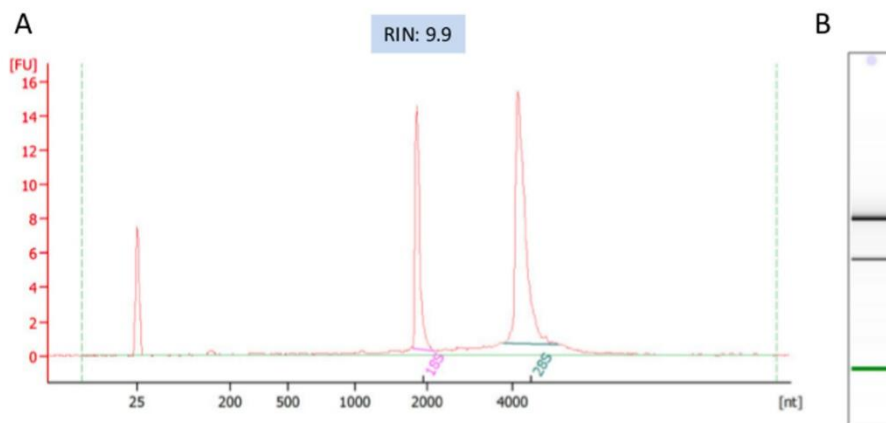


Nota. Recuperado de Cuantificación del ácido nucléico por *Labster Theroy, 2023*

Se escogió cinco muestras por cada variable experimental (5 variables) que presentaron una buena relación entre pureza y concentración y fueron enviadas al Core Facility de Oklahoma State University para la determinación de la integridad mediante el análisis del RIN (*RNA Integrity Number*), este procedimiento fue realizado en el equipo 2100 Bioanalyzer de Agilent Technologies.

Figura 17

Electroferograma representativo de ARN analizado con Agilent 2100 Bioanalyzer. Número de integridad de ARN (RIN) alto



Nota. Recuperado de *Biología de sistemas de regulación metabólica por señalización de receptores de estrógeno en cáncer de mama* por Y. Zhao & Madak, 2016.

Después de recibir los resultados de integridad se seleccionó a las tres muestras que obtuvieron el mayor *Rin Number* por cada variable experimental.

Diseño de *primers*

Primers con FLAP

En la generación de *primers* con FLAP se usó la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), se obtuvo los genomas completos del hospedador, en este caso, *Solanum lycopersicum* L. y de los patógenos como: Potato virus Y (PVY), Tomato bushy stunt virus (TBSV) y Tobacco mosaic virus (TMV), se obtuvo todas las variantes posibles, luego se realizó un Alineamiento múltiple de las secuencias de interés, se buscó una región acercada a la zona 3', se realizó el reverso complementario de la secuencia y con la ayuda de OligoAnalyzer™, herramienta de IDT (Integrated DNA Technologies), se determinó y modificó las condiciones hasta que cada *primer* cumpliera con los requerimientos de la técnica y se añadió una secuencia universal rica en AT denominada flap.

Primers Two Steps

En este caso se utilizó la metodología descrita anteriormente pero no se agregó un flap en ningún *primer*, más bien se creó un segundo *primer* bajo las mismas condiciones, pero ubicado en otra posición de la secuencia de cada virus y se colocó en el paso final de la técnica de TASPERT.

Primers de literatura

Para los *primers* obtenidos de literatura se realizó una revisión bibliográfica de artículos relacionados con la detección de los patógenos de interés, se creó una tabla de recopilación y se filtró en base a la especificidad, tamaño del producto, dimerización y Tm.

Primers para el hospedador

Se utilizó la herramienta Primer 3 para crear *primers* en una región conservada que tenga un *e-value* menor o igual a e^{-4} para el hospedador bajo las mismas condiciones que los *primers* anteriores.

Síntesis de ADNc-dc (TASPERT)

A partir de las muestras de ARN que pasaron los parámetros de calidad, se colocó el ARN, con cada tipo de *primer* detallado en: **Tabla 12, Tabla 13 y Tabla 14**; se agregó otros reactivos necesarios para el alineamiento como Desoxinucleótidos (dNTP) (N° de catálogo N0447L) y agua libre de ARNasas, se incubó por tres minutos a 70°C, para la síntesis de ADNc, luego, en el mismo tubo se colocó la mezcla de enzima de retro transcripción (RT enzimas) (N° de catálogo: NEB #M0466) con su respectivo *buffer* y reactivos como *Template Switching Oligo*, se incubó por 90 minutos a 42°C, seguido de 5 minutos a 85°C. El tercer paso, para obtener las dobles cadenas del ADN complementario, se realizó mediante amplificación por 30 ciclos con temperaturas de 95°C, 62°C, 72°C para la desnaturalización, hibridación y extensión respectivamente. En la Tabla 2 se muestra el volumen de los reactivos usados en cada paso.

Tabla 2

Disposición de reactivos y pasos necesarios para realizar TASPERT

Paso	Etapas	Reactivo	Volumen	Temperatura	Tiempo
1	Alineamiento	ARN	1.0 µL	70 °C	3
	del material	RT <i>primer</i> (10µM)	1 µL		
	genético	dNTP (10mM)	1 µL		
		Agua libre de nucleasas	3.0 µL		
2	Transcripción	NEB Next Single Cell RT	2.5 µL	42 °C; luego a	90 min;
	reversa	Buffer			
		NEB Next Template	0.5 µL		min
		Switching Oligo (75 µM)			
		NEB Next Single Cell RT	1 µL		
		Enzyme			

Paso	Etapas	Reactivo	Volumen	Temperatura	Tiempo
3	Amplificación de ADNc	Template switching	10.0 μ L	DI: 98 °C	DI: 45 seg
		ADNc product (paso 2)		*D: 98 °C	*D:10 seg
		NEBNext High-Fidelity	25.0 μ L	*A: 62 °C	*A: 15 seg
		2X PCR Master Mix		*Ex: 72 °C	*Ex:5 min
		(NEB #M0541)		Exf: 72 °C	Exf:5 min
		ADNc PCR Primer (10 μ M)	1.0 μ L		
	Agua libre de nucleasas	14.0 μ L			

Nota. Después de finalizar cada paso, las muestras fueron colocadas en hielo hasta preparar la siguiente mezcla de reactivos. La tapa del termociclador estaba programada a 95°C en todos los pasos. DI: Desnaturalización inicial; D: Desnaturalización; A: Amplificación; Ex: Extensión; Exf: Extensión final. [*] los pasos se repitieron por 30 ciclos

Cuantificación de ADNc-dc

Una vez obtenido el ADNc-dc mediante TASPert se realizó la limpieza de reactivos y contaminantes con AMPure XP de la marca Beckman Coulter (N° de catálogo A63881) siguiendo el protocolo del fabricante.

Figura 18

Procedimiento para limpieza de ADNc con AMPure XP

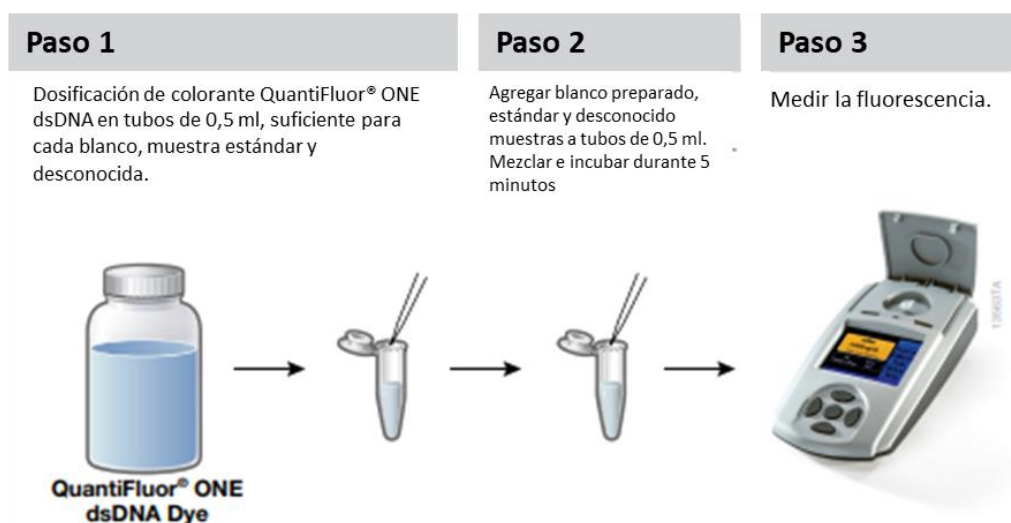


Nota. Adaptado de *AMPure XP Reagent for PCR Purification* por Beckman Coulter, 2023.

Luego se realizó la cuantificación con Quantus™ Fluorometer (N° de catálogo: E6150) usando el kit QuantiFluor ONE dsDNA System (N° de catálogo: E4870), se siguió las instrucciones como indica el fabricante y se anotaron los resultados.

Figura 19

Descripción general de la cuantificación en formato de tubo único con el sistema QuantiFluor® ONE dsDNA.



Nota. Adaptado de *QuantiFluor® ONE dsDNA System Instructions for Use of Products E4871, E4870 and E4891* por Promega, 2023.

Secuenciación con MinION-ONT

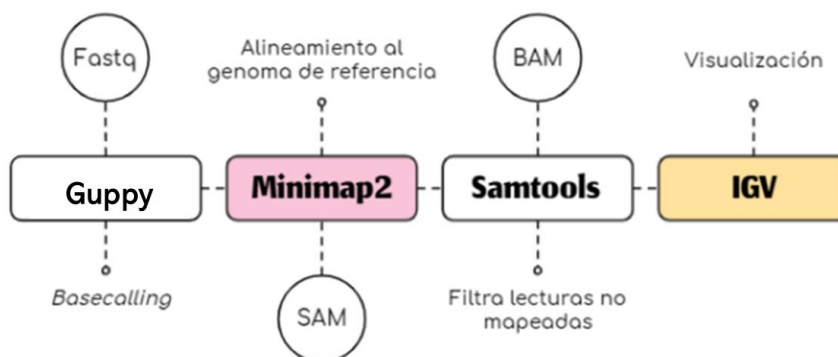
Se usó el ADN complementario de doble cadena obtenido del paso anterior para la elaboración de las bibliotecas con el Kit de Oxford Nanopore: Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) con las extensiones de *barcodes* (EXPND104 y EXP-BD114), se realizó la revisión de poros archivos en MinION (FLOMIN106D) con el Flow Cell Kit (EXP-FLP002) y se usó la última versión del programa MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, 2023), se cargó la librería en MinION durante 72 horas. Después de que

la corrida finalizó se transfirieron los datos a la super computadora Pete de Oklahoma State University y se realizó secuencialmente un *basecalling*, *demultiplexing* y un mapeo a los genomas de referencia.

El *basecalling* y el *the multiplexing* se realizó transformando los datos obtenidos después de la secuenciación de FAST5 a FASTQ con el programa Guppy versión 6.4.6, mientras que el Mapeo de colecciones de genomas se efectuó con el programa minimap 2 versión 2.14, utilizando el parámetro (-ax map-ont) con un total de 529, 88, 12 genomas de referencia obtenidos de NCBI para PVY, TMV y TBSV respectivamente y el ensamblaje completo para *Solanum lycopersicum* L (GCF_000188115.5).

Figura 20

Pipeline bioinformático



Nota. Adaptado de *Desarrollo de un pipeline de trabajo para secuenciación dirigida por CRISPR-CAS9* por Ibáñez Oliver, 2021.

Para obtener los genomas se utilizó la base de datos NCBI y se filtró de la siguiente manera.

Tabla 3

Parámetros para obtener los genomas de referencia en NCBI

Parámetro	PVY	TMV	TBSV
Tipo de molécula	DNA/RNA	DNA/RNA	DNA/RNA
Tipo de secuencia	Nucleótido	Nucleótido	Nucleótido
Longitud de a secuencia	9600-9800 bp	6300-6400 bp	4000-4800 bp

Finalmente, para clasificar, indexar, extraer datos y cambiar formatos se utilizó SAMtools versión 1.10.

Análisis estadístico entre tratamientos con diferentes primers

Para determinar si existe diferencias significativas entre tratamientos, se tomó como criterio el número de *reads*, el cual se normalizó para ajustar los valores de cada tratamiento sacando la abundancia relativa (lecturas mapeadas/lecturas totales); luego, se realizó un ANOVA y se tomó como significativo a los valores menores a un *p valor* de 0,05. En el caso de obtener un valor estadísticamente significativo se procedió a realizar una comparación entre pares con la prueba de Tukey. Estos análisis fueron realizados con *Real Statistics*, un complemento de Microsoft Excel.

Reacción en cadena de polimerasa multiplex PCR-Multiplex

Para la PCR-Multiplex se sintetizó ADNc a partir del ART total extraído con el kit Mini RNeasy Pant de Qiagen (N° de catálogo/ ID: 74904) utilizando random *primers*, la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) y su respectivo buffer tal como se presenta en la

Tabla 4.

Tabla 4

Síntesis de ADNc-dc con random primers

Etapa	Reactivo	Volumen	Temperatura	Tiempo
		1X (μL)	($^{\circ}\text{C}$)	(min)
Desnaturalización	Agua libre de de nucleasas	9.5	70	5
	10mM dNPTs	1		
	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Hexamer	0.2		
	<i>Primers</i>			
	ARN	4		
Transcripción	40U/ μL RNAsin Plus	0.5	37 +/- 2.5	90
	5X buffer M-MLV	4		
	RT			
	200 U/ μL M-MLV	0.8		
	RT			
	Total	20		

Nota. Después de finalizar cada etapa se colocaron las muestras en hielo hasta continuar con el siguiente paso.

Luego, para amplificación se utilizó el termociclador de Eppendorf AG modelo 6321 Master Cycler vapo.protect Pro (N° de catálogo 950030010) con la programación para los ciclos de la siguiente forma: a 95°C por 3 minutos para desnaturalización inicial, luego, para la desnaturalización, hibridación y elongación se usó 95°C por 30 segundos, 52°C por 1.2 min y 72°C por 1 min respectivamente, esto se repitió por 35 ciclos. Después, para la extensión final se programó a 72°C por 2 min.

Finalmente se mantuvo a 18°C hasta abrir la tapa. La disposición de reactivos fue como se presenta en **Tabla 5**.

