

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estandarización de un método de detección de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR) mediante de sondas TaqMan®.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Gustavo Andrés Gutiérrez González
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estandarización de un método de detección de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR) mediante de sondas TaqMan®.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Gustavo Andrés Gutiérrez González
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2021

Vo.Bo.:

(f) Patty Herrera
MSc. Patricia Herrera González

Tribunal Examinador:

(f) Patty Herrera
MSc. Patricia Herrera González

(f) Pamela Pennington
Dra. Pamela Pennington

(f) Dalia Nau Bonilla
Dra. Dalia Nau Bonilla

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre de 2021.

El presente trabajo de graduación es parte de un proyecto en conjunto con el Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA) de la Universidad del Valle de Guatemala, específicamente, con el Laboratorio de Protección Vegetal. Este trabajo tuvo un enfoque experimental utilizando técnicas de extracción de ARN y amplificación por medio de RT-qPCR. Esto permitió estandarizar un método de detección de un *Tobamovirus* en semillas de tomate y chile pimiento para el uso del Laboratorio de Protección Vegetal. Este trabajo me permitió familiarizarme a mayor profundidad con la técnica de diagnóstico así como los factores que pueden afectar su desempeño.

Le doy las gracias a mi asesora, Patty Herrera, por su disposición, comprensión e increíble asesoría durante todo el transcurso de este trabajo. Me gustaría dar las gracias asimismo a Nina Figueroa y a Lizbeth Coxaj quienes también me apoyaron a realizar este trabajo, tanto como en su ejecución como en su interpretación. También, debo agradecer a mi directora de carrera, la doctora Pamela Pennington, quien no solo me asesoró a mí sino que a todo mi año.

Por otro lado debo agradecer de gran manera a mi soporte en casa, mi familia, especialmente a mi madre y mi hermana. Estas dos personas me motivan, se preocupan por mí y quiero devolvérselos todo de alguna forma.

Prefacio	III
Lista de figuras	VI
Lista de cuadros	VII
Resumen	VIII
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Justificación	4
4. Marco teórico	6
4.1. Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)	6
4.1.1. Características generales	6
4.1.2. Genética y proteínas importantes	7
4.1.3. Distribución al año 2021	7
4.1.4. Mecanismo de transmisión	8
4.1.5. Hospederos conocidos	8
4.1.6. Síntomas y daños a la planta	9
4.2. Extracción de ARN	9
4.2.1. Métodos evaluados	10
4.2.2. Ventajas y desventajas según métodos	10
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción (RT-qPCR)	11
4.3.1. Principio	11
4.3.2. Métodos de optimización y validación	11
5. Metodología	13
5.1. Hipótesis	13
5.2. Variables	13
5.3. Materiales y métodos	14
5.3.1. Comparación de métodos de extracción	15
5.3.2. Cuantificación de ARN, determinación de pureza por espectrofotometría e integridad	17

5.3.3. Optimización de RT-qPCR	17
5.3.4. Aplicación de metodología optimizada	19
6. Resultados	20
6.1. Comparación de métodos de extracción de ARN en semillas	20
6.2. Pureza y concentración de ARN extraído por método CTAB	24
6.3. Concentración de componentes de RT-qPCR	25
6.4. Validación de pruebas individuales RT-qPCR	27
6.4.1. Validación prueba para la detección del marcador de la proteína de la cápside (CP)	27
6.4.2. Validación prueba para la detección del marcador de la proteína de movimiento (MP)	28
6.4.3. Validación prueba para la detección del control interno <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV)	29
6.4.4. Prueba RT-qPCR múltiple	30
7. Análisis de resultados	31
8. Conclusiones	33
9. Recomendaciones	34
10. Bibliografía	35
Referencias	35

Lista de figuras

1.	Partículas virales de ToBRFV aisladas de fruto y hojas de tomate.	6
2.	Distribución global del ToBRFV hasta el día 4 de noviembre de 2021.	8
3.	Síntomas causados por <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus</i> en <i>S. lycopersicum</i>	9
4.	Funcionamiento de una sonda TaqMan® durante una reacción de carácter cuantitativo	12
5.	Diagrama de flujo de la metodología empleada en esta investigación	14
6.	CTAB presenta mayor concentración de ARN de forma significativa acorde a la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon	21
7.	Método CTAB presenta diferencia significativa según prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon en terminos de pureza A260/A280	22
8.	Método de CTAB presenta mayor pureza A260/A230 de forma significativa acorde a la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon	23
9.	Integridad de ARN extraído por ambos métodos.	23
10.	Integridad de ARN extraído por CTAB de diferentes tamaños de grupos de semillas.	24
11.	Diferencia no significativa en parámetros de ARN según tipo de semillas utilizando método CTAB.	25
12.	Amplificación de producto no alterada por la concentración de Cebadores y sonda para marcador CP	26
13.	Curva de amplificación de concentraciones de prueba MP.	27
14.	Estandarización de la prueba para CP.	27
15.	Curva de amplificación de diluciones seriadas a partir de 2×10^{-7} hasta 2×10^{-12} ug de marcador CP	28
16.	Validación de prueba para la detección de MP.	28
17.	Validación de prueba de detección de SCMV.	29
18.	Amplificación de los tres marcadores en una misma reacción para la detección de ToBRFV y su control interno.	30

Lista de cuadros

1.	Definición de variables del estudio	13
2.	Cebadores y sondas utilizados para la detección de ToBRFV	18
3.	Prueba de normalidad Shapiro-Wilk de los parametros evaluados para extracción de ARN de semillas	20
4.	Similitud de valores Ct al alterar concentración de cebador y sonda de MP	26

El *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV por sus siglas en inglés), o el virus de la Fruta Rugosa Marrón del Tomate, es una amenaza relativamente nueva para los cultivos de tomate y chile pimiento a nivel mundial, principalmente, ya que no se ha reportado resistencia ante el mismo. Debido a su rápida diseminación por Europa y llegada al continente americano es necesario un método rápido de detección en productos comerciales para evitar la infección y consecuente pérdida total de los cultivos anteriormente mencionados a nivel nacional. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR) presenta una metodología viable para realizar un diagnóstico rápido de cualquier fuente vegetal del virus. La presente muestra una estandarización de la metodología para la detección del virus partiendo desde la comparación de dos métodos de extracción de ARN utilizando como muestra semillas de tomate y chile pimiento, y la optimización de condiciones de la RT-qPCR. Se estableció que el método de extracción de ARN con CTAB provee mejores resultados en términos de concentración y pureza. Se validaron los cebadores y sondas utilizados para detectar genes de la proteína de movimiento MP, cápside CP y un control interno de extracción de *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV por sus siglas en inglés).

La agricultura ha sido una de las actividades económicas más importantes en el mundo por su extensión y aporte monetario. Los cultivos se encuentran amenazados por diversidad de causas abióticas y bióticas. Entre las amenazas bióticas se encuentran infecciones, las cuales pueden ser causadas por bacterias, hongos o virus (Jones, 2021).

Cuando un cultivo se ve afectado por un patógeno, este presenta síntomas que afectan la calidad del producto, el crecimiento, rendimiento e incluso puede morir. Las infecciones virales pueden ocasionar la pérdida de cultivos completos ya que estas pueden transmitirse por diversas vías. Existen virus que son transmitidos por daño mecánico ocasionado a la planta durante su manejo, por semillas traspasando el virus a la plántula al germinar, por vectores como artrópodos que se alimentan de la planta, o bien, por polinizadores. El virus *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) es un virus de ARN que cumple con las características anteriormente mencionadas a excepción de la diseminación por artrópodos comensales (Kenyon, Kumar, Tsai, y Hughes, 2014; Salem, Mansour, Ciuffo, Falk, y Turina, 2016). Este virus pertenece al género de *Tobamovirus*, género perjudicial y de alta diseminación debido a su concentración en órganos reproductores de la planta como las semillas. Este género es uno de los más estudiados entre los virus fitopatológicos ya que el primer virus, *Tobacco Mosaic Virus*, descrito en plantas corresponde a este género. El comercio de semillas globalmente impulsa su rápida diseminación a nivel global (Jimenez-Lopez, 2017).

El virus ToBRFV fue reportado por primera vez en Jordania en el año 2016 en cultivos de tomate en invernaderos. Desde entonces se ha diseminado por Europa y ha llegado al continente americano. En América se ha reportado en Estados Unidos y México. Una de las razones por las que este virus ha sido de interés, además de su rápida dispersión, es la falta de resistencia ante él (Maayan y cols., 2018; Salem y cols., 2016). Una forma preventiva que se puede utilizar para evitar la diseminación es la detección temprana.

Uno de los métodos más rápidos para la detección de un virus es el uso de la técnica molecular: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Una variante de esta reacción es la combinación con la retrotranscripción, RT-qPCR. Ya que el virus posee un genoma compuesto por ARN, esta técnica es recomendable (Panno y cols., 2019).

Para que la técnica RT-qPCR detecte al virus es necesario optimizarla y estandarizarla a condiciones de cada laboratorio. Entre los aspectos a tomar en cuenta se debe tomar la extracción de ARN de la muestra ya que es el primer paso y se puede llevar a cabo con distintas metodologías. Entre los métodos comparados se encuentra el uso de la extracción con tampón de Bromuro de cetiltrimetila-

monio (CTAB por sus siglas en inglés) y el uso de un kit comercial basado en aislamiento por medio de columna de sílica. Esto da paso a la RT-qPCR y es crucial ya que se requiere de parámetros que el ARN debe cumplir para ser utilizado. Por otro lado, la RT-qPCR también tiene aspectos que pueden afectar el rendimiento de la detección. Entre estos aspectos se encuentran la cantidad de templado utilizado y las concentraciones de cada componente por lo que se alteraron estos parámetros uno a la vez para identificar las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción. Como muestra se utilizaron semillas y hojas de tomate y chile pimiento para comparar los métodos de extracción y un control positivo sintético para optimizar la RT-qPCR (Bio-Rad, s.f.; Poon, Othman, Mebus, y Teo, 2019; PROMEGA, 2018). En este trabajo se determinó el mejor método para la extracción de ARN, así como se validaron las reacciones de forma individual y múltiple de los marcadores CP, MP y del control interno SCMV.

2.1. Objetivo general

Establecer un protocolo de detección de *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* en Guatemala por medio de RT-qPCR múltiple con sondas TaqMan®.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar los métodos de extracción de ARN de tejido vegetal por CTAB (Locali y cols., 2003) y kit comercial SV Total RNA Isolation System®.
- Optimizar la mezcla y condiciones de reacción RT-qPCR para la detección del virus *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* según la ISHI-Veg (2019).
- Validar la eficiencia de la amplificación por RT-qPCR de forma individual y múltiple para los virus ToBRFV y *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) como control interno de extracción. .
- Determinar rangos de detección de la prueba RT-qPCR optimizada bajo condiciones del Laboratorio de Protección Vegetal – UVG.

Los cultivos infectados por enfermedades virales pueden desarrollar síntomas que afectan su tiempo de vida, valor comercial, crecimiento, rendimiento, o calidad. Los cultivos infectados así como las semillas infectadas no pueden ser comercializadas según acuerdos gubernamentales para evitar la entrada de un virus a cosechas nacionales (Klap, Luria, Smith, Bakelman, y cols., 2020). El *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), ha presentado una baja del rendimiento de hasta el 99%. Esto lleva pérdidas monetarias casi totales que escalan en cantidad de acuerdo al tamaño de la plantación (Oladokun, Halabi, Barua, y Nath, 2019).

El virus del ToBRFV fue descrito por primera vez en el Jordán 2016 (Salem y cols., 2016), diseminándose por Europa y ha llegado a América, más específicamente a California en Estados Unidos y Yucatán en México (Cambrón-Crisantos y cols., 2018; Oladokun y cols., 2019). Se cree, con base en análisis bioinformáticos, que el virus surgió de una recombinación durante un cambio de huésped. Los virus considerados como parentales son *Tobacco Mosaic virus* (TMV) y *Tomato Mosaic Virus* (ToMV) como el mayor y menor parental respectivamente. Con base en esto, se evaluaron los genes de resistencia al ToMV y TMV, sin embargo, no se encontró que estos fueran eficaces para conferir resistencia al ToBRFV.

Este virus se transmite por vía mecánica, sin embargo se ha encontrado que las semillas son fuente estable del virus. La transferencia a la planta germinada es baja siendo de 2.8% en dicotiledóneas y 1.8% en la tercera hoja verdadera. Una semilla infectada es una fuente continua de virus. La detección tiene importancia en la semilla por técnicas moleculares, como RT-PCR, qPCR, RT-qPCR ya que existen tratamientos químicos y térmicos que solo dejan inactivo al virus pero sigue presente (Davino, Caruso, Bertacca, Barone, y Panno, 2020; Klap, Luria, Smith, Bakelman, y cols., 2020; Panno y cols., 2020). Así también, estos análisis son relativamente rápidos para no retrasar las transacciones económicas y son considerados estándar para identificar la presencia del virus.

Los cultivos mayormente afectados por ToBRFV actualmente son el tomate y el chile pimiento, sus únicos hospederos naturales conocidos. El tomate, uno de los hospederos principales, tuvo para el año 2018 un valor de US\$21.7 millones en exportaciones. Si se toma en cuenta la acumulación entre 2014-2018 se estima que sube a US\$90.9 millones indicando que el cultivo es importante para los agricultores guatemaltecos (de Economía Guatemala, 2018). Por otro lado, el chile pimiento tuvo una exportación para el 2016 de US\$15,088,808 (de Agricultura Ganadería y Alimentación, 2017). En Guatemala es de suma importancia detectarlo de forma temprana porque ya se encuentra en México y se cree que ya llegó a Suramérica (Cambrón-Crisantos y cols., 2018). Además, la Unión Europea declaró en cuarentena a este virus debido a su rápida diseminación. Debido a esta cuarentena,

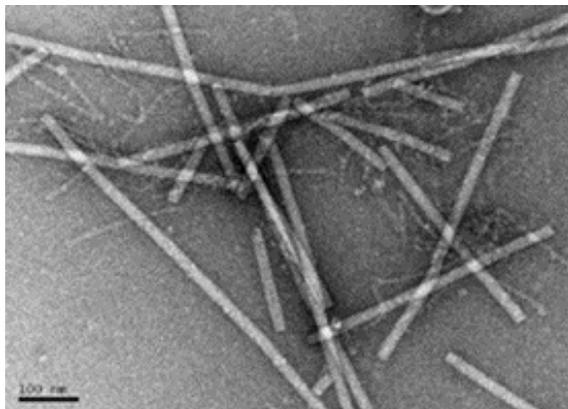
las semillas importadas a Europa deben presentar un certificado de diagnóstico negativo del virus ToBRFV determinado por RT-qPCR (of the European Union, 2020). Por este motivo se propuso implementar un método de diagnóstico en semillas de tomate y chile pimiento ya que en Guatemala, actualmente no cuenta con uno estandarizado.

4.1. Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)

4.1.1. Características generales

El *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) pertenece al género de los *Tobamovirus*. Este género se caracteriza por: (1) ser transmitidos por semillas, (2) no poseer vectores biológicos, (3) los viriones son estables fuera del hospedero, (4) una cápside cilíndrica con unos 18 nanómetros de diámetro, (5) alto título de viriones en plantas y (6) un alto número de hospederos (Kenyon y cols., 2014). El ToBRFV fue descrito por primera vez en Jordania en el año 2016 en un reporte de aislados de invernaderos de tomate. Presenta viriones con forma cilíndrica y filamentosa, cumpliendo con la descripción de los viriones del género *Tobamovirus* (Klap, Luria, Smith, Bakelman, y cols., 2020; Salem y cols., 2016). Los viriones tienen una media de 235 ± 123 nm de largo y 18 nm de ancho como se muestran en la Figura 1 (Luria y cols., 2017).

Figura 1: Partículas virales de ToBRFV aisladas de fruto y hojas de tomate.



Descripción: Fotografía tomadas a través de microscopía electrónica de transmisión (Luria y cols., 2017).

4.1.2. Genética y proteínas importantes

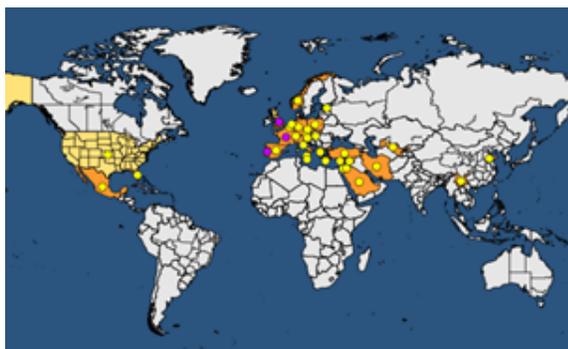
El material genético del virus se encuentra organizado en ARN (ácido ribonucleico) de una sola hebra en sentido positivo. El genoma del virus tiene una extensión de 6393 nucleótidos con cuatro ORFs (*Open Reading Frame*) sin estar segmentado. Las proteínas sintetizadas por el virus son comunes para el género *Tobamovirus*. Dos de las proteínas son asociadas a la replicación y las otras dos son relacionadas con estructura. Las proteínas asociadas con la replicación son la subunidad pequeña de la replicasa y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Además, está la proteína de movimiento (MP) que posee un peso de 30-kDa, y la proteína de la cápside (CP) con un peso de 17.5-kDa. Se estima que ToBRFV surgió de una recombinación en la región entre 534 nucleótidos y 848 nucleótidos entre TMV, ToMMV y ToMV (Salem y cols., 2016). La presencia de la proteína MP sugiere que, al igual que otros virus de su género, el virus puede trasladarse de célula a célula por medio de plasmodesmos ya que la proteína interactúa con estos provocando una dilatación mediante distintos mecanismos (Dombrovsky y Smith, 2017).

No se ha reportado resistencia contra el virus de forma específica; sin embargo el genoma se evaluó y se encontraron doce sitios potenciales para la resistencia contra la proteína de movimiento MP que podrían ser conferidos por el gen *Tm-2*. Los sitios identificados se encuentran en partes del gen que sujeto a cambios con relación a saltos de hospedero. Esto, se cree, es lo que contribuyó a la evolución del virus. La suposición es respaldada con la diferencia de las secuencias genómicas entre ToBRFV y ToMV y TMV es del 18% por lo que se cree que estos dos virus son los parentales de ToBRFV y el cambio de hospedero que promovió esta evolución se dio entre *Lamiales* y *Solanales* (Maayan y cols., 2018). Existe un locus, todavía no caracterizado a profundidad en el cromosoma 11 del tomate, que se cree es de heredabilidad recesiva y brinda un fenotipo resistente si la planta posee el gen *Tm-1*, sin embargo no se conoce el mecanismo o su distribución en tomates comerciales y otras plantas para confirmar que puede proteger a plantaciones (Zinger y cols., 2021). No obstante, se ha reportado que tomates sí han sido infectados de forma sistémica a pesar de poseer el gen de resistencia *Tm-2*, gen altamente distribuido en los tomates utilizados para comercio (Luria y cols., 2017).

4.1.3. Distribución al año 2021

El primer reporte fue en Jordania 2016; sin embargo se ha diseminado por países de Europa, Asia y América. En la Figura 2 se muestra la distribución más actualizada disponible. El virus está presente en los siguientes países: Estados Unidos, China, República Checa, Alemania, Grecia, Turquía y Holanda, México, Italia, Bélgica, Francia, España, Reino Unido, Jordania, Grecia e Israel. Decir el país donde presenta más incidencia no sería correcto ya que los reportes son variados en términos de población afectada: algunos reportes son de invernaderos y otros son de cultivos al aire libre (EPPO-Global-Database, s.f.).

Figura 2: Distribución global del ToBRFV hasta el día 4 de noviembre de 2021.