Tabla 5

Volumen añadido por reactivo

Reactivos	Volumen RX1
Nuclease Free Water	10.85 µL
Hot start Master Mix (2X)	25 µL
Magnesium Chloride 50 mM	1.75 µL
Tombus F3 (25µM)	0.2 µL
Tombus R2 (25µM)	0.2 µL
Tobamo F2 (25µM)	2 µL
Tobamo R2 (25µM)	2 µL
Potex F1 (25µM)	2 µL
Potex R1 (25µM)	2 µL
Muestra de ADNc*	4 µL

Nota. La muestra de ADNc varió en función de cada variable experimental

Los *primers* se seleccionaron por el género de cada virus de la colección privada del *Institute of Biosecurity and Microbial Forensics* (IBMF), los cuales se muestran en la **Tabla 6**

Tabla 6

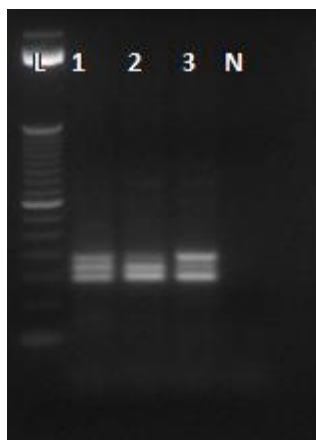
Primers por género para PVY, TMV y TBSV

Virus	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto
TMV	TOBAMO-F2	GGWGAYGTNACIACITTIA	191 bp
	TOBAMO-R2	ARYTTIGCYTCIAARTTCCA	
PVY	POTEX-F1	GAYGGIGCIATGCTICAITT	169 bp
	POTEX-R1	TCIGTRTTIGCRTCRAAIGT	
TBSV	TOMBUS-F3	TGGATATTIATGGTTGCIGGTT	143 bp
	TOMBUS-R2	GTAGGTTGTGGAGTGCGAG	

Para comprobar la amplificación de los productos se realizó una electroforesis con el *buffer Tris-acetate-EDTA* (TAE siglas en inglés) a 1x y realizó un gel al 3% de agarosa, como fluoróforo se utilizó SYBR Safe DNA Gel Stain de Invitrogen. Las condiciones de corrida fueron 70V por 4 horas. Posterior, para visualizar las bandas se utilizó un transiluminador UV de Bio Rad. A continuación, en la **Figura 21** se muestra los resultados esperados.

Figura 21

Bandas de electroforesis para virus de PVY, TMV y TBSV



Nota. (L) Regla de referencia de 1kb. Líneas 1,2 y 3 de arriba hacia abajo, detección de PVY, TBSV y TMV.

Recuperado de: *Direct RRV trapping in plastic por* Ochoa-Corona et al., 2017.

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

Se evaluó la presencia de los tres virus en las muestras mediante pruebas de q-PCR con PowerUp SYBR Green Master Mix a partir del ADNc de doble cadena derivados del proceso de la *Tabla 4*.

Una vez obtenido el ADNc-dc se usó el equipo CORBETT RESEARCH RG-6000 Rotor-Gene (N° catálogo RG-6000) para la amplificación y cuantificación en tiempo real. Los parámetros fueron seteados según el protocolo optimizado por (Espíndola et al., 2021) tal como se presenta en la **Tabla 7**.

Tabla 7

Parámetros de amplificación de q-PCR para PVY, TMV, TBSV

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima	50	2 min	Único
Desnaturalización	94	3 min	Único
Amplificación	94	30 seg	X30
	50	30 seg	
	72	45 seg	

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos
Extensión	72	7 min	Único

Se ensambló la reacción de PCR siguiendo las siguientes condiciones:

Tabla 8

Disposición de reactivos de q-PCR para PVY, TMV y TBSV

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

Los *primers* utilizados para cada virus se muestra en la **Tabla 14**. Todas las reacciones de q-PCR incluyeron: un control negativo para cada virus libre de ADNc viral y controles positivos por cada virus consistente de tejidos vegetales liofilizados surtidos por Agdia. Para definir a un control como positivo para un virus en particular se confirmó mediante secuenciación por Sanger utilizando los mismos cebadores empleados para la q-PCR. Finalmente, para reportar resultados se analizó un umbral para los ciclos (Ct) comparando los resultados de los controles positivos vs los controles negativos y para la temperatura del Melting (Tm) aceptó una variabilidad de ± 1 °C a comparación con el control positivo.

Validación de la técnica de TASPERT

Para respaldar los resultados obtenidos mediante secuenciación con MinION-ONT se sometió el ADNc viral obtenido con los diferentes *primers* de TASPERT a q-PCR bajo las mismas condiciones

detalladas en el punto anterior en la **Tabla 7** y en la **Tabla 8**. Las muestras que se presumen, en base al experimento, contienen un solo virus se trató por triplicado con cada par de primers objetivo. Por otro, lado las muestras que posiblemente contenían una combinación de patógenos fueron tratadas con cada par de primer específico para cada presunto virus y por triplicado como se muestra en la **Figura 22**. Luego, se comparó los resultados de Ct y Tm con los obtenidos del ADNc sintetizado con el protocolo de la **Tabla 4**.

Figura 22

Esquema de reacciones de q-PCR para validación de TASPERT

Distribución para un disco de rotor de 72 pocillos					
					
RONDA 1					
N° -P	P-cDNA	N.M	N° -P	P-cDNA	N.M
1-3	T.S	TMV_1	37-39	T.S	PVY_1
4-6	T.S	TMV_2	40-42	T.S	PVY_2
7-9	T.S	TMV_3	43-45	T.S	PVY_3
10-12	Flap	TMV_1	46-48	Flap	PVY_1
13-15	Flap	TMV_2	49-51	Flap	PVY_2
16-18	Flap	TMV_3	52-54	Flap	PVY_3
19-21	Lit	TMV_1	55-57	Lit	PVY_1
22-24	Lit	TMV_2	58-60	Lit	PVY_2
25-27	Lit	TMV_3	61-63	Lit	PVY_3
28-30	G.S	TMV_GS	64-66	G.S	PVY_GS
31-36	G.S	C+ (TMV)	67-69	G.S	C+ (PVY)
34-36	G.S	C- (TMV)	70-72	G.S	C- (PVY)
RONDA 2					
N° -P	P-cDNA	N.M	N° -P	P-cDNA	N.M
1-3	T.S	TBSV_1	37-39	T.S	V3_TMV_1
4-6	T.S	TBSV_2	40-42	T.S	V3_TMV_2
7-9	T.S	TBSV_3	43-45	T.S	V3_TMV_3
10-12	Flap	TBSV_1	46-48	Flap	V3_TMV_1
13-15	Flap	TBSV_2	49-51	Flap	V3_TMV_2
16-18	Flap	TBSV_3	52-54	Flap	V3_TMV_3
19-21	Lit	TBSV_1	55-57	Lit	V3_TMV_1
22-24	Lit	TBSV_2	58-60	Lit	V3_TMV_2
25-27	Lit	TBSV_3	61-63	Lit	V3_TMV_3
28-30	G.S	TBSV_GS	64-66	G.S	V3_TMV_GS
31-36	G.S	C+ (TBSV)	67-69	G.S	V3_C+ (TMV)
34-36	G.S	C- (TBSV)	70-72	G.S	V3_C- (TMV)
RONDA 3					
N° -P	P-cDNA	N.M	N° -P	P-cDNA	N.M
1-3	T.S	V3_PVY_1	37-39	T.S	V3_TBSV_1
4-6	T.S	V3_PVY_2	40-42	T.S	V3_TBSV_2
7-9	T.S	V3_PVY_3	43-45	T.S	V3_TBSV_3
10-12	Flap	V3_PVY_1	46-48	Flap	V3_TBSV_1
13-15	Flap	V3_PVY_2	49-51	Flap	V3_TBSV_2
16-18	Flap	V3_PVY_3	52-54	Flap	V3_TBSV_3
19-21	Lit	V3_PVY_1	55-57	Lit	V3_TBSV_1
22-24	Lit	V3_PVY_2	58-60	Lit	V3_TBSV_2
25-27	Lit	V3_PVY_3	61-63	Lit	V3_TBSV_3
28-30	G.S	V3_PVY_GS	64-66	G.S	V3_TBSV_GS
31-36	G.S	V3_C+ (PVY)	67-69	G.S	V3_C+ (TBSV)
34-36	G.S	V3_C- (PVY)	70-72	G.S	V3_C- (TBSV)

Nota. Elaborado con PowerPoint - Microsoft 365

Capítulo IV: Resultados

Siembra e infección de *Solanum lycopersicum* L

Después de dos semanas, de las 100 macetas sembradas, se observó que 95 tuvieron desarrollo de las semillas. La clasificación por tamaño se hizo en sentido ascendente teniendo como punto de referencia la yema apical, se distribuyeron 5 grupos de 10 unidades como se muestra en la **Figura 13**. Las macetas sobrantes fueron desechadas siguiendo los protocolos de bioseguridad de IBMF.

Figura 23

Crecimiento de Solanum lycopersicum L después de dos semanas.



Nota. en la imagen de la izquierda se muestra el crecimiento de varias plantas en la misma maceta, mientras que en la derecha ya se ha seleccionado a una única planta para el proceso de infección posterior.

El reporte de síntomas visibles de todas las muestras se adjunta en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**. El síntoma más predominante fue el moteado amarillo seguido del arrugamiento y en menor cantidad la falta de crecimiento. La mayor parte de plantas, alrededor del 90%, presentaron más de un síntoma, los cuales se resumen presenta en la **Tabla 9** y en la **Figura 24** se muestran hojas de *Solanum lycopersicum* L con los síntomas observados.

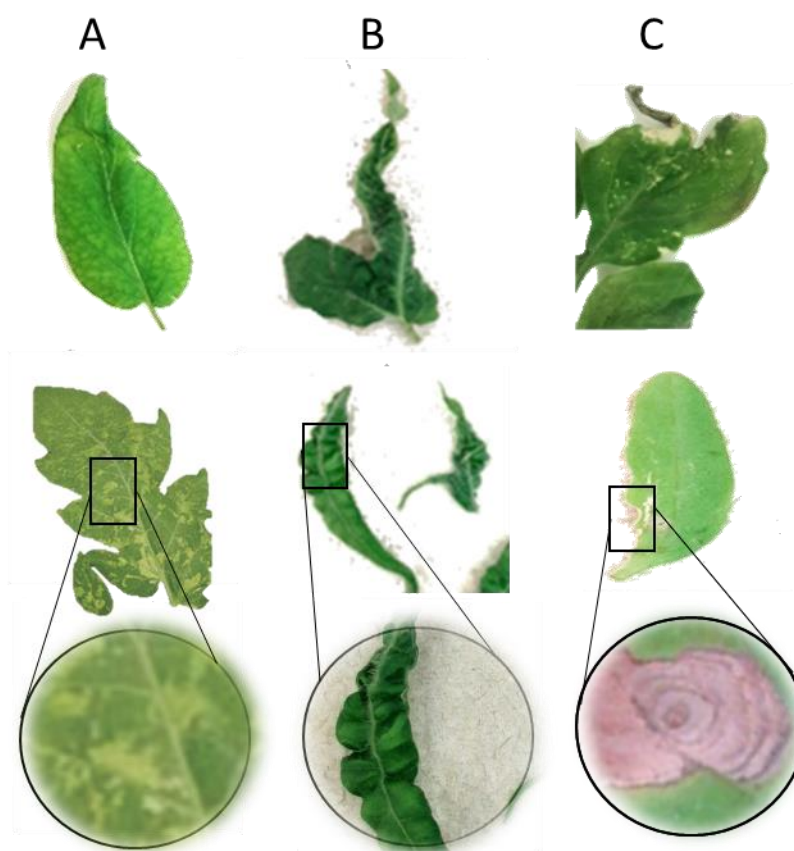
Tabla 9

Síntomas presentados por cada virus en Solanum lycopersicum L

Virus	Síntomas
TMV	Mosaico, reducción de tamaño
PVY	Enrollamiento, manchas en mosaico
TBSV	Necrosis, arrugamiento y deformación

Figura 24

Hojas de Solanum lycopersicum L con síntomas evidentes de infección



Nota. En la columna (A) Puntos amarillos, lo que se presume como mosaico. (B) Hojas enrolladas y/o deformadas. (C) Hojas con secciones necróticas.

Extracción de ARN total y parámetros de calidad

Se extrajo ARN total de 44 muestras con volumen final de 30 μ L. Las mediciones obtenidas tanto con Quantus™ Fluorometer y con NanoDrop 2000 Thermo Scientific así como la relación entre 260/280 y

260/230 se presentan en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La concentración promedio obtenido con Quantus™ Fluorometer fue de 252.64 ng/ μ L mientras que en NanoDrop 2000 Thermo Scientific se midió un promedio de 138.39 ng/ μ L. Por otro lado, la pureza se determinó con la relación entre 260/280 y 260/230, la mediana y la moda de la relación entre 260/280 y 260/230 fue de 2.1 y 1.6 respectivamente. Las curvas de absorbancias obtenidas por espectrofotometría para cada variable experimental (PVY, TMV, TBSV, V3 y CN), se muestran en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Se esperaba enviar 25 muestras, 5 para cada variable experimental, al Core Facility de Oklahoma State University para verificar la integridad del ARN mediante el RIN, sin embargo, para TMV tan solo 4 muestras pasaron los criterios de selección por cual se envió un total de 24 muestras las cuales están resaltadas en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Los datos arrojados por Agilent 2100 Bioanalyzer se presentan en la **Tabla 10** y revela que las proporciones entre rARN 25s/18s son entre 0.6 para el valor más bajo y 2.1 el más alto. Esta relación fue obtenida del electroferograma de cada muestra en donde las señales fluorescentes muestran que la intensidad del pico 25S es mayor que el pico 18S como se puede ver en la **Figura 25**. El resumen de los 24 electroferogramas se detalla en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Por otra parte, los valores de RIN para todas las muestras son superiores a 6.10 lo que sugiere que las muestras están parcialmente degradadas.