Descripción: Los puntos morados indican presencia transitoria y los amarillos indican que el virus está presente. (EPPO-Global-Database, s.f.).

Bajo condiciones experimentales se encontró que el virus es altamente estable y su difusión en un invernadero es alarmante ya que de 2 plantas inoculadas entre 480 plantas, 475 fueron infectadas luego de 8 meses. Al inicio se estimó que la transmisión fue favorecida por contacto directo entre plantas; sin embargo, según análisis espaciotemporales, la transmisión tuvo un aumento por la presencia de abejorros. Estos abejorros no funcionan como vectores ya que no transmiten el virus, sino más bien, son polinizadores que acarrean el virus sin ocasionar una infección. Esta rápida diseminación es común con los Tobamovirus; no obstante al ser un nuevo virus se desconoce con exactitud la epidemiología específica para ToBRFV (Panno y cols., 2020).

4.1.4. Mecanismo de transmisión

El ToBRFV se transmite por vía mecánica (Salem y cols., 2016) y como otros del género *Tobamovirus* también puede ocurrir a través de la semilla (Sastry, 2013). La estabilidad de partículas virales en semillas es elevada lo que le confiere estabilidad al genoma, por lo que la infección solo requiere de contacto con la parte interna de la semilla, o bien, una micro lesión al germinar (Dombrovsky y Smith, 2017). El virus se encuentra principalmente en las partes tegumentarias externas de la semilla y, en algunos casos, en el endospermo. La transmisión entre semilla y cotiledóneas es de 2.8% mientras que entre semilla y la tercera hoja verdadera es de 1.8% (Davino y cols., 2020). También se ha reportado que insectos como el abejorro *Bombus terrestris* puede acarrear partículas virales en sus abdómenes y mantener en sus colmenas una fuente de partículas. Estas fuentes son almacenadas en estructuras del panal como los peines y néctar (Levitzy y cols., 2019).

Como se mencionó, las partículas virales son estables en las semillas. Tratamientos térmicos de 80°C, 75°C, 70°C, tratamientos químicos de fosfato trisódico, peróxido de nitrógeno, ácido clorhídrico e hipoclorito de sodio fueron eficientes para inactivar el virus puesto que las partículas encontradas luego de los tratamientos no eran infecciosas. Sin embargo, esta información indica que el comercio entre países podría seguir teniendo problemas dado que serían necesarios bio-ensayos para comprobar que el virus detectado no es infeccioso (Davino y cols., 2020).

4.1.5. Hospederos conocidos

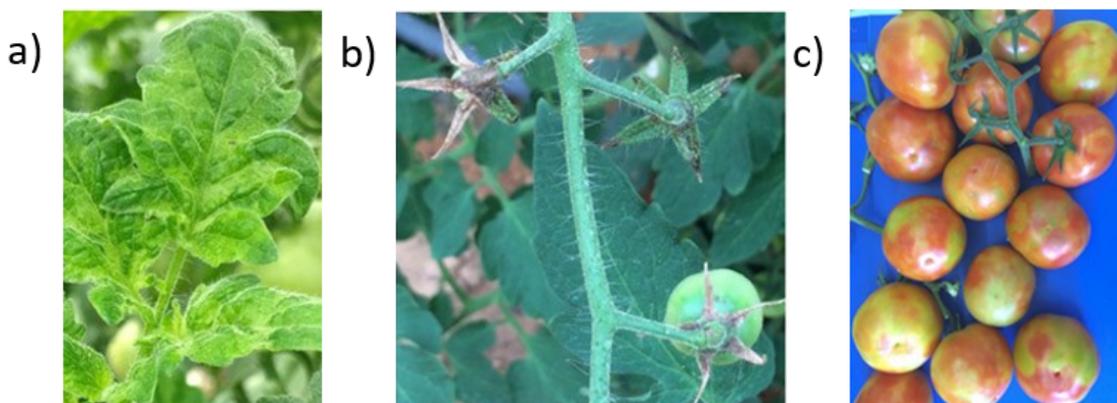
Los hospederos naturales confirmados del virus ToBRFV son el tomate (*Solanum lycopersicum*) y el chile pimiento (*Capsicum annuum*) (EPPO-Global-Database, s.f.; Salem y cols., 2016). No se

conocen hospederos secundarios, sin embargo, bajo condiciones artificiales se ha logrado transmitir a *Petunia hybrida*, *Solanum nigrum* y a diferentes especies de *Nicotiana* (*N. tabacum*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*) y *Chenopodium* (Luria y cols., 2017; Panno y cols., 2020).

4.1.6. Síntomas y daños a la planta

El virus puede encontrarse en la parte interna del exocarpo de tomates aunque puede causar infecciones sistémicas mostrando síntomas en distintas partes de la planta. En plantas de *Nicotiana glutinosa* puede provocar lesiones locales (Klap, Luria, Smith, Bakelman, y cols., 2020). En hojas de tomate causa amarillamiento intervenal, deformación, mosaico, necrosis; en sépalo puede causar deformación y necrosis, y en frutos puede causar decoloración, deformación, mosaico y necrosis (Figura 3). Además, el virus puede coinfectar junto con el *Pepino Mosaic Virus* (PepMV) agravando los síntomas ya mencionados (Davino y cols., 2020; Klap, Luria, Smith, Hadad, y cols., 2020; Salem y cols., 2016).

Figura 3: Síntomas causados por *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* en *S. lycopersicum*.



Descripción: a) Mosaico en hojas. b) Necrosis en sépalo. c) Decoloración en fruto (Luria y cols., 2017).

Los chiles pimientos presentan diversos síntomas. Entre los síntomas observados se encuentran la coloración amarillenta, rayado verde, deformación del fruto, clorosis y mosaico en hojas. En el tallo se presenta una necrosis, marmoleado, mosaico, enrojecimiento del tallo (Luria y cols., 2017). El ToBRFV puede infectar hasta el 100% de plantas en un cultivo y las pérdidas que esto puede causar varían de un 30-70%. La infección puede reducir el vigor de la planta lo que puede reducir la cantidad de producción de un lote, por ejemplo, de una producción de 24-30 se puede reducir a 8-10 frutos (EPPO-Global-Database, s.f.).

4.2. Extracción de ARN

En el caso de algunos virus como el ToBRFV, el ácido ribonucleico es su genoma. El fin de la extracción de ARN es aislar esta molécula del resto de los componentes virales, tanto proteínas, lípidos y carbohidratos que se puedan encontrar en la partícula viral para poder analizar características genéticas, de expresión, entre otros aspectos. Existen diversas metodologías para llevar a cabo el aislamiento del ARN ya que este es más sensible a degradación que el ADN. Todos los métodos recaen inicialmente en la lisis realizada por agentes caotrópicos o tensoactivos, seguidos por distintos pasos removiendo moléculas como carbohidratos, proteínas y lípidos hasta aislar el ARN (Farrell, 2010).

Al finalizar la lisis, los últimos pasos presentan gran similitud entre los protocolos. Una vez aislado el ARN, este debe precipitar con etanol y resuspender en agua ultrapura. Al realizar extracciones de ARN de virus fitopatógenos, se debe tomar en cuenta que estos se encuentran dentro de células por lo que los métodos deben adaptarse a la extracción de tejidos vegetales (Kumar, Udaya Shankar, Nayaka, Lund, y Prakash, 2011). Dado que el ARN está compuesto por una sola hebra de material genético, este es altamente susceptible a degradación y daño. Estos pueden darse por temperatura, pH alcalino, daño mecánico, y principalmente, degradación enzimática por ARNasas. Estas enzimas son extremadamente comunes en los organismos por lo que la extracción debe realizarse en un ambiente libre de ellas o en un ambiente donde la actividad este inhibida (Farrell, 2010).

4.2.1. Métodos evaluados

SV Total RNA Isolation System®

Se utilizó un kit comercial para la extracción de ARN de la casa comercial Promega®. El método de aislamiento de ARN se basa en la lisis seguido de la retención en una columna de sílica con tiocianato de guanidino GTC, una sal caotrópica, que deja al ARN en solución mientras atrae los demás componentes celulares precipitándolos. Este kit contiene un tampón de lisis con 2-mercaptoetanol, un tampón para realizar la digestión de ADN con enzimas. Y un tampón para adherir el ARN a la columna y otro para liberar el ARN de la columna. Cada tampón debe contener una composición que permita modificar la afinidad de la columna ya que tanto ARN como proteínas y carbohidratos son adheridos a ella (PROMEGA, 2018).

CTAB

El detergente Bromuro de cetiltrimetilamonio o CTAB por sus siglas en inglés es altamente utilizado con tejidos vegetales por su capacidad tensoactiva y la característica que puede aislar tanto ADN como ARN de carbohidratos abundantes en las plantas (Farrell, 2010; Wang y Stegemann, 2010). Los tampones que contienen CTAB comúnmente están acompañados de sales como Tris-HCl, cloruro de sodio (NaCl). También, polivinilpirrolidona (PVP) para fenoles y 2-mercaptoetanol para remover y polifenoles y taninos (Poon y cols., 2019).

Luego de la lisis es común continuar con solventes orgánicos para realizar una separación de fases. Estos solventes son fenol y cloroformo. Esto facilita el aislamiento de ARN ya que este pasa a la fase acuosa mientras que las demás moléculas como carbohidratos y proteínas pasan a fase orgánica (Rubio-Piña y Zapata-Pérez, 2011).

4.2.2. Ventajas y desventajas según métodos

Los amortiguadores comerciales resultan atractivos debido a la reducción de insumos gastados, sin embargo implican una dependencia a los materiales del kit. Esto implica que no hay otra forma para reabastecer los suministros más que realizar una venta. Se requiere realizar esta transacción debido y que no se conoce la composición exacta de los tampones por lo que no se pueden reemplazar. Una de las ventajas del uso del tampón CTAB es la facilidad con la que ayuda a separar los polisacáridos y la destrucción de la pared celular de la planta; sin embargo, también requiere la presencia de otras soluciones para realizar el aislamiento (Poon y cols., 2019). Otro aspecto del método es la gran variedad de tejidos vegetales de los que se puede extraer, hojas, tallos, raíces e inclusive troncos (Hernández-Guzmán y Guzmán, 2013).

4.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción (RT-qPCR)

4.3.1. Principio

Ya que el ARN es muy susceptible a degradación, es necesario la formación de una hebra complementaria para que se forme un ADN llamado ADN complementario (ADNc). Esta forma del ARN también permite realizar diversidad de análisis dependiendo los intereses del estudio. La formación del ADN complementario se realiza mediante una reacción similar a la de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, sin embargo al ser ARN es necesario utilizar una retro transcriptasa para trabajar sobre ARN (Farrell, 2010).

Una variante de la RT-PCR es la utilización de sondas para poder detectar simultáneamente la amplificación de genes de interés luego de la síntesis de ADNc en una sola reacción. Esta recibe el nombre de RT-qPCR siendo la “q” indicador de cuantitativo o tiempo real. Esta reacción utiliza sondas para realizar la cuantificación. Las sondas son fragmentos de ADN con un largo de 20-30 bases con un fluoróforo adherido y se unen a fragmentos específicos correspondientes a su secuencia cercana a uno de los cebadores sin sobrelaparse. Al momento de ser amplificado, la enzima polimerasa hidroliza dos moléculas: el *quencher* y el fluoróforo. Las moléculas *quencher* se basan en la transferencia de energía de resonancia Föster FRET. Esto quiere decir que la fluorescencia no puede ser emitida porque el *quencher* está absorbiendo la energía por proximidad al fluoróforo. Una vez ocurre la hidrólisis y la separación del *quencher* y el fluoróforo, se emite la fluorescencia indicando que hay un fragmento amplificado correspondiente a esa sonda. Esta señal de fluorescencia se mide por medio de espectrofotometría y va siendo acumulada hasta que es detectable. La Figura 4 muestra de forma gráfica el funcionamiento de la sonda (Adams, 2020).

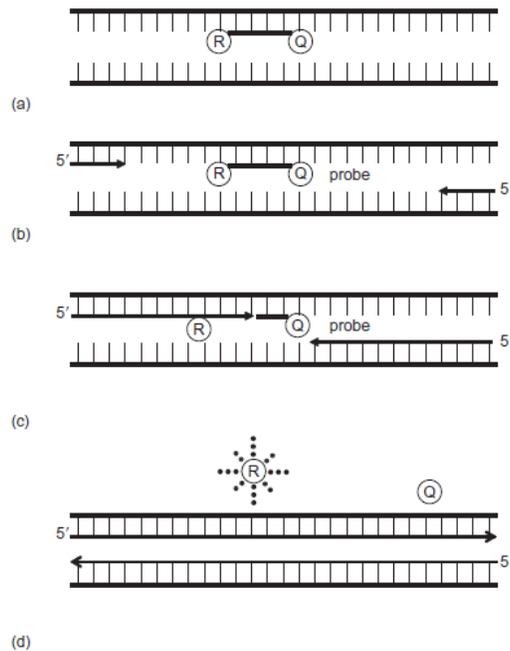
4.3.2. Métodos de optimización y validación

La optimización se entiende como la experimentación para llevar a una reacción a condiciones óptimas. En el caso de un RT-qPCR esto implica concentraciones de cada componente de la reacción así como condiciones del termociclador. Los componentes a tomar en cuenta son el tampón de reacción, MgCl₂, cebadores, sondas, desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), Retro transcriptasa. Mientras que las condiciones de termociclado implican temperaturas, tiempo, ciclos de repetición del proceso y ciclo de *threshold* (Ct). El ciclo Ct corresponde al número del ciclo donde la fluorescencia emitida sobrepasa la señal de fondo. La validación, por otro lado es comprobar que el método utilizado es apropiado para el análisis (Viljoen, 2005).

Principalmente, para optimizar se alteran dos condiciones importantes. Estos son cebadores y su temperatura de hibridación. Es posible alterar todos los componentes, sin embargo este proceso, conocido como el método Taguchi, implica realizar un alto número de pruebas. La base es alterar la concentración de un solo componente y dejar los otros constantes con el fin de determinar qué tanto afecta la concentración de ese componente y la apropiada. Dependiendo del componente, la concentración apropiada es acorde a los efectos. El magnesio está relacionado con la especificidad de la polimerasa utilizada, los cebadores, dNTPs material genético y polimerasa se relacionan según la cantidad necesaria para llevar a cabo la reacción. Una vez obtenida la concentración ideal para un componte, se debe repetir el proceso pero variando el componente (Viljoen, 2005).

Es necesario realizar una curva estándar para determinar la eficiencia, el rango dinámico lineal y la reproducibilidad del ensayo. La eficiencia está relacionada con la capacidad de duplicar el número de moléculas diana en cada ciclo de amplificación. Idealmente, la eficiencia debe encontrarse entre el 90-110%. El rango dinámico es el intervalo, según la cantidad de templado, donde la linealidad y la eficiencia son los indicados. La linealidad, el R², debe ser mayor a 0.99 y se refiere a la relación

Figura 4: Funcionamiento de una sonda TaqMan® durante una reacción de carácter cuantitativo



Descripción: se observa el proceso de la amplificación. (a) la sonda se une al tempado. (b) La polimerasa enlarga la hebra en dirección 5' -> 3'. (c) la polimerasa hidroliza la sonda. (d) tanto el *quencher* (Q) como el fluoróforo (R) son liberados y el último emite la señal detectada (Farrell, 2010).

que existe entre el ciclo de cuantificación y las diluciones de templado. El ciclo de cuantificación (C_q) es un número relativo dentro del ensayo que no es determinado por reactivos o eficiencia, sin embargo debería tener una baja desviación estándar entre replicas en diferentes ensayos (Bio-Rad, s.f.). Para crear esta curva, es necesario realizar reacciones con distintas concentraciones de ADNc y determinar sus valores C_t . Se debe graficar el C_t contra el factor de dilución en una escala semi logarítmica. Esta gráfica, a su vez, ayuda a determinar los límites de detección (Adams, 2020).

La optimización de temperatura de hibridación se realiza seleccionando temperaturas sobre y por debajo de la temperatura teórica de los cebadores para evaluar. Para determinar cuál es mejor, se debe tomar en cuenta el valor más pequeño de C_q sin muestras inespecífica (Adams, 2020).

5.1. Hipótesis

- Hipótesis de investigación 1:
 - La metodología RT-qPCR optimizada detecta sin ambigüedad *Tomato Brown Rugose Fruit Virus*.
- Hipótesis de investigación 2:
 - No existe diferencia, con respecto a concentración y pureza, entre los métodos de extracción de ARN con CTAB y kit SV Total RNA Isolation System®.