Tabla 10

Datos del Número de Integridad del ARN de *Solanum lycopersicum* L

V.EX	N° Planta	RIN	Concentración de ARN	Proporción de rARN
			[ng/ μ L]	[25s/18s]
CN	1	6.60	1068	1.4

V.EX	N° Planta	RIN	Concentración de ARN	Proporción de rARN
			[ng/ μ L]	[25s/18s]
CN	2	6.50	231	1.7
CN	3	7.20	351	1.6
CN	7	7.90	550	1.6
CN	9	6.50	128	2.1
PVY	12	7.00	108	1.7
PVY	13	8.10	841	1.7
PVY	16	7.20	190	1.8
PVY	17	6.20	151	1.5
PVY	18	6.50	170	1.6
TBSV	22	6.90	223	1.6
TBSV	24	6.00	101	1.7
TBSV	25	6.50	114	1.9
TBSV	28	7.20	202	1.7
TBSV	29	7.20	74	1.6
TMV	32	7.00	104	0.6
TMV	34	6.50	207	1.5
TMV	36	6.90	176	1.5
TMV	39	7.10	139	1.6
V3	41	7.40	359	1.5
V3	42	6.60	123	1.5
V3	43	6.70	81	1.5
V3	47	6.60	343	1.5

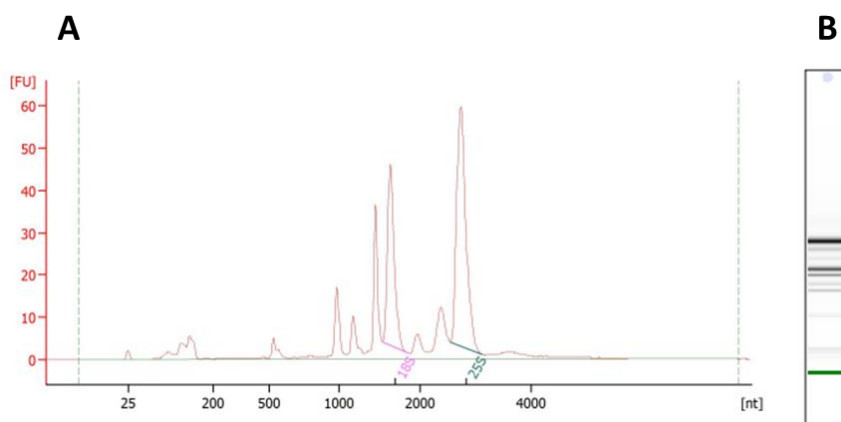
V.EX	N° Planta	RIN	Concentración de ARN	Proporción de rARN
			[ng/ μ L]	[25s/18s]
V3	49	7.20	192	1.7

Nota. VEX: Variable experimental; RIN: número de integridad de ARN.

Figura 25

Electroferograma representativo de ARN de Solanum lycopersicum L obtenido con Agilent 2100

Bioanalyzer en la determinación de RIN



Nota. (A) Las señales fluorescentes de trazas individuales en el ARN muestran que la intensidad del pico 28S es mayor que el pico 18S y se observa ligeros picos de contaminación. (B) En una imagen de gel virtual de la muestra de ARN, ambas bandas de 26S y 18S son nítidas y claramente identificables

Finalmente, en la **Tabla 11** se recogen los datos de concentración, pureza e integridad de las 15 muestras seleccionadas para el diagnóstico.

Tabla 11

Muestras seleccionadas para el diagnóstico de PVY, TMV y TBSV

V.Ex	N° Planta	Concentración de ARN		Pureza [260/280]	Integridad [RIN]
		[ng/ uL]			
		Quantus™	NanoDrop		
CN	1	202	203	2.1	6.60
CN	3	223	571	2.2	7.20
CN	7	238	1,235	2.2	7.90
PVY	12	854	70.4	2.12	7.00
PVY	13	150	59.7	2.22	8.10
PVY	16	993	116.1	2.09	7.20
TBSV	22	220	69.3	2.06	6.90
TBSV	28	184	63.9	2.09	7.20
TBSV	29	75.5	52.7	2.09	7.20
TMV	34	179	37.1	2.13	6.50
TMV	36	189	13.1	2.22	6.90
TMV	39	276	61.5	2.09	7.10
V3	41	407	90.3	2.01	7.40
V3	43	723	91.4	2.9	6.70
V3	49	542	93.8	2.08	7.20

Diseño de *primers*

A continuación, se detalla los *primers* obtenidos con cada proceso.

Tabla 12

Primers con Flap

Virus	Nombre	Secuencia 3'→5'
TMV	TMV-6-t	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT GGGCCCCTACCGGSGGTAA
PVY	PVY-6-t	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCTCCTGATTGAAGTTACA G
TBSV	TBSV-6-t	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC GGGCTGCATTTCTGCAATGT

Nota. La sección marcada en negritas pertenece al flap.

Los *primers* cuya terminación es un número se colocaron en el primer paso de TASPERT mientras que, aquellos que tienen el terminal “-a” fueron utilizados en el tercer paso.

Tabla 13

Primers Two Steps

Virus	Nombre	Secuencia 3'→5'
TMV	TMV-6	TGGGCCCCTACCGGSGGTAA ACG
	TMV-6-a	GGGGGATT CGA ACCCCTC
PVY	PVY-6	GTCTCCTGATTGAAGTT TACAG
	PVY-6-a	T CACTGYTATGAC RRAATCACA
TBSV	TBSV-6	GGGCTGCATTTCTGCAAT GTTT C
	TBSV-6-a	CGGTTGTCCGGTAGT GCTT C

Después de filtrar en base a la especificidad, tamaño del producto, dimerización y T_m, los *primers* seleccionados fueron los que se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14

Primers de literatura para PVY TMV y TBSV

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tm [°C]	Tamaño [bp]	Referencia
TMV-F	GGAAACCTTCACCACAAGT	79.3	150	(L. Zhao et al., 2012)
TMV-R	TATAGCGCTCCTTATGGC	79.8		
PVY-F	TGAAAATGGAACCTCGCC	80.5	129	(A. Salazar et al., 2021)
PVY-R	AATGTGCCATGATTTGCC	79.4		
TBSV-F	CGGTTTGTGAGAAGGTTGGG	79.05	218	(Onozuka et al., 2021)
TBSV-R	GTTTCGAGGCTGAATCACCC	78.91		

El primer creado para amplificar una sección del cromosoma 6 del hospedador se presenta en la

Tabla 15.

Tabla 15

Primer para Solanum lycopersicum L

Nombre	Secuencia
HKG-1	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACCGCCTGTCAATCTTGGTCAGTAT

Nota. La sección marcada en negritas pertenece al flap

Síntesis de ADNc-dc mediante TASPERT y cuantificación.

La concentración final de las muestras de ADNc de doble cadena sintetizadas mediante TASPERT se muestran en la **Tabla 16**. La elución de las muestras se realizó en 20 μ L de agua libre de nucleasas. Los valores de concentración varían considerablemente entre muestras y entre tratamientos por lo que no se puede inferir qué diseño de *primers* tiene mayor capacidad de síntesis y amplificación.

Tabla 16

Cuantificación con el sistema QuantiFluor® ONE dsDNA.

V.Ex	N°	Concentración de ADNc [ng/ μ L]			
	Planta	Flap	<i>Two Steps</i>	Literatura	Hospedador
CN	1	142	135	148	51
CN	3	180	157	52	151
CN	7	178	167	72	224
PVY	12	78	198	210	177
PVY	13	94	102	144	135
PVY	16	226	187	215	75
TBSV	22	98	205	81	213
TBSV	28	184	103	75	80
TBSV	29	212	178	111	166
TMV	34	217	219	179	64
TMV	36	80	209	88	126
TMV	39	153	169	83	160
V3	41	95	230	185	179
V3	43	206	92	57	160
V3	49	170	187	164	82

Nota. Flap, *Two Steps*, Literatura y Hospedador hacen referencia a los diferentes diseños de primers creados para la síntesis de ADNc mediante TASPERT.

Secuenciación con MinION-ONT como método de diagnóstico

La secuenciación con Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) con las extensiones de barcodes (EXPND104 y EXP-BD114) tiene una capacidad de analizar hasta 24 muestras de forma simultánea, por ello realizaron dos corridas que tuvieron una activación de poros del 60 y el 80%

respectivamente. De la primera corrida se obtuvo un total de $6801623e+6$ *reads* en un tiempo de 50 horas, mientras que en la segunda corrida consiguió $1.761705e+7$ *reads* en un tiempo en 72 horas.

Tabla 17

Datos obtenidos después de la secuenciación de muestras tratadas con TASPERT

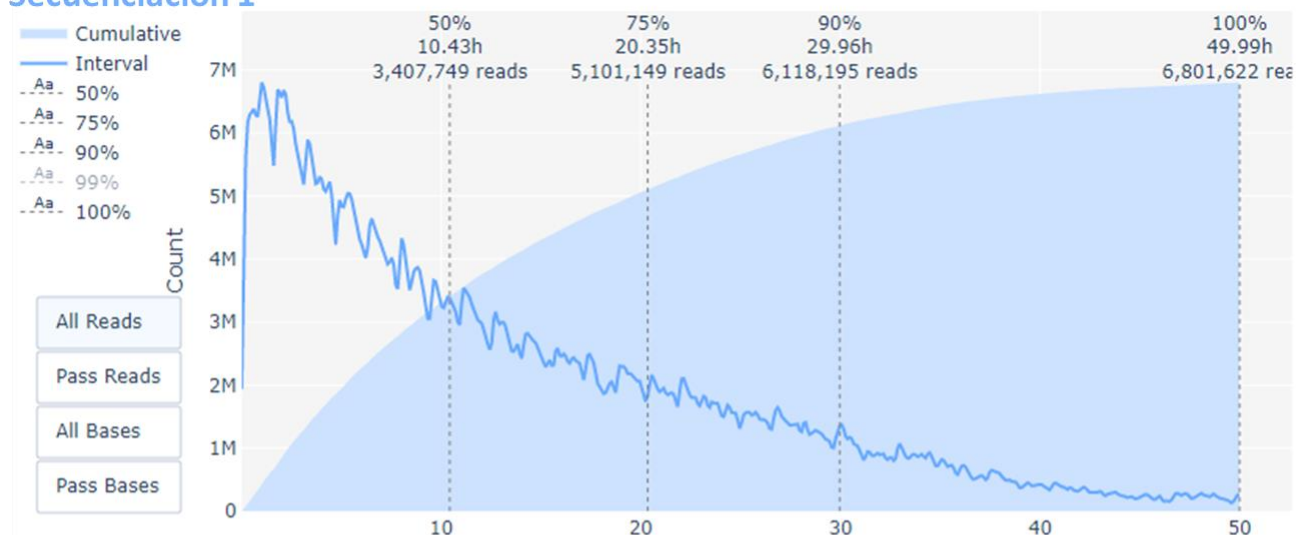
Corrida	Estado	Reads	Bases	Longitud media	Calidad media de alineamiento
1	Num de <i>reads</i> totales	$6801623e+6$	$3145438e+9$	353	9.11
	Num de <i>reads</i> aprobados	$5094452e+6$	$2277977e+9$	354	10.03
2	Num de <i>reads</i> totales	$1.761705e+7$	$931171e+9$	412	9.40
	Num de <i>reads</i> aprobados	$1.373778e+7$	$7.172537e+9$	413	10.28

En la secuenciación 1 a las 30 horas se había realizado el 90% de la corrida teniendo 6118195 millones de *reads* mientras que la segunda secuenciación en el mismo tiempo se obtuvo 13216307 millones de *reads*.

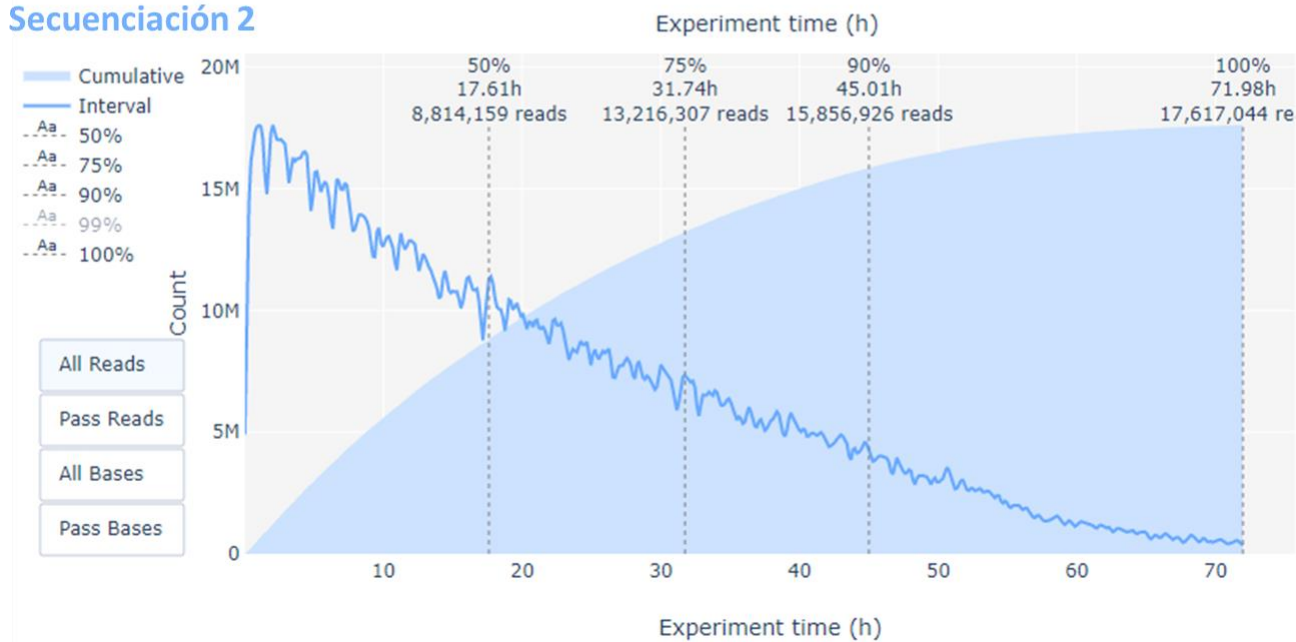
Figura 26

Número de lecturas realizadas por hora

Secuenciación 1



Secuenciación 2



Nota. Modificado de Nanoplot versión 1.32.1 por © Anaconda, 2023

A continuación, el la

Figura 27, se muestra la distribución de *reads* en base a la calidad obtenida, logrando una media de 9.10 y 9.43 para la primera y segunda corrida respectivamente.