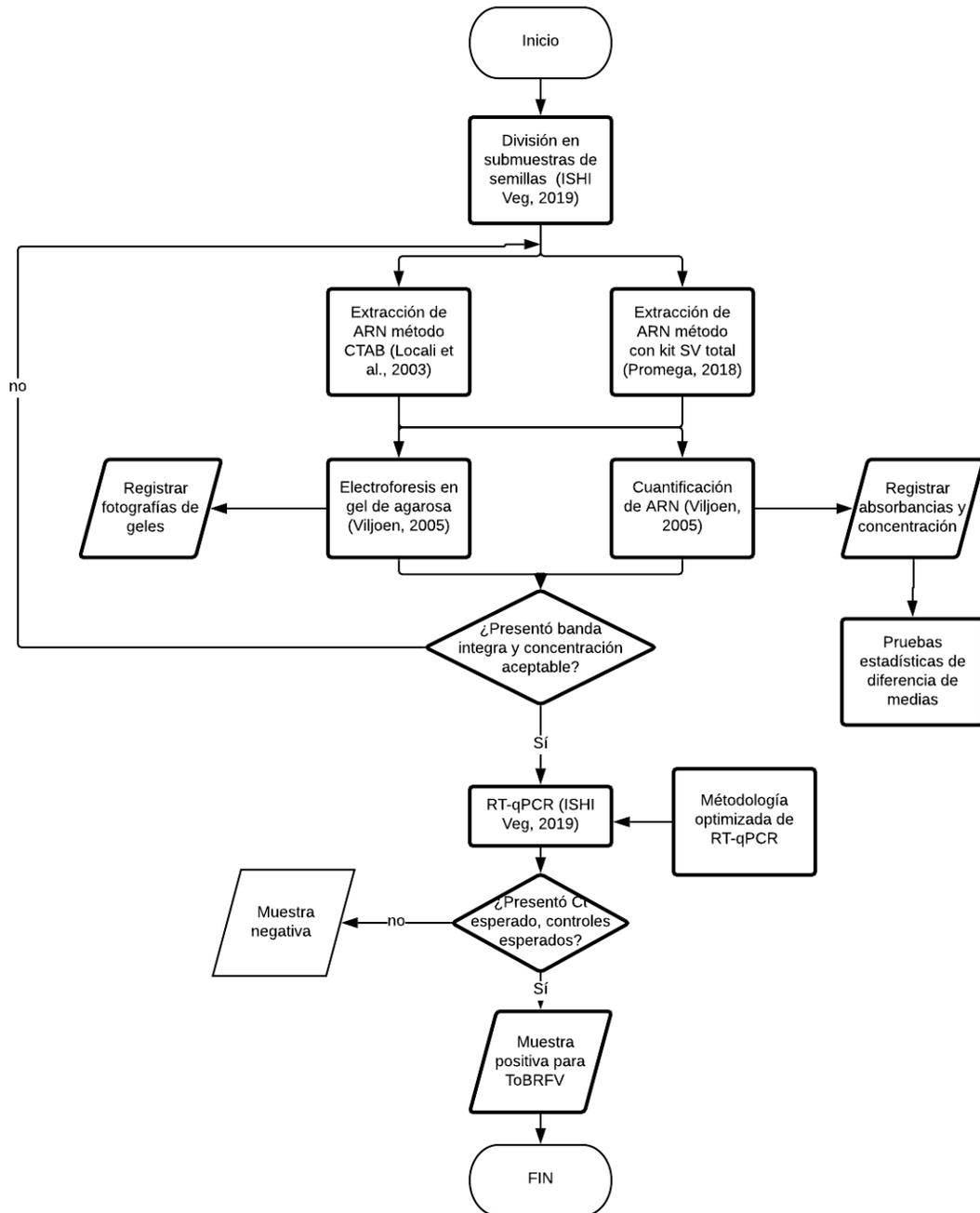
5.2. Variables

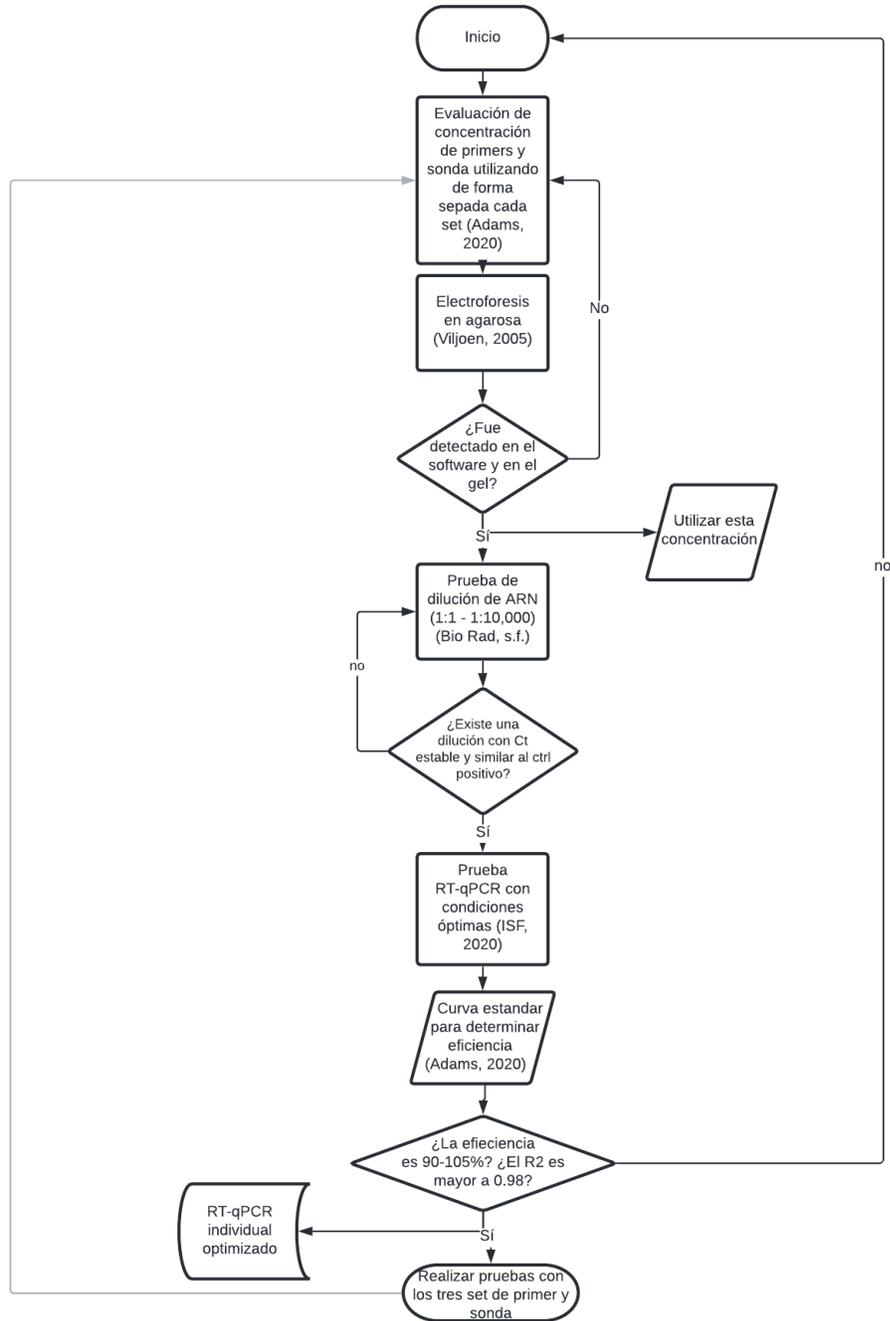
Cuadro 1: Definición de variables del estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medición
Concentración de ARN	ARN en un volumen determinado	Absorbancia a 260nm multiplicada por 40ng.	Cuantitativa	Nanogramo/microlitro (ng/ μ L)
Pureza de ARN	Razón para determinar presencia de contaminantes en el ARN	Razón de la absorbancia a 260, 230 y 280nm.	Cuantitativa	Razón arbitraria
Concentración de reactivo para RT-qPCR	Cantidad de cebadores, sonda, tampón y enzima contenidos en la reacción	Volumen de reactivo utilizado.	Cuantitativa	Micromolar (μ M)
Unidad relativa de fluorescencia (RFU)	Detección de fluorescencia emitida por las sondas indicando amplificación	Unidad arbitraria determinada por espectrofotometría	Cuantitativa	RFU
Ciclo de cuantificación (Cq/Ct)	Ciclo donde la RFU cruza el umbral de detección, es decir, presentan una señal sobre el ruido de fondo	Ciclo donde la amplificación empieza a ser exponencial en el gráfico	Cuantitativo	Número de Ciclos
Temperatura de hibridación	Energía donde los cebadores se unen al templado.	Grados Celsius durante la fase de hibridación	Cuantitativo	Grados Celsius ($^{\circ}$ C)

5.3. Materiales y métodos

Figura 5: Diagrama de flujo de la metodología empleada en esta investigación





5.3.1. Comparación de métodos de extracción

Para la extracción de ARN se siguió el procedimiento recomendado por ISHI-Veg (2019) con modificaciones según tamaño de la muestra. Es necesario iniciar macerando las semillas con tampón de sales de fosfato (PBS) compuesto por cloruro de sodio 8.0g/L , fosfato disódico 1.15g/L y fosfato monopotásico 0.2g/L con un pH final de 7.2-7.4 ajustado con HCl o NaOH 1.0 N. Esterilizado por autoclave a 121°C, 15 psi por 15 minutos

La extracción se realizó con una muestra de 250 semillas de tomate y 250 semillas de chile pimiento luego de que estas fueran lavadas de impurezas, ya que se trataban de semillas tratadas para su comercialización, por un minuto en cada una de las siguientes soluciones: agua desmineralizada, cloro 10 % y agua desmineralizada nuevamente. Para las semillas de tomate se utilizó 10mL del tampón PBS y para las semillas de chile pimiento se utilizó 20mL. Se tomó 100µL de cada extracto en microtubos y este volumen fue utilizado para continuar con la extracción utilizando los dos métodos. Al finalizar cada método se realizó un gel de integridad, se cuantificó el ARN en espectrofotómetro UV-Vis, y una RT-qPCR (ISHI-Veg, 2019). Se hicieron unas pruebas donde solo se extrajo y se evaluó la integridad de grupos de semillas de 250, 100, 50, 25 semillas ya que se consideró que en Guatemala algunos exportadores no cumplen con el mínimo de muestra exigido.

CTAB-cloroformo-fenol

Se continuó con el procedimiento de extracción de ARN partiendo de los 100 µL tomados de cada macerado. A cada microtubo se agregó 600uL de tampón de extracción de ARN (EDTA 20mM, pH de 8.0, Tris-HCl 100mM con pH de 7.5, NaCl 1.4 M, CTAB 2 % (p/v), polivinilpirrolidona PVP-40 4 % (p/v), -mercaptoetanol 2 % (v/v) agregado previo de su uso). Esto se incubó por 15-30 minutos a 55°C con agitación. Luego de dejar los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos, se agregó 200 µL de fenol y 200 uL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se homogenizó esta mezcla mediante inversión y se centrifugó por 8 minutos a 13000 rpm. Se tomó la fase acuosa y se agregó un volumen equitativo de isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato de amonio 1.5 molar. Se mezcló por inversión y se colocó a -20°C por 20 minutos. Los tubos fueron centrifugados por 12 minutos a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se añadió 100uL de etanol 70 % y se centrifugaron a 13000rpm por 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar por al menos 40 minutos. Al tubo, se agregó 25µL de agua libre de nucleasas hasta disolver el precipitado y se almacenó a 4°C (Locali y cols., 2003).

SV Total RNA Isolation System®

Se siguió el procedimiento del kit comercial de Promega® especificado para tejidos vegetales luego de haber utilizado el tampón PBS en la maceración de las semillas. Esto indica que se omitirán los pasos de trituración del tejido. Al extracto se agregaron 175µL de RNA lysis tampón (RLA) y 350µL de RNA dilution tampón (RDA) mezclando por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos. El sobrenadante fue tomado y trasladado a otro microtubo. Se agregó 200µL de Etanol 95 % y se mezcló por pipeteo 3-4 veces. Esta mezcla fue añadida a la columna contenida en un tubo recolector y se centrifugó a 12000-14000 g por un minuto. El líquido fue descartado y se añadió 600 µL de RNA wash away (RWA) a la columna. Nuevamente, se centrifugó 12000-14000 g por un minuto descartando el líquido. Se preparó la solución con ADnasa por cada microtubo de extracción de la siguiente manera: 40µL de Yellow core tampón, 5 µL 0.09M MnCl₂ y 5µL de DNase I. Se agregaron 50µL de esta solución a cada columna y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Para detener la digestión de ADN, se agregó 200µL de DNase stop solution a la columna y se centrifugó a 12000-14000 gravedades por un minuto. Se añadió 600µL de RWA y centrifugó 12000-14000 gravedades por 1 minuto descartando el líquido. Se realizó un último lavado con 250µL de RWA y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos. Finalmente, se colocó la columna en un tubo de elución y se agregó 100 µL de agua libre de nucleasas a la columna. Se obtuvo el ARN resuspendido al centrifugar por un minuto a 12000-14000 gravedades. Se almacenó el tubo a -70°C hasta su uso (PROMEGA, 2018).

5.3.2. Cuantificación de ARN, determinación de pureza por espectrofotometría e integridad

Se utilizaron cubetas de cuarzo para espectrofotómetro UV-Vis de Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 y agua libre de nucleasas como blanco. La lectura de absorbancias se realizó en las longitudes de onda 260, 280 y 230 nanómetros. Se calcularon las razones de A260/A280 y A260/A230 para determinar pureza. La pureza para ARN fue evaluada como pura a 2.0 en la razón A260/A280 aunque fue aceptada si se encontraba en el rango de 1.7–2.1. En la razón A260/A230 se aceptó un valor entre 1.8 y 2.2. La concentración se determinó tomando en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nanómetros equivale a 40ng/μL de ARN de una hebra (PROMEGA, 2018; Viljoen, 2005).

Paralelamente, se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1.33 % para evaluar la integridad del ARN extraído. Para preparar el gel de agarosa, así como para realizar la electroforesis fue necesario tampón TAE 1X. El tampón se preparó a una concentración de 50X (Tris base 242g, 18.61g EDTA disódico di hidratado, 57.1 ácido acético glacial, agua desmineralizada para aforar a un litro y pH de 8.6) por lo que debe ser diluido con agua desmineralizada. Se evaluó la presencia de dos-tres bandas siendo estas ADN genómico, 18S y 28S. Este proceso no requiere marcador molecular ya que los tamaños pueden variar, sin embargo, es común encontrar las bandas cercanas de 4 y 2 kilo bases respectivamente para las bandas de ARN (Farrell, 2010; Viljoen, 2005).

Diferencia de medias

Se obtuvieron las medias y desviaciones estándar de purezas y concentraciones. Si los datos presentan una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk, se realizó una prueba T de Student para la diferencia de medias. Si los datos, muestran no ser normales, se utilizó el método Wilcoxon con el mismo fin (Anderson y Sweeney, 2011).

5.3.3. Optimización de RT-qPCR

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas para obtener condiciones óptimas para una reacción RT-qPCR en un paso. Se utilizó el kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (PROMEGA, 2020) y el sistema 7500 Real-Time PCR System de Applied Biosystems™.

Controles positivos

- Un control positivo de amplificación (PAC). Se utilizaron dos controles, uno por cada región del virus ToBRFV amplificado. Estos controles positivos fueron determinados mediante la realización de análisis bioinformático PCR *in silico* para obtener secuencias específicas para el virus según los cebadores establecidos por la International Seed Federation (ISHI-Veg, 2019). El control para la región MP corresponde a la secuencia 5'-GTCGTGGTGGTGTCAGTGTCTGTTTGGTCGATAAGAGAA TGGAGAGAGCGGACGAGGCAACTCTTGCTTCATACTATAACCGCAGCGGCTAAGAAAAGG TTTCAGTTCAAAGTTCGTTCCAA ATTACAACATCACTACCAAGGACGCAG-3'. La secuencia del control de la región CP es 5'-GAGCACATTTGAAAGTGCATCCGGTTTACAATGGTCCTCTG CACCTGCATCTTGAGATAATCGAGATGCTTAAATAACAGATTGTGTCTGCAAACACACGT GTTACGTAC-3'.

- Control positivo de extracción (PEC), esta es la solución que actúa como control interno de amplificación (IAC). PEC es preparado al realizar una extracción de una muestra positiva de *Sugarcane Mosaic virus* (SCMV) en el tampón PBS.

• Finalmente, se tuvo un control negativo de templado (NTC) el cual es la solución de reacción de RT-qPCR sin ningún tipo de material genético (ISHI-Veg, 2019).

Concentración de componentes

Dado que son distintos cebadores, se realizaron las pruebas por separado (BioRad, s.f.). Se preparó la solución de reacción de RT-qPCR con un volumen final de 20.0µL. Las concentraciones finales como punto de referencia fueron 0.3µM de cebadores, 0.2µM de la sonda y 100ng de ARN. Se utilizó el kit GoTaq® Probe 1 -Step RT-qPCR System de Promega®. Las concentraciones finales recomendadas para este kit son 1x de tampón de reacción GoTaq® Probe qPCR, 1X de GoScript RT mix for 1 step RT-RT Mix adecuado para reacciones directas. En este paso, se utilizarán los PEC y PAC como templados en reacciones separadas. El Cuadro 2 muestra los cebadores y sondas utilizadas (ISHI-Veg, 2019; PROMEGA, 2020; Enza Zaden, 2019; Malapi-Wight y cols., 2021). La concentración de cebadores fue variada entre los rangos recomendados por el kit siendo estos entre 0.2-1µM para los cebadores y 0.1-0.3µM de sonda.

Cuadro 2: Cebadores y sondas utilizados para la detección de ToBRFV

Cebador	Secuencia (5'-3')	Región que amplifica	Fuente
CSP1325-F	CATTTGAAAGTGCATCCGGTTT	Proteína de cápside (CP) y terminal tipo 3' ARNt	CSP Labs, Estados Unidos
CSP1325-R	GTACCACGTGTGTTTGCAGACA		
CSP1325-P	JOE- ATGGTCCTCTGCACCTGCATCTTGAGA-BHQ1		
CaTa28-F	GGTGGTGTCAAGTGTCTGTTT	Proteína de Movimiento (MP)	Enza Zaden B.V. Países Bajos
CaTa28-R	GCGTCCTTGGTAGTGATGTT		
CaTa28-P	FAM-AGAGAATGGAGAGAGCGGACGAGG-BHQ1		
SCMV-F	CAGCGAAATCTCACCGACTAT	Control interno	Malapi y cols, 2021
SCMV-R	CTGCATGTGGGCTTCCTTA		
SCMV-P	TAMRA- ACGAAATGACTTCAAGGACACCAGCT-BHQ		

Las condiciones del termociclador fueron 15 minutos a 45°C para la reacción de retrotranscripción, 2 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial y desactivación de la retrotranscriptasa y 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C para la extensión final. Debido a que las sondas son detectadas por hidrolisis no fue posible realizar una gráfica de fusión por lo que fue necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa. (Adams, 2020; Bio-Rad, s.f.; Viljoen, 2005).

Validación de cebadores de forma individual

Para validar se realizó esta reacción utilizando una dilución de PAC y PEC 1:1 hasta 1:1,000,000. Las condiciones del termociclador fueron las evaluadas anteriormente. Para calcular la eficiencia (%E) de la reacción graficando los valores Cq contra el logaritmo de la concentración inicial obteniendo la ecuación de la recta. Posteriormente, el cálculo sigue la siguiente ecuación:

$$\%E = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}}\right)} - 1 \right) * 100\% \quad (1)$$

De presentar una eficiencia entre 90-110% incluso llegando a 130% y un $R^2 > 0.98$, el ensayo es validado (BioRad, s.f.; Gunstream y cols., 2020). En esta curva también puede determinarse los límites de detección. Se toma el valor mayor y el menor donde todavía se aplica la linealidad.

Validación de reacción múltiple

Una vez validado los resultados de los cebadores individualmente, se realizó la reacción con las mismas condiciones exceptuando que ahora se combinan los cebadores en la reacción. Para determinar si el ensayo es válido, se comparó los valores de Ct. Si la diferencia entre los valores es menor a 1, es aceptado (BioRad, s.f.). De no ser válido, se debe optimizar.

Si el Cq es más retardado se debe aumentar las concentraciones gradualmente hasta llegar al Cq con diferencia menor a uno respecto a las pruebas individuales. Para optimizar se realizaron las siguientes pruebas según el valor de Cq. :

- 1- Aumentar o disminuir concentración de cebadores en pasos de 10nM.
- 2- Añadir o disminuir la cantidad de templado
- 3- Alterar la concentración de dNTPs en pasos de 10uM (Adams, 2020; Bio-Rad, s.f.).

Estos aumentos o disminuciones pueden llevarse a cabo en un mismo ensayo, es decir distintas reacciones individuales bajo las mismas condiciones.

5.3.4. Aplicación de metodología optimizada

Una vez la reacción RT-qPCR y la extracción fueron optimizados por separado, se aplicaron en conjunto. La metodología optimizada fue aplicada a semillas. De no estar presente ToBRFV, SCMV debería ser amplificado sin interferencias (ISHI-Veg, 2019). De ser deseado, se puede realizar una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que todavía no estén presentes productos inespecíficos (Adams, 2020).

Para el análisis comparativo de métodos se realizaron 35 extracciones de ARN de semillas de tomate y chile pimiento por cada método. De las 35 extracciones, siendo 18 extracciones de semillas de chile y 17 de tomate. Por otro lado se realizaron extracciones de los grupos de 250, 100, 50 y 25 semillas evaluando solamente integridad.

6.1. Comparación de métodos de extracción de ARN en semillas

Se realizó una prueba Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos en términos de concentración y pureza presentados en el Cuadro 3. Se puede observar que los datos no son normales ya que presentan un valor-p menor al alfa (0.05) a excepción de la pureza A260/A230 del método CTAB.