Figura 27

Número de lecturas realizadas por hora

Secuenciación 1



Secuenciación 2

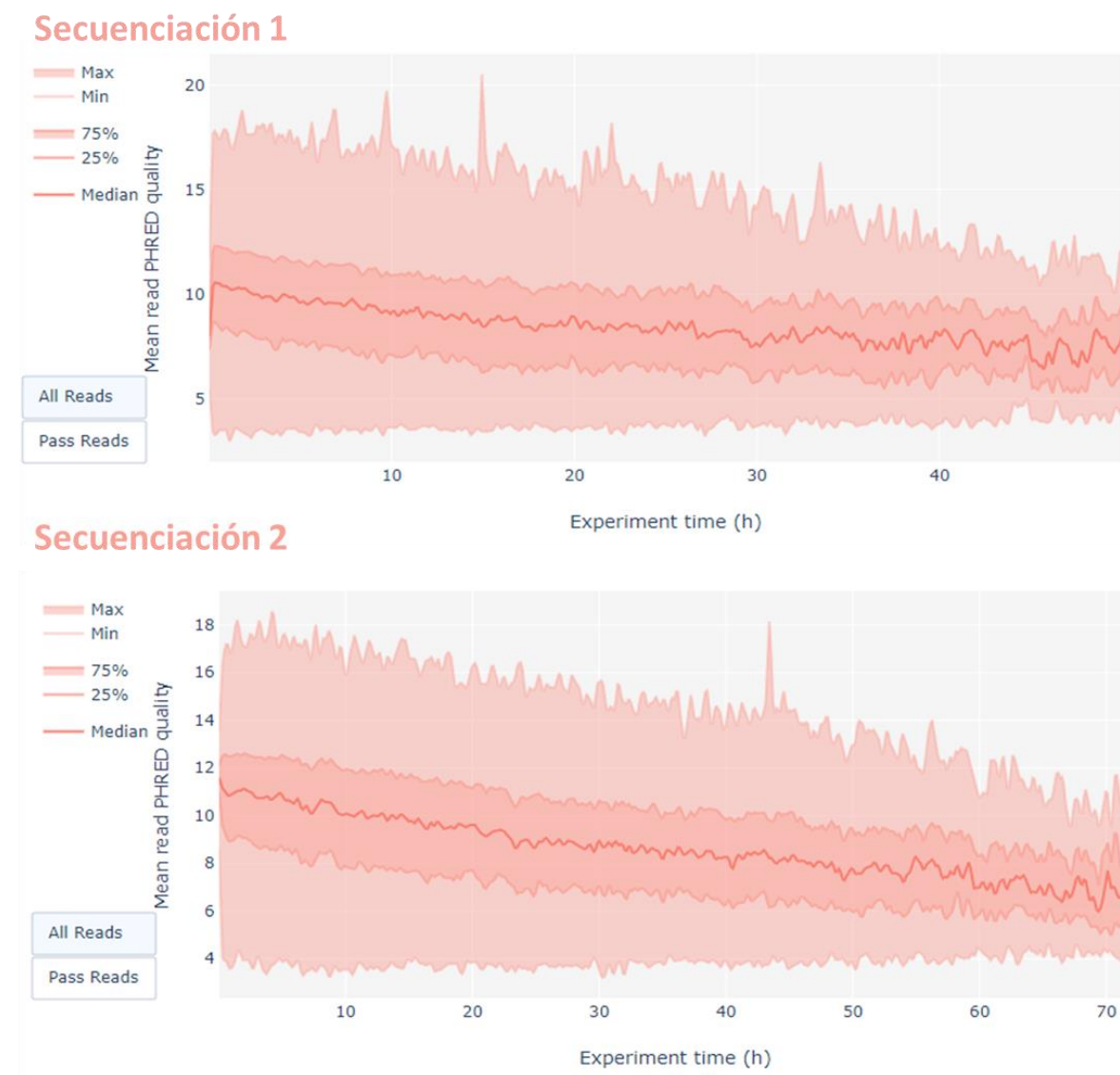


Nota. Modificado de Nanoplot versión 1.32.1 por © Anaconda, 2023

Se observó que la calidad de las lecturas es dependiente al tiempo transcurrido de la secuenciación pues como se puede ver la **Figura 28**, la calidad va disminuyendo de forma paulatina.

Figura 28

Calidad de lectura conforme el tiempo

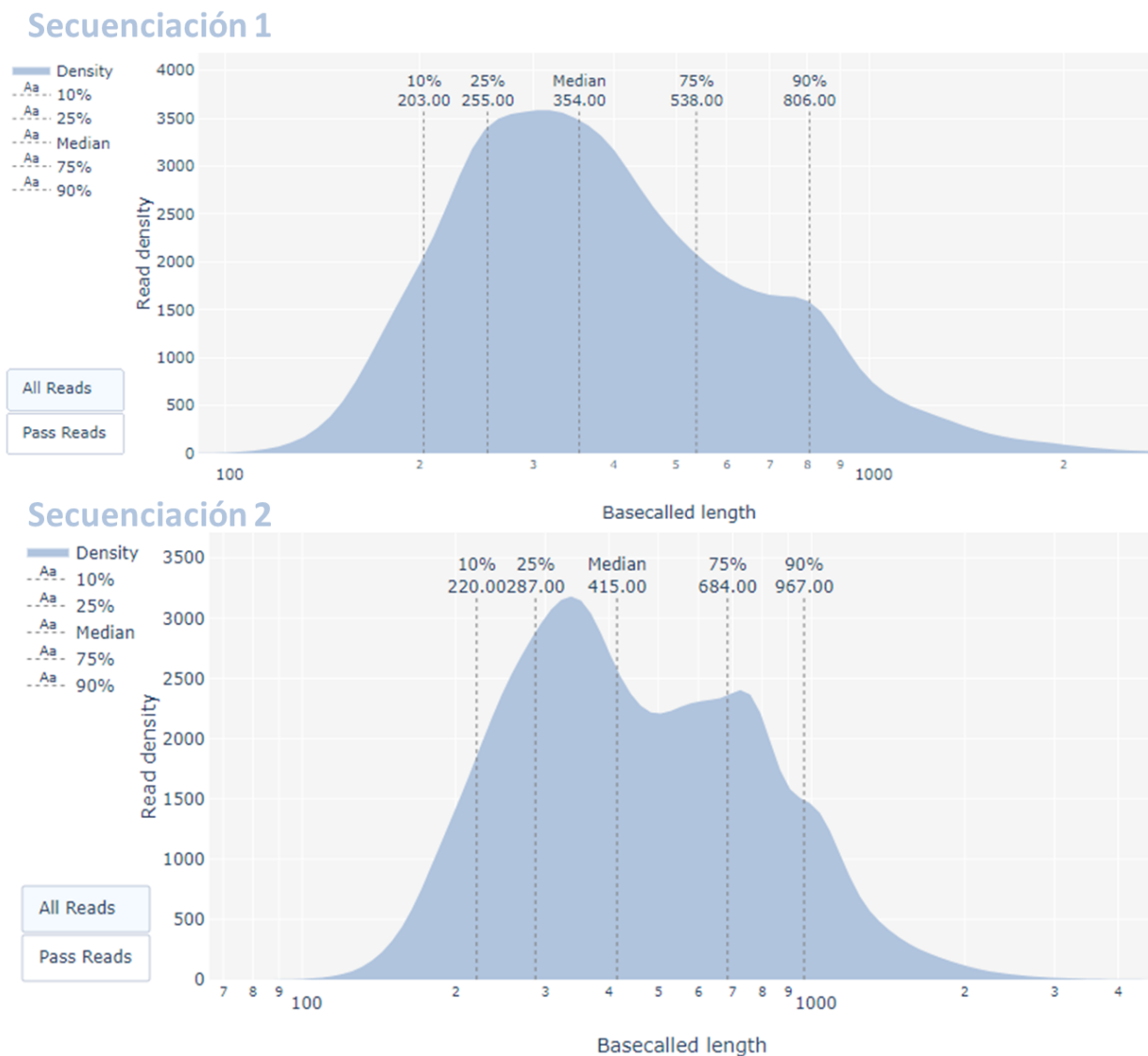


Nota. Modificado de Nanoplot versión 1.32.1 por © Anaconda, 2023

Para la primera secuenciación la longitud media de los *reads* es de 354 pb mientras que en los extremos se anota a 108 pb como el fragmento secuenciado más corto y a 2210 pb como el más largo. Por su parte para la segunda secuenciación la medía es de 415 pb y al extremo derecho se obtiene un máximo de 3200 pb.

Figura 29

Distribución de la longitud de lecturas por corrida



Nota. Modificado de Nanoplot versión 1.32.1 por © Anaconda, 2023

Finalmente, en la **Figura 30** se muestra la calidad de lectura relacionada con la longitud. Para ambas corridas se puede observar que la mayor densidad de lecturas se encuentra en el rango de 200 a 300 y que la calidad de las mismas está alrededor de 9, ahora bien, no se encontró relación significativa

en si la longitud de la secuencia aumentaba o disminuía la calidad de la lectura puesto que el grafico es relativamente homogéneo.

Figura 30

Longitud de reads vs la calidad de lecturas



Nota. Modificado de Nanoplot versión 1.32.1 por © Anaconda, 2023

Los parámetros de selección para determinar un diagnóstico mediante secuenciación con Direct cDNA Native Barcoding (SQK-DCS109) con las extensiones de barcodes (EXPND104 y EXP-BD114) para los virus TMV, TBSV y PVY se presentan en la **Tabla 18**.

Tabla 18

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	

Con base en los parámetros mencionados anteriormente, a continuación, se muestra una tabla de resumen de la detección lograda mediante secuenciación con los diferentes tipos de primers diseñados.

Los números de accesión presentados en la **Tabla 19** corresponden a los siguientes aislados:

- **EU563512.1:** Potato virus Y strain C isolate PRI-509, complete genome
- **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
- **NC_007898.3:** *Solanum lycopersicum* chloroplast, complete genome
- **NC_015441.3:** *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706 chromosome 4, SL3.0, whole genome shotgun sequence

Tabla 19

Promedio de los datos recogidos por réplica de cada variable experimental después de establecer los parámetros de diagnóstico

Variable Experimental	Nombre del primer	#Accesión	Número de reads	Cobertura por bases	% de Cobertura	Profundidad de seq	Calidad por base	Calidad de alineamiento
TMV	Flap	OL471714.1	26444	6386	100	2887,1	20,5	48,3
	<i>Two Steps</i>	OL471714.1	33014,7	6386	100	5779,5	20,5	52,3
	Literatura	OL471714.1	18176,33	6385	99,98	1126,9	20	47,57
TBSV	Flap	M21958.1	2520,3	4434	92,8	192,4	19,57	0,81
		NC_001554.1	2568	4606,7	96,5	194,3	19,6	1,04
	<i>Two Steps</i>	M21958.1	31581,3	4527,7	94,8	2262,6	19,5	0,4
		NC_001554.1	31628	4508,67	94,40	2274,26	19,37	0,45
	Literatura	M21958.1	12439,3	4775	100	448,8	20	1,0
		NC_001554.1	12329,7	4775	100	447,0	20	0,9
		NC_007898.3	1874	27490	17,7	1,9	19,6	6,6
PVY	Flap	EU563512.1	1802,3	8962,7	92,4	148,7	20,0	35,5
	<i>Two Steps</i>	EU563512.1	568,3	9631,3	99,3	22,2	20,4	39,3
	Literatura	OL471714.1	26444	6386	100	2887,1	20,5	48,3

Variable	Nombre	#Accesión	Número de	Cobertura	% de	Profundidad	Calidad por	Calidad de
Experimental	del primer		<i>reads</i>	por bases	Cobertura	de seq	base	alineamiento
V3	<i>Two Steps</i>	OL471714.1	18176	6385	100	1127	20	48
		M21958.1	542,00	4645,50	97,27	34,55	19,35	0,09
	Literatura	OL471714.1	1854	5810	90,98	105.658	19.8	39,90
		M21958.1	8327	4775	99.8	448.366	19.2	0,05
<i>Solanum</i>	Flap	NC_015441.3	2553	248595	0,37	0,008691	21,3	48,8
<i>lycopersicum</i>		OL471714.1	302	5873	91,9668	34,6481	20,8	48
(CN)	<i>Two Steps</i>	NC_015441.3	2186	242308	0,36	0,00793573	21,5	49
		OL471714.1	261	6338	99,2484	29,1223	20,7	48,6
	Literatura	NC_015441.3	2611	186950	0,33	0,00985357	20,8	51,8
		OL471714.1	215	6383	99,953	21,609	20	45,3

Nota. Los datos obtenidos como control positivo para *Solanum lycopersicum* L no son presentados en la tabla puesto que solo usó para obtener los parámetros de selección.

Todos los cebadores utilizados para la amplificación del virus del mosaico del tabaco (TMV) generaron secuencias con una identidad del 99,9% con la variante cuyo número de acceso es OL471714.1. El alineamiento de estas secuencias presentó una calidad superior a 45 en todos los tratamientos, y se logró una profundidad de secuenciación de 2887,1, 57795 y 1126,9 para los *primers* Flap, *Two Steps* y Literatura respectivamente. El análisis de ANOVAs se obtuvo un *p valor* de 0,000112 lo que indica que existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Al realizar comparaciones entre pares de tratamientos, se encontró una significancia en el tratamiento con el *primer Two Steps* en comparación con los otros dos, mientras que no se observó una diferencia significativa entre los cebadores Flap y Literatura.

En el caso de TBSV, se amplificaron secuencias que presentaron una mayor identidad con dos variantes reportadas en la base de datos GenBank (M21958.1 y NC_001554.1). La profundidad de secuenciación obtenida fue de 192 con el cebador Flap, 2262 con el *primer Two Steps* y 448 con el *primer* de literatura. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, al considerar la profundidad de secuenciación, se observó que el cebador *Two Steps* alcanzó valores más altos en comparación con los otros tratamientos. Además, es importante destacar que el cebador de literatura también identificó a *Solanum lycopersicum* con una cobertura del 17%, lo cual representa una buena cobertura considerando el tamaño del genoma de la planta en comparación con el tamaño del genoma del virus.