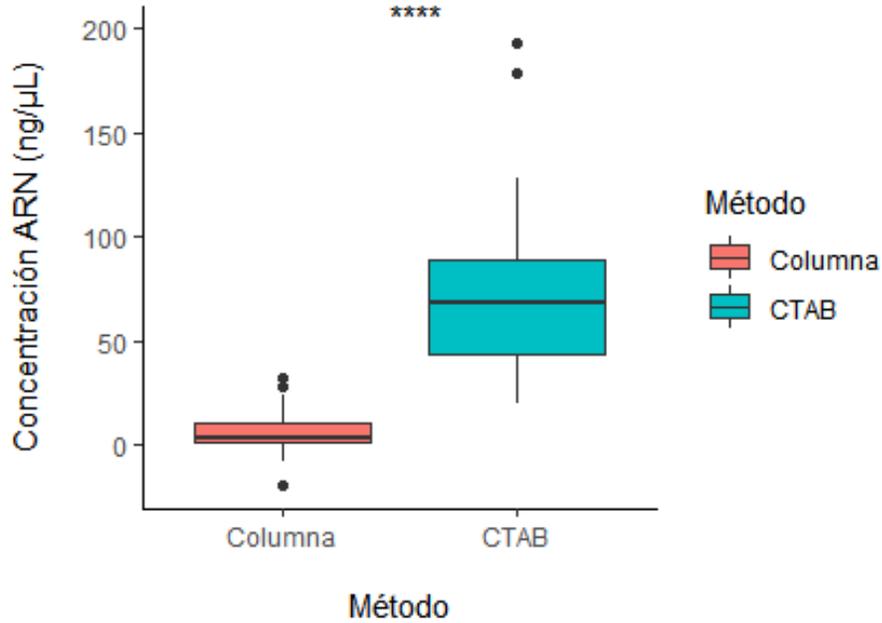
Cuadro 3: Prueba de normalidad Shapiro-Wilk de los parametros evaluados para extracción de ARN de semillas

Método	Valor-p de la variable		
	Concentración	A260/A280	A260/A230
CTAB	0.00721	0.00000106	0.0182
Columna	0.00247	0.00942	0.000000354

Debido a la falta de normalidad de los datos, se continuó la evaluación con pruebas no paramétricas. La diferencia de métodos fue evaluada por pruebas de Wilcoxon. La primera diferencia evaluada fue según la concentración de ARN obtenida. Dado que la distribución de datos no es normal, se reportan los datos de mediana y el rango Intercuartil entre parentesis. La concentración mediana sin importar el tipo de semilla para el método de extracción con CTAB fue 68.0(44.9) ng/ μ L de ARN, mientras que para el método utilizando columna fue de 2.76(9.36) ng/ μ L de ARN (Fig. 6). El valor-p para la prueba de Wilcoxon fue 2.13×10^{-12} indicando una diferencia significativa entre

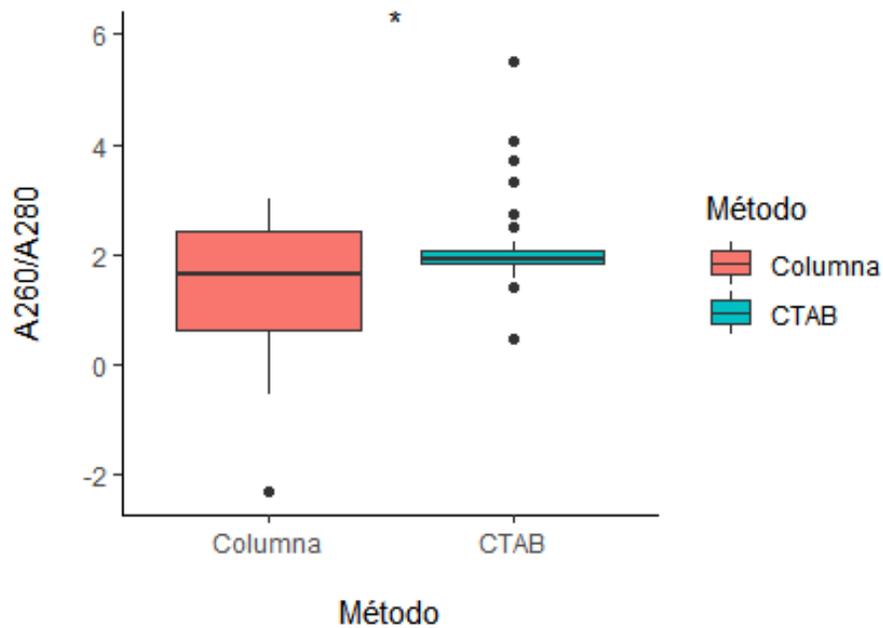
métodos denotada en la figura por los asteriscos en la parte superior.

Figura 6: CTAB presenta mayor concentración de ARN de forma significativa acorde a la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon



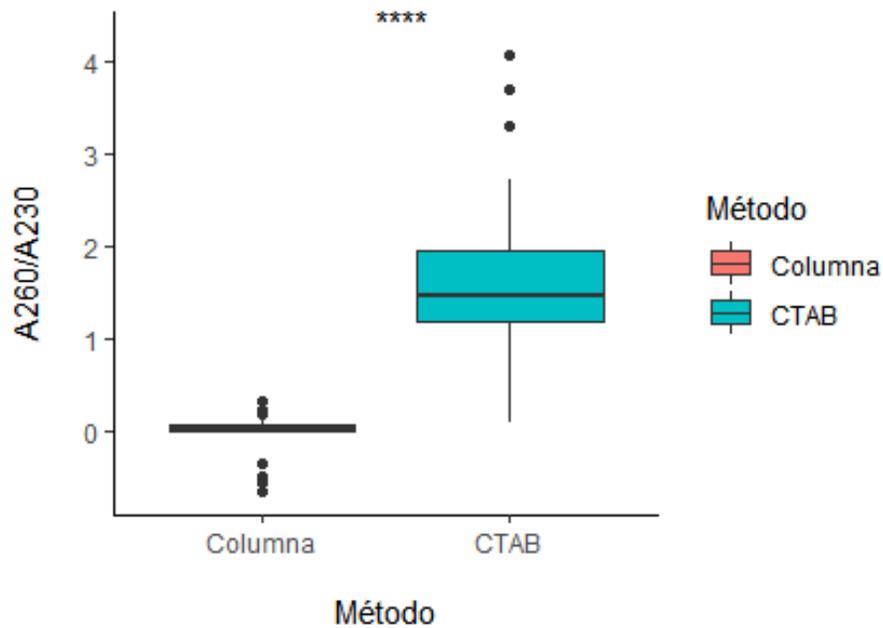
La diferencia entre la pureza A260/A280 entre métodos (Fig. 7) también es significativa con un valor-p de 0.0465. En esta comparación se puede notar en la figura que sucedió lo contrario en cuanto a la distribución de los datos ya que el método de extracción de columna poseyó una mayor, sin embargo el método de CTAB presentó más datos atípicos denotados por los puntos. Esto es evidenciado también por los valores del intercuartil siendo 1.61(1.81) y 1.92(0.22) para el método de columna y CTAB respectivamente. Cabe mencionar que fueron obtenidos valores negativos en el método de extracción por columna.

Figura 7: Método CTAB presenta diferencia significativa según prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon en terminos de pureza A260/A280



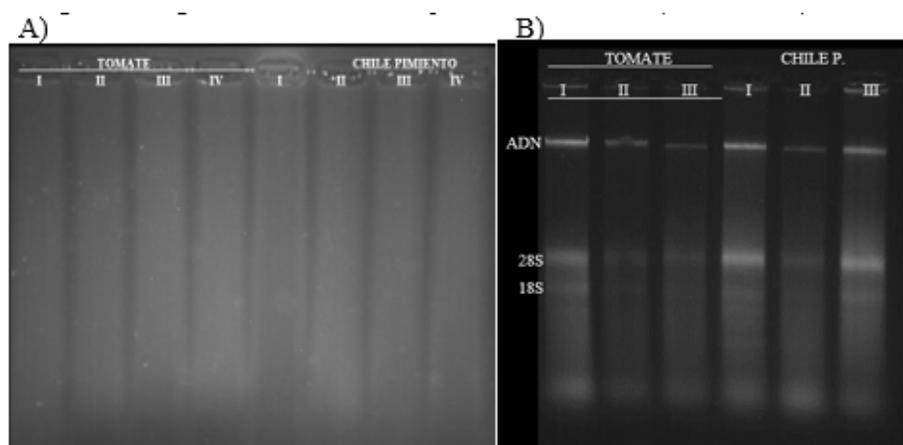
Finalmente, se evaluó la comparación de medias entre métodos según la pureza A260/A230. Las medianas de estos valores fueron 0.02(0.06) y 1.47(0.77) para los métodos de columna y CTAB respectivamente. Una vez más existió una diferencia significativa (Fig. 8) entre métodos con un valor-p de 1.29×10^{-12} . En esta comparación se pudo observar datos atípicos para ambos métodos siendo el método de columna el que más poseyó. Así mismo, el método de columna volvió a presentar datos negativos.

Figura 8: Método de CTAB presenta mayor pureza A260/A230 de forma significativa acorde a la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon



Los resultados de pureza y concentración coinciden con los geles de integridad (Fig 9). El método de extracción utilizando columna no demostró ARN detectable en el gel mientras que el método por CTAB demuestra tres bandas distintivas. A estas bandas se les asignó según el orden de separación la identificación de ADN genómico, 28S y 18S respectivamente.

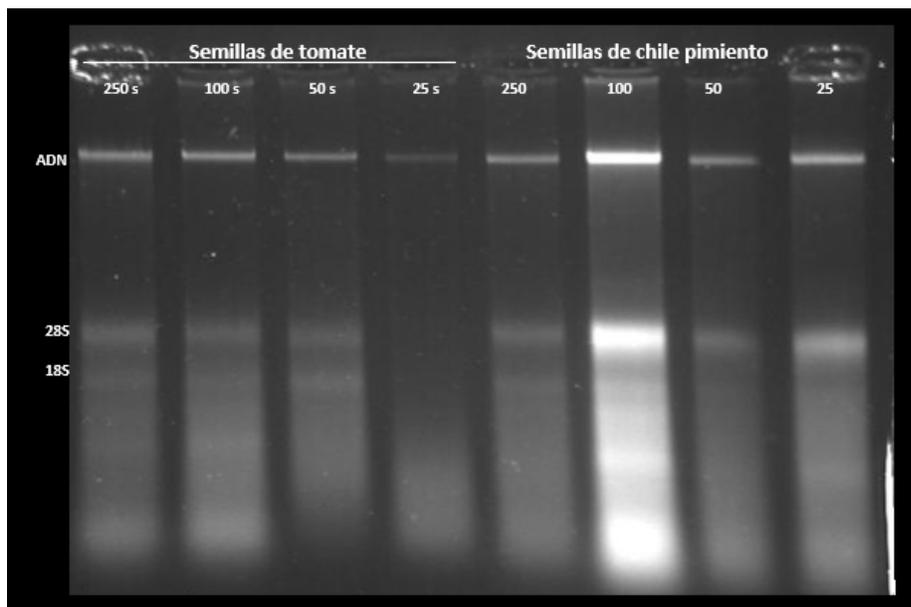
Figura 9: Integridad de ARN extraído por ambos métodos.