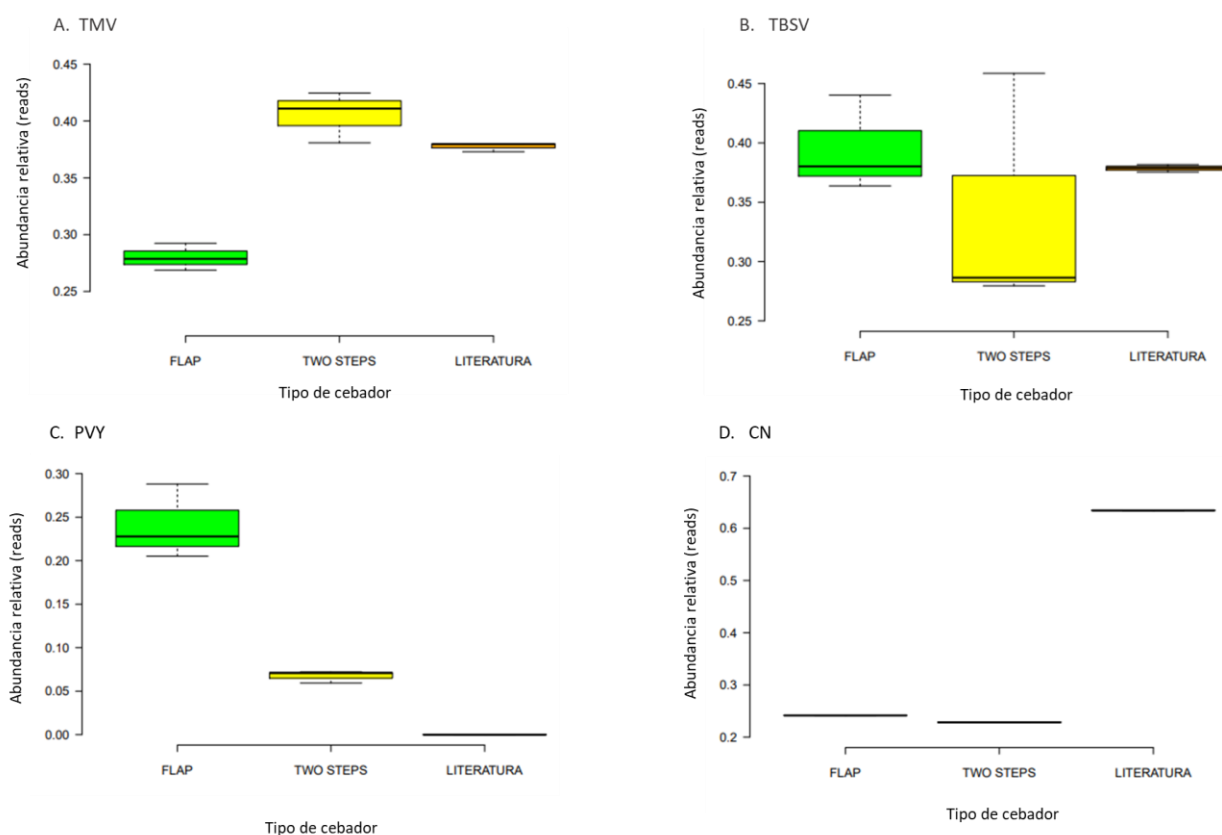
La especie de PVY detectada fue EU563512.1 tanto con el *primer Flap* como con el *primers Two Steps*, con el *primer* de literatura no se pudo detectar ninguna especie de PVY. En el análisis estadístico mostró que el *primer Flap* tuvo diferencias significativas y del mismo modo que en el diagnóstico de TMV, el uso de los *primers Two Steps* o Literatura no tiene diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, en relación a la variable experimental V3, que corresponde a la inoculación con los tres virus, se logró detectar los virus TMV y TBSV utilizando los *primers Two Steps* y de literatura,

mientras que con el *primer* Flap no se detectó ningún virus. En el control negativo se identificó a *Solanum lycopersicum* L. con aproximadamente 2100 lecturas y se confirmó la ausencia de virus con todos los *primers* utilizados.

Figura 31

Diagrama cajas y bigotes de la detección de TMV, PVY y TBSV con diferentes tratamientos de primers.



Nota. Comparación de lecturas asignadas al genoma de TMV, TBSV Y PVY después de HTS de bibliotecas generadas con los *primers* Flap, Two Steps y Literatura. CN es el control negativo de referencia. Se usó un *p* valor de $\leq 0,05$. Elaborado en R STUDIO por © R-Tools Technology, 2023.

Tabla 20

Tabla de resumen de la efectividad de los primers luego del análisis estadístico

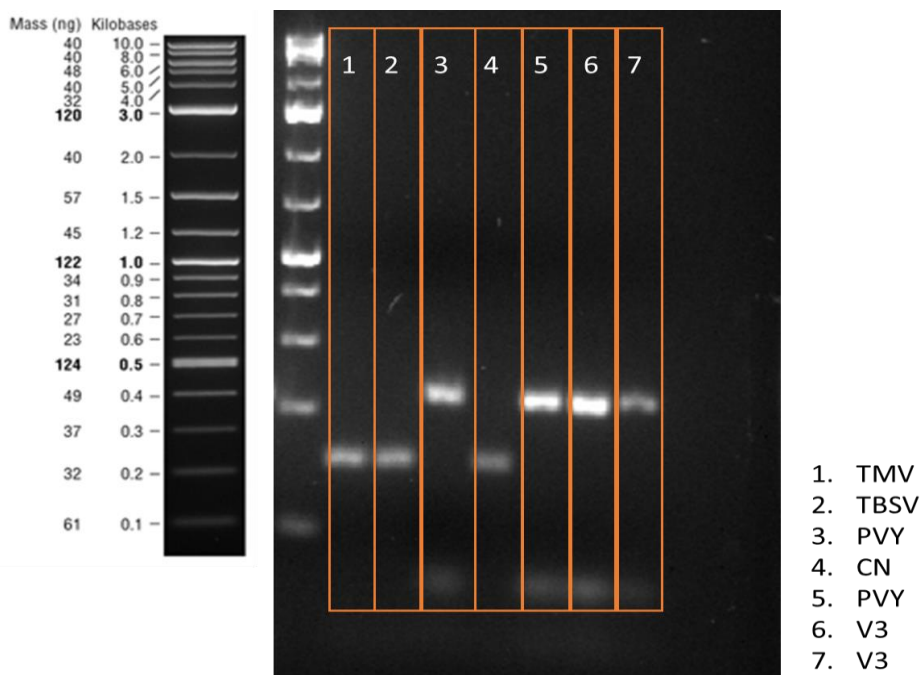
DetECCIÓN	Mejor <i>primer</i>	Observaciones
TMV	<i>Two Steps</i>	Sin observaciones
TBSV	No se encontró diferencias significativas	El <i>primer Two Steps</i> logró una mayor profundidad de secuenciación.
PVY	flap	Sin observaciones

PCR Multiplex como método de diagnóstico

La detección de PVY TMV y TBSV se muestra en la **Figura 32** en la cual se puede identificar 7 bandas bien definidas, para poder comparar se usó como referencia 1 kb Plus DNA Ladder (N° de catálogo N3200SVIAL). Las bandas 1,2 y 4 tienen un tamaño aproximado de 250 pb mientras que el tamaño de las bandas 3,5,6 y 7 es de 400pb. Las líneas 6 y 7 contienen muestras que fueron infectadas con los tres virus, sin embargo, no se obtuvo una buena definición de bandas como en **Figura 21**

Figura 32

Gel al 1.5% de agarosa con producto de PCR Multiplex

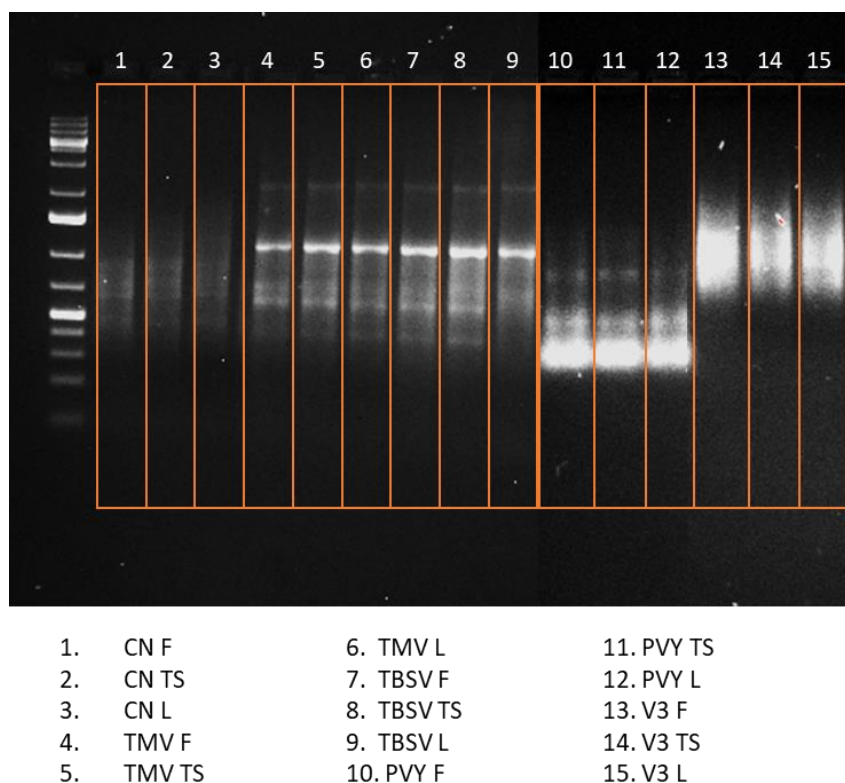


Nota. Modificado de Imagen Lab por © Bio-Rad Laboratories, 2023

Después de procedió a comparar los ADNc obtenidos mediante TASPERT con PCR Multiplex. Los resultados se presentan en la **Figura 33**.

Figura 33

Electroforesis de ADNc sintetizado con diferentes primers con el método de TASPERT



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

El ADNc sintetizado con la técnica de TASPERT no mostró bandas definidas, por el contrario, se observa manchas en la mayoría de las muestras lo que impide la determinar la ausencia o presencia de un virus en particular. Para los fines de esta investigación fue necesario buscar otro método de diagnóstico que permita determinar y comparar la detección de virus.

Comparación de diagnóstico con reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) y TASPERT.

Los valores de ciclo umbral (threshold cycle - Ct) y la temperatura de Melting (Tm) de los controles positivos y negativos de cada virus se presentan en la **Tabla 21**.

Tabla 21

Valores obtenidos de los controles positivos y negativos de TMV, PVY y TBSV

Virus	Ct		Tm
	Positivo	Negativo	
TMV	2,31	25,47	78,22
TBSV	11,42	22,28	83,53
PVY	14,50	24,70	80,45

Nota. Para el control negativo de la técnica se utilizó agua libre de nucleasas y para el control positivo se utilizó ADNc sintetizado a partir de liofilizados de Agdia.

Se realizaron 3 réplicas por cada muestra y se realizó un promedio de cada una el cual se presenta en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, luego se tomaron los valores iniciales, excluyendo los datos atípicos de las 3 réplicas de las 3 muestras de cada variable experimental y se agrupó en un solo dominio para presentar una tabla resumen.

Tabla 22

Valores de Ct y Tm obtenidos con diferentes tipos de primers comparados con el Gold Estándar mediante q-PCR

Virus	Tipo de <i>primer</i>				Tipo de <i>primer</i>			
	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	12,20	83,99	84,10	84,03	84,72
V3 _{PVY}	13,13	6,58	12,51	SD	84,70	SD	84,69	SD

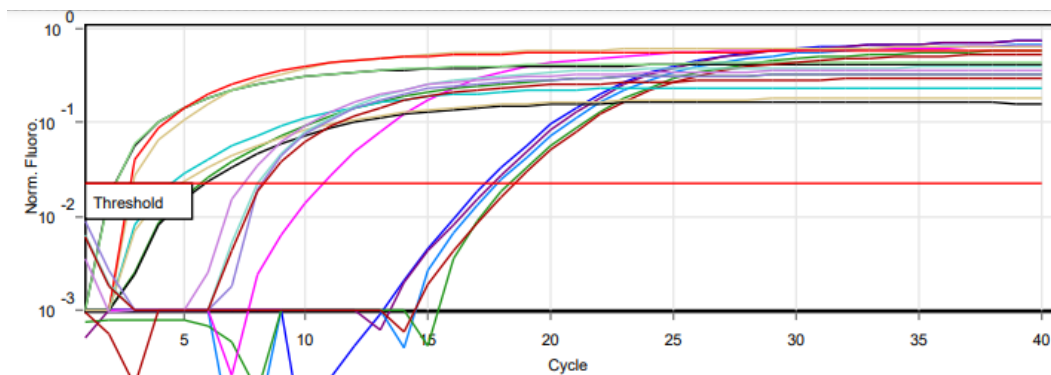
Nota. SD: Sin datos; TS: *Two Steps*; GS: Gold Standard

Las muestras se definieron como positivas cuando presentaron un Ct inferior al control negativo y cuando Tm varió en ± 1 °C respecto al control positivo.

Con excepción de PVY los valores de Ct obtenidos con los primers diseñados para TASPERT, son considerablemente más bajos a comparación del Gold Estándar sintetizado con *random primers* (**Tabla 4**) incluso superando los valores del control positivo, esto se corroboró realizando una ANOVA que dio un *p* valor de 0,04288; por su parte Tm se mantiene la misma temperatura en todos los casos. En la **Figura 34** se muestran las curvas obtenidas de ciclos tanto de TMV como de TBSV y en la **Figura 35** se observan dos picos muy bien diferenciados en 78 y 83°C que hacen referencia a los virus TMV y TBSV respectivamente. Esta comparación tiene concordancia con los resultados obtenidos con la secuenciación con MinIon-ONT. Estas gráficas muestran un verdadero positivo.

Figura 34

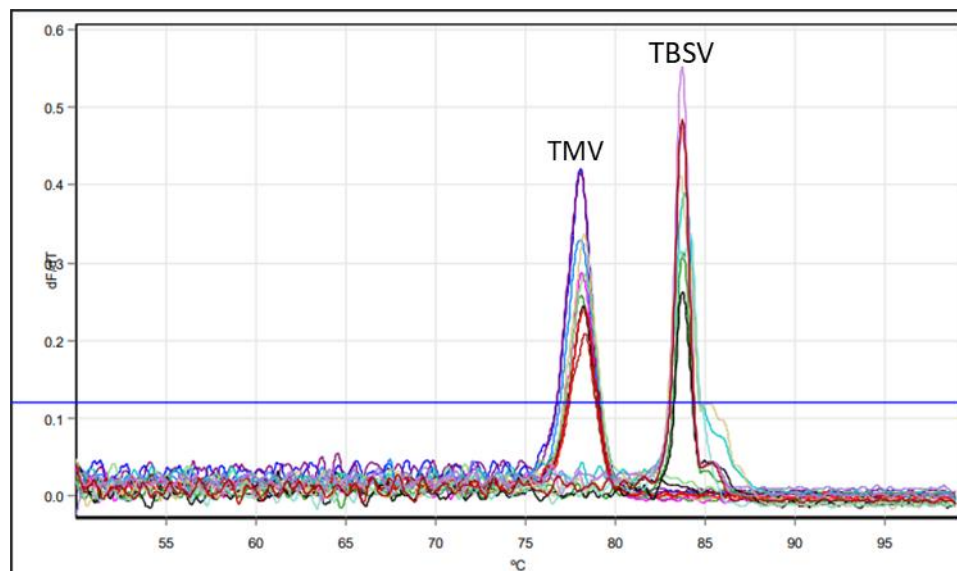
Representación de las curvas (Ct) generadas por las muestras de TASPERT y el Gold Estándar



Nota. Obtenido de Rotor-Gene Q 2.1.0.9 - Windows platform por © QIAGEN, 2023

Figura 35

Representación de las curvas (Tm) generadas por las muestras de TASPERT y el Gold Estándar para TMV y TBSV

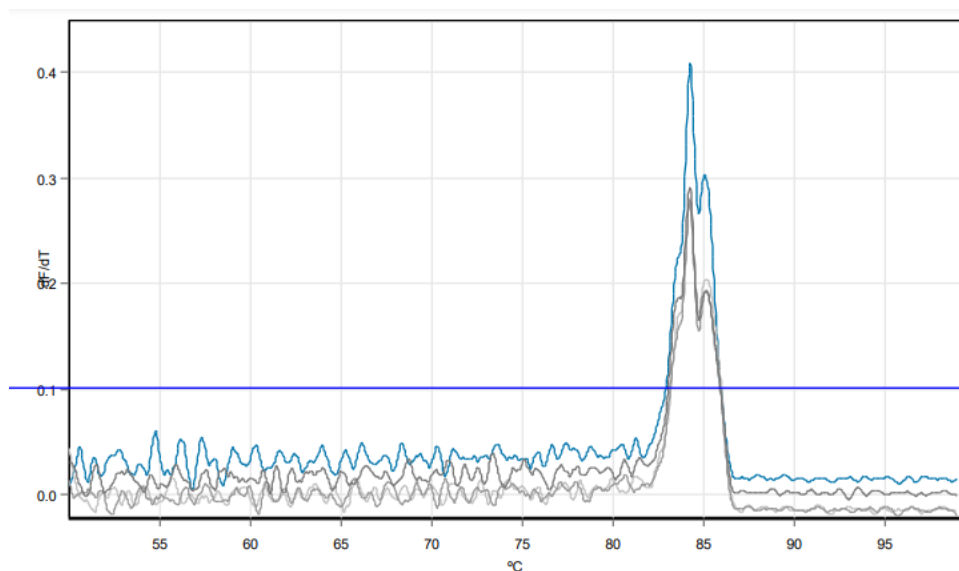


Nota. Obtenido de Rotor-Gene Q 2.1.0.9 - Windows platform por © QIAGEN, 2023

Se presenta la gráfica de Tm para PVY, en la cual se observa que los picos no están claramente definidos. Esto genera resultados no concluyentes sobre la presencia o ausencia del virus en la muestra, ya que los datos no concuerdan con los obtenidos mediante secuenciación. Por ejemplo, utilizando la q-PCR, las muestras amplificadas con los cebadores Two Steps y Flap presentaron valores negativos, mientras que estas mismas muestras fueron catalogadas como positivas después de la secuenciación. De manera similar, ocurre con los cebadores de literatura, los cuales resultaron negativos en la secuenciación, pero positivos en la q-PCR.

Figura 36

Curvas de Tm generadas por las muestras de PVY

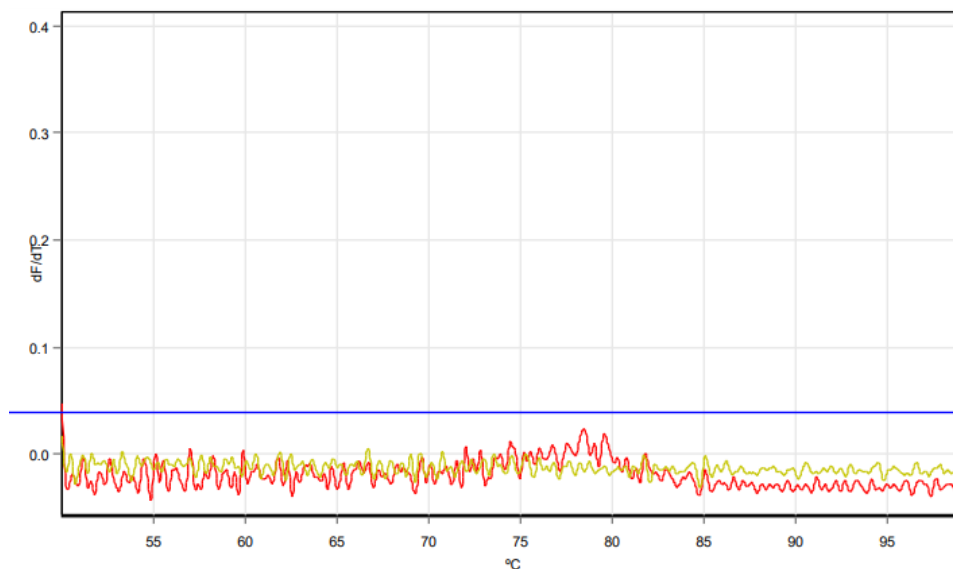


Nota. Obtenido de Rotor-Gene Q 2.1.0.9 - Windows platform por © QIAGEN, 2023

El control negativo para PVY y TBSV no existe una buena definición en la temperatura de Melting y sin una buena concordancia entre Ct y Tm no se puede concluir que el diagnóstico es positivo.

Figura 37

Curvas de Tm generadas por los controles negativos de los virus



Nota. Obtenido de *Rotor-Gene Q 2.1.0.9 - Windows platform* por © QIAGEN, 2023

Para descartar la presencia de falsos negativos y falsos positivos, se enviaron a secuenciación mediante Sanger los productos de q-PCR de las muestras que expusieron alguna irregularidad en los datos de Ct y Tm. Del mismo modo, se seleccionó al azar a una muestra de TMV, TBSV y un CN para corroborar el diagnóstico como un verdadero positivo y un verdadero negativo. Los *primers* utilizados se presentan en la **Tabla 14** y se obtuvo las secuencias que muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23

Resultados obtenidos de secuenciación con Sanger

Muestra	Primer	Secuencia	N de Acceso	Nombre científico	% de identidad
PVY (Literatura)	PVY-F	TGGGCTAATTGCAATGTGCATGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCC AATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATG ATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGATCCGCCCATG	No se encontró una similitud significativa		
	PVY-R	TGGGGGTGAACTACCCTCGTAACATTTCGGGCGGAGCATCACGCCTA GATGGAAGCACCCAGCACGAATCGGCGGGTGGACGAATCGGAAGC AAAAATGTCAGCTTAAATAACATCAACATTGGTGAATATCCAATGCC CCCAAACCTATGGGTTCTCCGCAAGGTTTCATCCATTGAGGGTGAT TCAGCCTCGAAACAGGGG	XM_048577	<i>Pyrus x</i>	82.14
PVY (Two Steps)	PVY-F	AATTTGTCTAGTCGGGACAACTTTCAGGAGAAATATGCATCTTCAA TTATCACAGAAA	MF622201.1	Potato virus Y	100
	PVY-R	GGATTGCCAGTAGTGAGTACCGCTGATGGATGTCTGGTTGGAATAC ATAGTTTGGCAAATAATGCGCAGACCACGAAC	MT200665.1	Potato virus Y	100
PVY (FLAP)	PVY-F	ATGTGCCAGGTAGCACTTTTTGGAAGCACTGGATTGAGACGGACGA TGGGCATTGTGGATTGCC	EU563512.1	Potato virus Y	100
	PVY-R	CGAGCTCCAACACAGAATGAAAGAATTTGTCTAGTCGGGACAACT TTCAGGAGAAATATGCATCTTCAATTATCACAGAACTAGCACTACT T	EU563512.1	Potato virus Y	100
	TBSV-F	GAGGACGCATCTTACAATCGGAGCTCTTCGAGAGCTCTTCTGGTTT GGTTTGA	No se encontró una similitud significativa		

Muestra	Primer	Secuencia	N de Accesoión	Nombre científico	% de identidad
CN_{TBSV}	TBSV-R	TCTTACAATCGCAGCTCTTTCAAGAGCTCTTCTG	No se encontró una similitud significativa		
(Two Steps)					
CN_{TBSV}	TBSV-F	CCCTGAAAAAGGTCCGAATTGGTAGAGGACTTCTCTGATCTTTCTG CTCTTTTCGAGAGCTTCTCTGCTCCTTATGGCCCCGA	No se encontró una similitud significativa		
(Literatura)					
	TBSV-R	CAATCCCCGGTACGATTTGATCAGATGGAACCGGCTTTACAATCT CAGCTCTTTCTAGAGCTTCTCTGCTCCGGTTGGCCCCTGA	No se encontró una similitud significativa		
CN_{PVY}	PVY-F	TGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAA TGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGAT TTGCCAATGTG	No se encontró una similitud significativa		
(Literatura)					
	PVY-R	CAAGGGGGATTTTGTAGTTGGTAGGAGGATCTGGATCTTACAATCG GAGCTCTT	No se encontró una similitud significativa		
TMV	TMV-F	GCGGGTCGGTCGTCCATCTAGCAGAGAGCGCCGAGCTCTTACAATC GGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCTA	HE818454.1	Tobacco mosaic virus	100
(Two Steps)					
TBSV	TBSV-F	CAAATATTCGTAAATGTTGCATGGGTTTCTGTCATCTACAGCGGTGC GAAACTCCGTACTTACACACGAGCCGTGGAGAGTCTGCATATCACAC CTGTCTCCGAGAGGGATAGTCACTTGACTACCTTCGTA AAAAGCAGA GAAGATATCGACGTCTAAGGGTGACCCAGCACCTCGGGTGATT CAG CCTCGAAACA	NC_001554.1	Tomato bushy stunt virus	99.43
(Literatura)					
CN_{PVY}	PVY-F	TGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAA TGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGATTTGCCAATGTGCCATGAT TTGCCAATGTG	No se encontró una similitud significativa		
(Flap)					

Nota. Con las secuencias dadas no se pudo generar una secuencia consenso por lo que se analizaron de forma independiente

Tabla 24*Organismos detectados con Minlon y q-PCR*

Variable	Especie	Secuenciación			q-PCR			
		Experimental	encontrada	T.S	Flap	Literatura	T.S	Flap
TMV	TMV	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
TBSV	TBSV	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Tomate	Negativo	Negativo	Positivo	SD	SD	SD	
PVY	PVY	Positivo	Positivo	Negativo	F-N	F-N	F-P	
V3	TMV	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
	TBSV	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
	PVY	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
CN	TMV	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
	TBSV	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	F-P	
	PVY	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	F-P	
	Tomate	Positivo	Positivo	Positivo	SD	SD	SD	

Nota. SD: Sin datos; F-N: Falso Negativo; F-P: Falso Positivo; TS: *Two Steps*

Capítulo V: Discusión

Utilizando la técnica de secuenciación de alto rendimiento TASPERT como método de diagnóstico para virus que afectan a *Solanum lycopersicum* L ha demostrado un incremento en la cantidad de lecturas por genoma viral y, consecuentemente, una mayor profundidad de secuenciación. Esto, beneficia fundamentalmente en la identificación y cuantificación precisa de las secuencias virales incluso en muestras con niveles bajos de infección viral. Además, TASPERT facilita la detección de variantes o mutaciones dentro de una especie, lo que permite el desarrollo y la promoción de prácticas de manejo adecuadas. Por otra parte, la secuenciación profunda que permite TASPERT no solo impacta positivamente en el diagnóstico, sino que también brinda la oportunidad de estudiar la evolución de los virus a lo largo del tiempo y rastrear los cambios en su genoma. Esta capacidad resulta especialmente útil para el seguimiento de brotes virales, la evaluación de su posible impacto en la patogenicidad y la epidemiología, así como para el diseño de estrategias de control más efectivas.

En *Solanum lycopersicum* L la infección viral es evidente cuando por observación se pueden detectar síntomas, de mosaico, atrofia o necrosis. Estos síntomas pueden ser generados por virus como ToTV (Tomato Torrado Virus), PMV (Pepino Mosaic Virus) el virus del mosaico del pepino, TMV (Tobacco Mosaic Virus), TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus), ToMarV (tomato wilt virus), entre otros 50 tipos de virus diferentes (Rodríguez et al., 2013).

Para Abdelkhalek, (2019) la semejanza entre síntomas observada en una misma especie infectada por diferentes tipos de virus se puede explicar a nivel bioquímico pues la replicación viral causa cambios en la estructura de los cloroplastos, orgánulos responsables de la fotosíntesis, lo que deriva en disminución en la producción de energía y en la síntesis de compuestos esenciales para el desarrollo de la planta. Además, la utilización de la maquinaria genética de las células vegetales por parte de los virus puede generar una mala regulación de los genes involucrados en vías metabólicas específicas y en la producción de fitohormonas. Es importante tener en cuenta la respuesta defensiva

del huésped frente a la infección. Según lo explicado por Florido et al., (2007) las plantas, en respuesta a la infección, inducen la producción de moléculas de señalización que pueden llevar a la apoptosis celular, lo cual se manifiesta como necrosis en los tejidos. Por lo tanto, los síntomas observados pueden indicar la presencia de una infección, aunque no se puede determinar con certeza la especie viral involucrada.

Incluso, es posible que los síntomas de deficiencia nutricional en las plantas puedan ser confundidos con los síntomas de una infección viral. Esto se debe a que tanto las deficiencias nutricionales como las infecciones virales provocan cambios visibles en el aspecto y el desarrollo de las plantas (Bernal, 2010).

Los parámetros mínimos recomendados por Oxford Nanopore Technologies (ONT) (2022) para la preparación de librerías con el kit *Direct cDNA Native Barcoding SQK-DCS109* son la calidad y pureza de la muestra inicial, dado que una muestra contaminada puede repercutir significativamente en los procesos posteriores y la concentración de masa y molaridad de la muestra de entrada a la *flowcell* porque el ingreso de una cantidad mayor o inferior al recomendado puede saturar o inactivar los poros. Con respecto a la calidad de ARN extraído se espera a que la concentración sea mayor que 20 ng/μl con un 260/280 ~ 2.0 para evitar la presencia de ADN o proteínas y un 260/230 ~ 2.2 como indicador de la presencia de contaminantes.

Para determinar la concentración de ácidos nucleicos, se utilizó la tecnología de fluorimetría del Promega Quantus™ Fluorometer, que emplea un reactivo fluorescente específico para los ácidos nucleicos presentes en la muestra, lo cual permite una medición más sensible y específica que los equipos de espectrofotometría, incluso en concentraciones bajas (© Promega, 2019). Aunque ONT sugiere concentraciones mayores a 20 ng/μl, para esta investigación se estableció una concentración mínima de 70 ng/μl con el fin de aumentar la probabilidad de detectar material genómico del virus, dado que el genoma del hospedador es claramente más abundante.

La evaluación de la pureza de las muestras se llevó a cabo mediante los ratios 260/280 y 260/230, según lo recomendado por el protocolo de ONT. Para ello, se utilizó espectrofotometría con el NanoDrop 2000 de Thermo Scientific, que calcula la absorbancia en esas longitudes de onda, proporciona una estimación aproximada de los ratios y genera una curva. Esto permitió una evaluación instantánea de la calidad de la extracción de ARN (© Thermo Scientific, 2009). Aquellas muestras que generaron curvas irregulares y mostraron ratios significativamente más bajas fueron descartadas para el análisis del RIN *number*.

La integridad del ARN no es un parámetro estrictamente definido en los protocolos de ONT puesto que, en teoría, MinION puede funcionar con ARN de baja calidad y secuenciar cualquier muestra sin importar su estado de integridad, no obstante, Schroeder et al., (2006) explica que un ARN de alta calidad y alta integridad generalmente produce resultados más confiables y reproducibles por el contrario un ARN de baja calidad o degradado puede resultar en lecturas menos precisas y en una menor capacidad para obtener una cobertura completa del genoma. Hay que mencionar además que la integridad del ARN juega un papel fundamental en el protocolo de TASPERT pues los *primers* de TASPERT están diseñados en el extremo 3' del genoma viral y depende completamente de su integridad para lograr la síntesis de ADNc del genoma completo (Espíndola et al., 2021).

Aunque es importante tener en cuenta la integridad del ARN, el RIN *number* es solo una medida de la calidad del ARN y otras características, como la concentración y la presencia de contaminantes, también son parámetros que hay que poner en consideración en la preparación de librerías (Schroeder et al., 2006). Es por ello que se tomó las muestras que lograron obtener los mejores valores en todos los criterios de selección para la síntesis de ADNc.

Para el proceso de síntesis de ADNc TASPERT usa *primers* diseñados específicamente para el genoma de los patógenos virales de interés, enzimas de transcriptasa inversa (RT) y oligómeros de iniciación específicos (TSO). La tecnología que usa dichos reactivos se denomina SMART (*switching*

mechanism at the 5' end of the RNA transcript) que es un mecanismo de conmutación en el extremo 5' de la transcripción de ARN y ha demostrado que puede generar ADNc de longitud completa y el ADNc resultante es una copia que conserva la secuencia de nucleótidos del ARN original (© Integrated DNA Technologies, 2023; Zhu et al., 2001). TASPERT utiliza esta característica para amplificar y detectar genomas interés.

Al utilizar esta forma de síntesis de ADNc se genera una doble cadena a partir de todos los fragmentos presentes en la muestra dando como resultado ADNc de diferentes tamaños, esto no representó ningún limitante en la preparación de librerías ni al momento de ordenar y clasificar las secuencias obtenidas mediante procesos bioinformáticos, sin embargo, se presentaron inconvenientes cuando se intentó comparar los productos de TASPERT con los productos obtenidos en una PCR Multiplex mediante electroforesis generando manchas en vez de bandas definidas lo que eliminó la posibilidad de realizar una comparación cualitativa entre técnicas. En un principio se pensó que el estado parcialmente degradado de las muestras de ARN pudo generar el *smear* observado en el gel, no obstante, los resultados de secuenciación demostraron que se logró un buen porcentaje de cobertura en todos los virus y que el material genético tuvo la calidad suficiente para los procesos de secuenciación con ONT. Hoy por hoy se sabe que TASPERT si puede ser comparada con una PCR de punto final si es que se somete al producto de TASPERT a una amplificación de un fragmento específico de su ADNc con primers *forward* y *reverse*.

En la publicación realizada por Espíndola et al., (2021) se enfocaron en el desarrollo y estandarización de la técnica de TASPERT en la cual se utilizaron varios métodos de síntesis de ADNc (oligodT, 6-mer aleatorio, 20-mer) y se demostró que el protocolo TASPERT superó a otros protocolos en términos de abundancia de lectura de patógenos en el metagenoma hasta 20 veces, esta abundancia relativa aumenta la sensibilidad de la técnica y por ende utiliza una menor cantidad de recursos de secuenciación. No obstante, oligodT tuvo una mayor cobertura del genoma que TASPERT y en esta

investigación se pretendió mejorar el porcentaje de cobertura obtenido con TASPERT probando y diseñando diferentes tipos de *primers* y controlando la integridad del ARN. Para este último criterio se seleccionaron muestras con números de RIN mayores a 6.

Por otro lado, el diseño de los *primers* expuso la necesidad no solo de obtener una secuencia consenso de todas las variantes presentes en los repositorios de datos sino también se debe considerar los aspectos estructurales de cada virus debido a que se observó una considerable variación en la cantidad de lecturas obtenidas para un mismo virus con cada diseño de *primer* para un mismo virus. El ejemplo más destacado es donde el diseño Flap obtuvo 1802 lecturas, Two Steps solo logró 568 y no se obtuvieron lecturas con los cebadores de literatura para PVY. Es importante destacar que se logró mejorar la cobertura obtenida en la investigación previa realizada por Espíndola et al., (2021) alcanzando el 100% de cobertura para todos los virus. Sin embargo, no se puede determinar con certeza si el diseño de los cebadores desempeñó un papel importante, ya que, como se mencionó anteriormente, TASPERT está diseñado para que los cebadores se dirijan desde el extremo 3' hacia el extremo 5' del genoma viral, lo cual solo se logra con ARN de buena integridad.

Es posible que diseñar *primers* que abarquen diferentes secciones del genoma ayude a mejorar los porcentajes de cobertura cuando se trabajan con muestras que presentan un valor de número de RIN por debajo de 6. Esta consideración puede ser relevante para futuras investigaciones, ya que a menudo resulta difícil optimizar los protocolos de extracción y se debe trabajar con muestras fragmentadas.

TASPERT también enfrenta otros desafíos como la pérdida de ARN en el proceso de purificación. Una vez obtenido el producto de amplificación, es necesario eliminar contaminantes como enzimas, nucleótidos no incorporados, dímeros y fragmentos cortos de ADN utilizando el kit de purificación AMPure XP que utiliza perlas magnéticas recubiertas con una solución de agente quelante y sal para eliminar elementos indeseados (Beckman Coulter, 2023). Existe el riesgo de perder material genético al

eliminar el sobrenadante o si se produce una demora en la adición del eluyente al tubo ya que esto forma parte del protocolo de preparación de las librerías con el kit Direct cDNA Native Barcoding SQK-DCS109. Para continuar con los pasos siguientes, es necesario eliminar consecutivamente los contaminantes del paso anterior, repitiendo el proceso tres veces antes de colocar la muestra en la membrana de nanoporos.

Aunque ONT ha trabajado constantemente mejorar y optimizar sus protocolos para reducir los pasos y minimizar el riesgo de pérdida de muestra, se debe tener en cuenta que el operador debe contar con experticia para la limpieza y preparación de librerías (Wei et al., 2018).

Se observó que a medida que aumentaba el tiempo de ejecución, la calidad de las lecturas disminuía. Peserico et al., (2019) explica que esta disminución tanto en el número como en la calidad de las lecturas es normal en la secuenciación con nanoporos y se debe a la saturación de la membrana, lo que dificulta el paso de las bases a través de los poros. Es importante destacar que para considerar una corrida como exitosa, después del procesamiento bioinformático, la cantidad de lecturas que cumplan con los parámetros establecidos no debe ser inferior a la cantidad de lecturas rechazadas (Oxford Nanopore Technologies, 2022). En esta investigación, más del 60% del total de *reads* fueron aprobados lo que indica que las librerías tuvieron buena calidad.

Cuando se hizo una comparación de los resultados de q-PCR entre los ADNc sintetizados con los diferentes tipos de *primers* diseñados para TASPERT y los ADNc sintetizados con *random primers*, se observó que los valores de Ct con TASPERT fueron 5 veces más bajos que los valores obtenidos con *random primers*. Además, la síntesis con *random primers* generó falsos positivos que fueron corroborados después mediante Sanger. Se sabe que el uso de SBYR GREEN como tinte fluorescente en PCR en tiempo real puede aumentar la probabilidad de tener falsos negativos debido a que une de manera inespecífica a cualquier ADN de doble cadena que esté presente en la muestra (Ibarra & Vesquillo, 2013). Todo esto explicaría los resultados obtenidos en la comparación entre técnicas. Se

concluye que mediante la síntesis de ADNc con TASPERT la detección de patógenos es estadísticamente más sensible y específica que con las técnicas tradicionales.

La secuenciación con MinIon está siendo utilizada en áreas de diagnóstico humano, animal y vegetal (Espíndola et al., 2021; Peserico et al., 2019; Xu et al., 2021) y se espera que en los próximos años se genere una cantidad robusta de información que permita comparar entre metagenomas y esto ayude a elucidar el comportamiento de los patógenos en diferentes ambientes.

Capítulo VI: Conclusiones

Minlon de ONT no exige parámetros de calidad elevados pues permite secuenciar muestras con parámetros de concentración y pureza estándar, es decir, ratios de 260/280 y 260/230 aproximados a dos y concentraciones superiores a 20 ng/μl para que los resultados sean confiables y reproducibles. además, se demostró que utilizar muestras con valores superiores a 6 en RIN *number* hace que el protocolo utilizado para síntesis de ADNc con TASPERT logre sintetizar todo el genoma del patógeno de interés.

TASPERT detectó de manera eficaz a los tres virus de interés, PVY, TMV y TBSV, con más de un 95% de cobertura de su genoma y permitió reducir la cantidad de *reads* mapeados para el hospedador, *Solanum lycopersicum* L, además, la profundidad de secuenciación que otorga TASPERT como técnica de diagnóstico ayudó a mejorar la capacidad de detección a comparación de las técnicas tradicionales, como PCR Multiplex o q-PCR, porque están limitadas a la amplificación parcial del genoma, usualmente regiones conservadas, esto reduce ampliamente las posibilidades de identificar cepas específicas y las adaptaciones genéticas del virus a diferentes entornos o especies huésped.

Los productos obtenidos con TASPERT no pudieron ser comparados mediante PCR Multiplex, sin embargo, en q-PCR alcanzó el límite establecido, *threshold*, en los ciclos 6, 21 y 5 Para TMV, PVY y TBSV respectivamente, superado incluso, en algunos casos, el punto de referencia establecido por el control positivo y se redujo la probabilidad de obtener falsos negativos, lo que implica que TASPERT tiene una sensibilidad y especificidad estadísticamente significativa comparado con las técnicas tradicionales.

Capítulo VII: Recomendaciones

El autoclavar la tierra destinada a la siembra reduce las posibilidades de infección por otros microorganismos ajenos a la investigación, además el riego por absorción es un método excelente para humedecer la totalidad de la superficie de la maceta, sin embargo, la misma distribución del agua a lo largo de los contenedores puede ser una fuente de contaminación para las plantas que se encuentren en el sitio por lo que es preferible realizar un riego por aspersión.

Es importante asegurarse que las plantas tengan una buena infección antes de realizar pruebas de los métodos de diagnóstico pues el objetivo principal es determinar la validez, especificidad y la sensibilidad del método por lo que es necesario verificar el contagio mediante síntomas fuertes y de ser necesario, se recomienda realizar una segunda infección, hasta lograr la infección deseada.

Un criterio para descartar muestras en esta investigación fue la ausencia de síntomas en las hojas, no obstante, se han reportado casos de plantas que mediante ELISA dieron positivo a un patógeno específico, pero no presentaron síntomas evidentes por lo que se recomienda tomar en cuenta esta variable para verificar datos en investigaciones futuras.

Para seleccionar el mejor método de extracción de ARN es recomendable probar kits que tengan protocolos y/o reactivos diferentes, esto con el fin de verificar qué kit es el más amigable para los objetivos de la investigación, no está demás aclarar que es necesario revisar previamente la composición estructural de la muestra que va ser tratada pues algunos buffers pueden tener reacciones adversas en contacto con ciertos componentes de la muestra.

Se recomienda realizar un análisis más profundo sobre qué diseño de *primer* es mejor para cada tipo estructural de virus, teniendo en cuenta si posee o no colas de Poli-A, el sentido de su cadena, el tamaño del genoma o si es viable o no la eliminación del *Flap*. También se propone la combinación de *primers Flap* para el primer paso de TASPRT y después otro *primer* sin *Flap* en el último paso para enriquecer aún más las muestras.

Los *primers* tienen un papel fundamental para el éxito de esta técnica por lo que se plantea las siguientes recomendaciones 1) El IBMF posee una herramienta llamada Microbe Finder (MiFi) desarrollada en Oklahoma State University, el cual permite identificar las regiones únicas de un genoma. Se podría usar MiFi para la creación de *primers* con una especificidad alta. 2) La cobertura del genoma completo de un patógeno mediante la adición de diferentes *primers* al mismo objetivo podría minimizar la probabilidad de obtener falsos negativos en la técnica de TASPERT. 3) Es necesario revisar la relación entre la temperatura y el *Flap* añadido en los *primers* para el proceso de alineamiento en TASPERT para descartar posibles mal alineamientos entre secuencias.

Capítulo VIII: Bibliografía

- © Anaconda. (2023). *Nanoplot* (1.32.1). <https://github.com/wdecoster/NanoPlot>
- © Bio-Rad Laboratories. (2023). *Image Lab* (SOFT-LIT-170-9690-ILSPC-V-6-1).
- © Integrated DNA Technologies. (2023). *Use of Template Switch Oligos (TS Oligos, TSO) for Efficient Construction of cDNA Libraries*. [https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/use-of-template-switching-oligos-\(ts-oligos-tsos\)-for-efficient-cdna-library-construction](https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/use-of-template-switching-oligos-(ts-oligos-tsos)-for-efficient-cdna-library-construction)
- © Promega. (2019). *QuantiFluor® RNA System Product Instructions for Use E3310*.
www.promega.com/protocols
- © Promega. (2023). *QuantiFluor® ONE dsDNA System Product Instructions for Use E4871, E4870 and E4891*. www.promega.com
- © QIAGEN. (2023a). *RNeasy Plant Mini Kit*.
- © QIAGEN. (2023b). *Rotor-Gene Q 2.1.0.9 - Windows platforms - (EN)*.
<https://www.qiagen.com/kr/resources/resourcedetail?id=8435805b-2c5d-4fa9-948c-a43de75a7ee1&lang=en>
- © R-Tools Technology. (2023). *R-STUDIO* (9.2 build 191153). <https://www.r-studio.com/data-recovery-software/>
- © Thermo Scientific. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. *Thermo Scientific Inc*, 97.
- Abdelkhalek, A. (2019). Expression of tomato pathogenesis related genes in response to Tobacco mosaic virus. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 29(6), 1596–1602.
<https://web.p.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=0e034622-3528-4d6b-b2ed-d65c8874cc4d%40redis>
- Alemu, K. (2015). *Detection of Diseases , Identification and Diversity of Viruses : A Review*. 5(1), 204–214.
- Antury, B., & Quimbaya, E. (2016). *Next generation sequencing and its eugenic context in the human*

embryo. 20, 2005–2203. <https://doi.org/10.5294/PEBI.2016.20.2.7>

APHIS, U. (2020). Potato Virus Y Strains. *Federal Regulatory Guide*.

<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/nematode/potato/pvy>

Ardila, G., Fischer, G., & Balaguera, H. E. (2011). Caracterización del crecimiento del fruto y producción de tres híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en tiempo fisiológico bajo invernadero.

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS, 5(1), 44–56.

https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_horticolas/article/view/1252/1248

Atkinson, P. H., & Matthews, R. E. F. (1970). On the origin of dark green tissue in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40(2), 344–356. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90411-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90411-3)

Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2013). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106–136.

<https://doi.org/10.3390/v6010106>

Beckman Coulter. (2023). *AMPure XP Reagent for PCR Purification*.

<https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr>

Bernal, R. (2010). *Enfermedades de tomate (Lycopersicum esculentum Mill.) en invernaderos en las zonas de Salto y Bella Unión (Unidad de)*.

Bloomer, A. C., Champness, J. N., Bricogne, G., Staden, R., & Klug, A. (1978). Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 resolution showing the interactions within and between subunits. In *Nature* (Vol. 276, Issue 5686, pp. 362–368). <https://doi.org/10.1038/276362a0>

Broadbent, L. (2010). Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Universidad Estatal de Oklahoma*, 75–96.

- Dionel, F. (2010). Manejo de los virus necróticos de los tubérculos de la papa Virus Y de la Papa (PVY) – Biología. *College of Agricultor and Life Sciences*. <https://blogs.cornell.edu/potatovirus/>
- Dovas, C., & Katis, N. (2002). Multiplex Detection of Criniviruses Associated with Epidemics of a Yellowing Disease of Tomato in Greece. *The American Phytopathological Society*. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2002.86.12.1345>
- Espíndola, A. S., Sempertegui-Bayas, D., Bravo-Padilla, D. F., Freire-Zapata, V., Ochoa-Corona, F., & Cardwell, K. F. (2021). TASPERT: Target-Specific Reverse Transcript Pools to Improve HTS Plant Virus Diagnostics. *Viruses*, *13*(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/v13071223>
- FIA. (2018). Diagnóstico y Prevención de Enfermedades en el Tomate Primor. *Fundación Para La Innovación Agraria*, *82*, 5.
- Florido, M., Arencibia, A., Plana, D., Alvarez, M., López, J., & Lara, R. M. (2007). Análisis de la diversidad genética de tomate (*Solanum L. SECCIÓN Lycopersicon SUBSECCIÓN Lycopersicon*). *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Cuba*. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215844013.pdf>
- Freepik. (2023). *Crecimiento de la planta de fresa*. https://www.freepik.es/vector-premium/diagrama-ciclo-vida-planta-fresa_38539233.htm
- Fronk, W. (1965). *Plant Diseases Division*. 350–353.
- Fulton, R. W. (1986). Practices and Precautions in the Use of Cross Protection for the Control of Virus Diseases of Plants. *Annual Review of Phytopathology*, *24*(1), 67–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.000435>
- Gergerich, R. C., Dolja, V. V., & Talitas, L. (2008). *Introduccion a los Virus Vegetales , el Enemigo Invisible* . <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0122-01>
- Gergerich, R., & Dolja, V. (2006). *Fitopatología*. *Introduccion a Los Virus Vegetales, El Enemigo Invisible*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0122-01>

- González, R. (2018). *Características de patógenos virales*. Manejo General Para El Tomato Brown Rugose Fruit Virus. [http://sinavef.senasica.gob.mx/Eventos/Content/Multimedia/Manejo general para el ToBRFV 2da Ponencia.pdf](http://sinavef.senasica.gob.mx/Eventos/Content/Multimedia/Manejo%20general%20para%20el%20ToBRFV%202da%20Ponencia.pdf)
- Goodsell, D. (2013). *Revealing structural views of biology*.
https://www.researchgate.net/figure/Tomato-Bushy-Stunt-Virus-PDB-ID-2tbv31-The-structure-of-TBSV-revealed-the-molecular_fig5_244992702
- Hidroponía Rosario. (2015). *Enfermedades y plagas*. Enfermedades, Plagas y Síntomas.
<https://hidroponiarosario.com/enfermedades-y-plagas/>
- Ibáñez Oliver, A. M. (2021). *Desarrollo de un Pipeline de trabajo para secuenciación dirigida por CRISPR-CAS9*.
- Ibarra, C., & Vesquillo, C. (2013). de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad, 2*.
- INFOAGRO SYSTEMS, S. . (2022). *Infoagro.com*. El Cultivo Del Tomate (Parte I).
https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate__parte_i_.asp#menuHeaderSectores
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology, 1*–11.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Jeong, J., Ju, H., & Noh, J. (2014). *A review of detection methods for plant viruses*. 20(3), 173–181.
- Jones, J., Stall, J., & Zitter, T. (2001). Tomato pests and diseases. *The American Phytopathological Society*.
- Kežar, A., Kavčič, L., Polák, M., Nováček, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Žnidarič, M. T., Coll, A., Stare, K., Gruden, K., Ravnikar, M., Pahovnik, D., Žagar, E., Merzel, F., Anderluh, G., & Podobnik, M. (2019).

- Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein. *Science Advances*, 5(7), 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw3808>
- Labster Theroy. (2023). *Cuantificación del ácido nucléico*. Cuantificación Del Ácido Nucleico. <https://theory.labster.com/rna-quantification-es/>
- Lister, R. (1966). Relaciones funcionales entre productos virales específicos de la infección por virus del tipo sonajero del tabaco. *Instituto Escocés de Investigación Hortícola, Invergowrie*, 3, 43–58.
- Liu, C., & Nelson, R. S. (2013). The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Frontiers in Plant Science*, 4(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00012>
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(5), 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
- Maitra, R. D., Kim, J., & Dunbar, W. B. (2012). Recent advances in nanopore sequencing. *Electrophoresis*, 33(23), 3418–3428. <https://doi.org/10.1002/elps.201200272>
- Maree, H. J., Fox, A., Rwahnih, M. Al, & Boonham, N. (2018). *Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges*. 9(August), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01082>
- Martelli, Russo, & Gallitell. (1989). Descripciones de virus de plantas. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- McCartney, A. W., Greenwood, J. S., Fabian, M. R., White, K. A., & Mullen, R. T. (2005). Localization of the Tomato Bushy Stunt Virus Replication Protein p33 Reveals a Peroxisome-to-Endoplasmic Reticulum Sorting Pathway. *Plant Cell*, 17(12), 3513–3531. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036350>
- Mellado, O. (2020). *Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas*. <https://orcid.org/0000-0002-5408-6263>
- Mikheyev, A. S., & Tin, M. M. Y. (2014). Un primer vistazo al secuenciador Oxford Nanopore MinION.

- Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1097–1102. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12324>
- Monardes, H. (2009). *Manual de cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill): Características botánicas*. http://www.cepoc.uchile.cl/pdf/Manua_Cultivo_tomate.pdf
- Morocho, M. (2003). El cultivo de tomate riñón en invernadero (*Lycopersicon esculentum*) Cultivo de tomate riñón en invernadero. *Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (AAIC)*. https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com/&httpsredir=1&article=1366&context=abya_yala
- Murphy, J., & Zehnder, G. (2000). Plant Growth-Promoting Rhizobacterial Mediated Protection in Tomato Against Tomato mottle virus. *Departamento de Entomología y Patología Vegetal, July*, 779–784. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS.2000.84.7.779>
- Namba, K., & Stubbs, G. (1986). Estructura del virus del mosaico del tabaco con una resolución de 3,6 Å: implicaciones para el ensamblaje. *Science*, 231(4744), 1401–1406. <https://doi.org/10.1126/science.3952490>
- Nawaz, H. H., Umer, M., Bano, S., & Usmani, A. (2014). *Una revisión de la investigación sobre el complejo de enfermedades TBSV*. 4(5), 1985–1990.
- Ochoa-Corona, F., Washburn, B., Miller, S., & Riddle, C. (2017). *Direct capture of RRV on plastic and lyophilization of infected tissues/positive controls*. 8–9.
- Okada, Y. (2000). Tobacco Mosaic Virus: Pioneering Research for a Century One. *The Plant Cell*, 45(10), 1757–1765. <https://doi.org/10.2307/3870861>
- Onozuka, N., Ohki, T., Oka, N., & Maoka, T. (2021). One-step real-time multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay with melt curve analysis for detection of potato leafroll virus, potato virus S, potato virus X, and potato virus Y. *Revista de Virología*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01591-3>

- Ouchterlony, O. (1962). Métodos de difusión en gel para análisis inmunológico. *Department of Bacteriology*, 6, 30–154.
- Owens, R. A., & Diener, T. O. (1979). Spot Hibridación para Detección de Viroides y Virus. In *METHODS IN VIROLOGY* (Vol. 7). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-470207-3.50012-7>
- Oxford Nanopore Technologies. (2022). *Real-time, on-demand sequencing in the palm of your hand*. <https://nanoporetech.com/sites/default/files/s3/literature/MinION-Mk1C-brochure.pdf>
- Park, J., Scholthof, H. B., Al, P. E. T., & Irol, J. V. (2002). *La acumulación de ARN genómico del virus del acrobacia tupida del tomate está regulada por elementos interdependientes que actúan en cis dentro de los marcos de lectura abiertos de la proteína de movimiento*. 76(24), 12747–12757. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12747>
- Pedrosa, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2).
- Peserico, A., Marcacci, M., Malatesta, D., Di Domenico, M., Pratelli, A., Mangone, I., D'Alterio, N., Pizzurro, F., Cirone, F., Zaccaria, G., Cammà, C., & Lorusso, A. (2019). Diagnosis and characterization of canine distemper virus through sequencing by MinION nanopore technology. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37497-4>
- Quenouille, J., Vassilakos, N., & Moury, B. (2013). Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Patología Molecular de Plantas*, 14(5), 439–452. <https://doi.org/10.1111/mpp.12024>
- Rodríguez, G., Pereira de casta, J., Pratta, G., & Zorzoli, R. (2013). Recursos Genéticos y Genómicos para Mejorar la Calidad del Fruto en Tomate. *CONICET. CIUNR*, 30–36. <http://blog.fcagr.unr.edu.ar/new/wp-content/uploads/2014/09/6AM35.pdf>
- Rosa, E. (2007). Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate. *Estación Experimental Agrícola*, 1–20.

- Rubio, S., Pachecho, R., Gómez, A., & Perdomo, S. (2020). *DNA Next-Generation Sequencing (NGS): Present and Future in Clinical Practice. 2.*
<https://doi.org/https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs>
- Salas, A., Hernández, E., & Espinoza, C. (2022). Principales enfermedades del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de campo. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(1), 4190–4210. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i1.1793
- Salazar, A., Ochoa-Corona, F. M., Olson, J. D., Babu, B., & Paret, M. (2021). Amplificación isotérmica mediada por bucle de sondeo (LAMP) dirigida a dos fragmentos de genes del virus de la roseta de la rosa. *PLoS ONE*, 16(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256510>
- Salazar, L. F. (1990). *Metodología Para La Detección De Virus De Papa : Pasado , Presente Y Futuro.* 1–12.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Scott, A. J. (1969). TMBV Virus. *Canadian Journal of Plant Science*.
- Stange, C. (2014). *Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso.* March.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5).
- Viteri, M. L., & García, M. (2013). Tomate y Lechuga: Importancia Productiva y Comercial. *Estudios Socioeconómicos de Los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales*, 14, 12–23.
<https://doi.org/ISSN 1852-4605>
- Walkey, D. G. A. (1967). *Effects of ultrasonic treatment of potato on turnip virus mosaic virus.* 278, 267–278.

- Wei, S., Weiss, Z. R., & Williams, Z. (2018). Rapid Multiplex Small DNA Sequencing on the MinION Nanopore Sequencing Platform. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(5), 1649–1657.
<https://doi.org/10.1534/g3.118.200087>
- Wu, Y. (2011). Establecimiento del sistema de regeneración y transformación de *Lycopersicon esculentum*. *Br Biotechnol J*, 53–60. www.sciencedomain.org/download.php?f=1311487212-Guo.pdf
- Xu, R., Adam, L., Chapados, J., Soliman, A., Daayf, F., & Id, T. T. (2021). *MinION Nanopore-based detection of Clavibacter nebraskensis, the corn Goss's wilt pathogen, and bacteriomic profiling of necrotic lesions of naturally-infected leaf samples*. 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245333>
- Zhao, L., Cheng, J., Hao, X., Tian, X., & Wu, Y. (2012). Rapid detection of tobacco viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Archivos de Virología*, 157(12), 2291–2298.
<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1441-5>
- Zhao, Y., & Madak, E. (2016). Biology of metabolic regulation systems by estrogen receptor signaling in breast cancer. *JOVE*. 10.3791/53832
- Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., Siebert, P. D., Laboratories, C., & Alto, P. (2001). Reverse Transcriptase Template Switching: A SMART™ Approach for Full-Length cDNA Library Construction. *Enfoque de La Aplicación Del Producto*, 892–897.

Capítulo IX: Apéndice