Leyenda: integridad del ARN según el método A) Columna. B) CTAB evaluados por electroforesis en geles de agarosa 1.33% a 85 voltios por 40 minutos.

Para determinar si se podría utilizar el método CTAB para extraer de grupos más pequeños de semillas, se realizó una electroforesis en agarosa de los grupos mencionados de ambas semillas (Fig. 10). Se puede observar las tres bandas correspondiente a ADN genómico, 28S y 18S. El grupo de 25 semillas de tomate muestra la banda de ADN genómico de forma tenue mientras que las correspondientes a ARN son imperceptibles.

Figura 10: Integridad de ARN extraído por CTAB de diferentes tamaños de grupos de semillas.

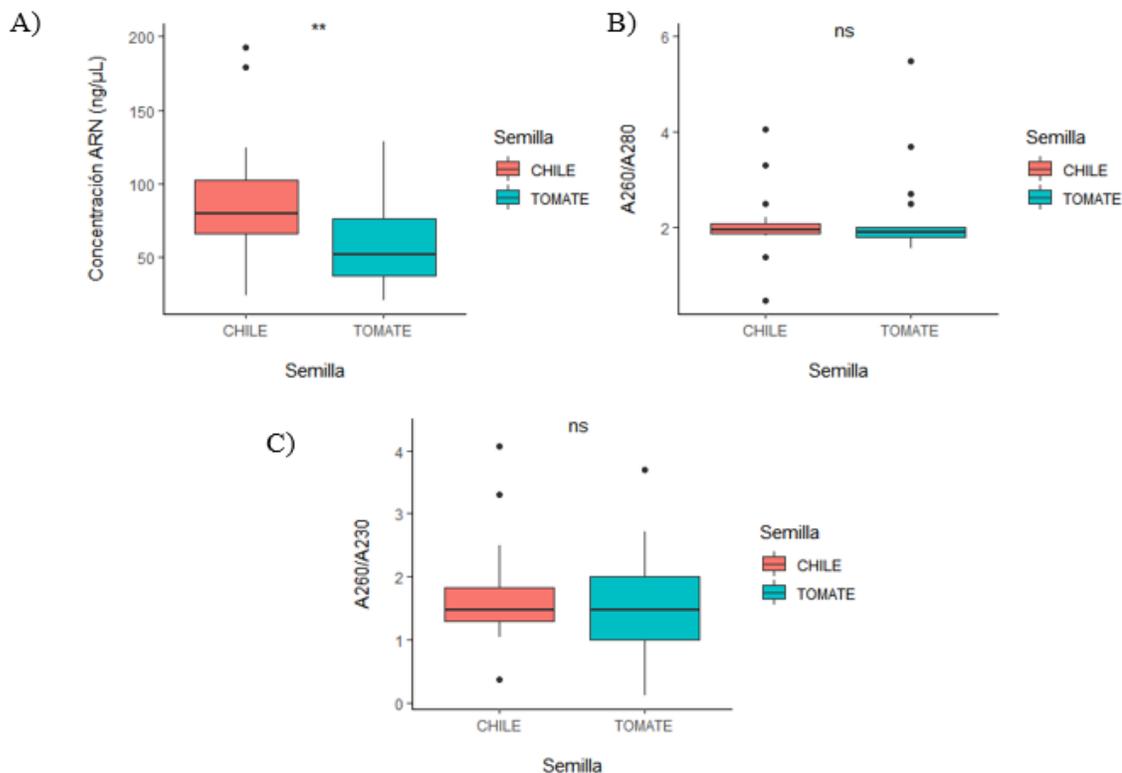


Descripción: electroforesis en gel de agarosa 1.33 % a 85 voltios por 40 minutos. Se muestran tres bandas: ADN genómico, 28S y 18S del ARN ribosomal de la semilla. Los números indicados en los carriles equivalen al número de semillas utilizadas en la extracción.

6.2. Pureza y concentración de ARN extraído por método CTAB

Dado la diferencia significativa entre métodos, se continuó evaluando el método que mejor resultados brindó: extracción por CTAB. Se evaluaron los mismos datos que fueron utilizados para la diferencia de medias entre métodos, sin embargo, se realizó la distinción entre tipos de semilla (Fig 11). El único parámetro que mostró una diferencia significativa fue la concentración con un valor-p de 0.0096. Los valores-p para las purzas fueron 0.46 y 0.73 para A260/A280 y A260/A230 respectivamente

Figura 11: Diferencia no significativa en parámetros de ARN según tipo de semillas utilizando método CTAB.



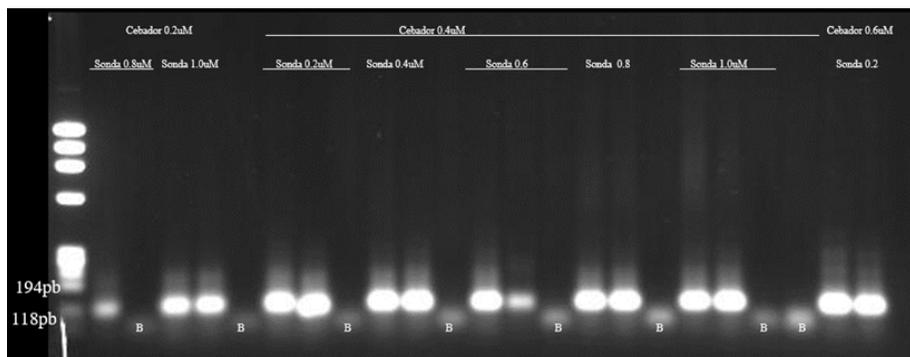
Leyenda: Parámetros evaluados según espectrofotometría y prueba estadística de Mann-Whitney-Wilcoxon. A) Concentración de ARN. B) Pureza A260/A280* (diferencia significativa mostrando mayor concentración de ARN por parte de semillas de Chile). C) Pureza A260/A230

La distribución de los datos es similar para ambos tipos de semillas, sin embargo, los datos de las semillas de tomate son más dispersos en la evaluación de purezas mientras que los datos de Chile son más dispersos en cuanto a concentración. Las medianas del único parámetro significativo fueron 79.9(36.2) y 51.3(39.1) ng/ μL para las semillas de Chile y tomate respectivamente.

6.3. Concentración de componentes de RT-qPCR

Se evaluó la concentración de cebadores y de sonda para cada marcador, sin embargo estas fueron cambiadas al realizar la validación individual de las pruebas con base en las eficiencias obtenidas.

Figura 12: Amplificación de producto no alterada por la concentración de Cebadores y sonda para marcador CP



Descripción: electroforesis en gel de agarosa 1.33% a 85 voltios por 40 minutos del control positivo del marcador CP utilizando distintas combinaciones de concentración de cebador y sonda. Se utilizaron las concentraciones de cebador de 0.2, 0.4 y 0.6uM, y 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0uM de sonda. B: control NTC.

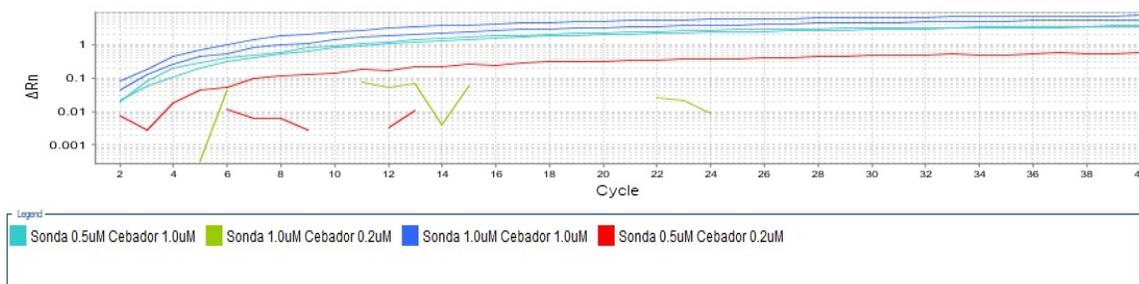
Se realizó una curva para las concentraciones de cebadores y sonda de la prueba para detectar CP (Fig. 12). Se hicieron duplicados utilizando el control positivo a una concentración de 1ug para cada prueba indicando con una B el blanco de cada prueba. Todas las pruebas mostraban frentes de corrida de menor tamaño al esperado y la banda correspondiente al tamaño esperado 150 pares de bases.

Cuadro 4: Similitud de valores Ct al alterar concentración de cebador y sonda de MP

Concentración cebador (μM)	Concentración sonda (μM)	Ct
0.2	0.5	5.36
0.2	1.0	-
1.0	0.5	5.0
1.0	1.0	4.8

Para la prueba de MP se realizó una curva de cebadores y sonda más simple siendo esta de 0.5uM o 1.0uM de ambos componentes (Cuadro. 4). Las combinaciones posibles fueron 0.5uM de sonda con 0.2 o 1.0uM de cebador, y 1.0uM de sonda con 0.2 o 1.0uM de cebador. El control positivo fue de 1ug. Solo las pruebas de sonda 1.0uM con 1.0uM de cebador, y 0.5uM de sonda con 1.0uM de cebador dieron resultados positivos en duplicado. La combinación de 0.5uM de sonda con 0.2uM de cebador solo amplificó una reacción, mientras que la reacción de 1.0uM de sonda con 0.2uM de cebador no amplificó ninguna. Esto puede verse de manera gráfica en la Figura 13.

Figura 13: Curva de amplificación de concentraciones de prueba MP.



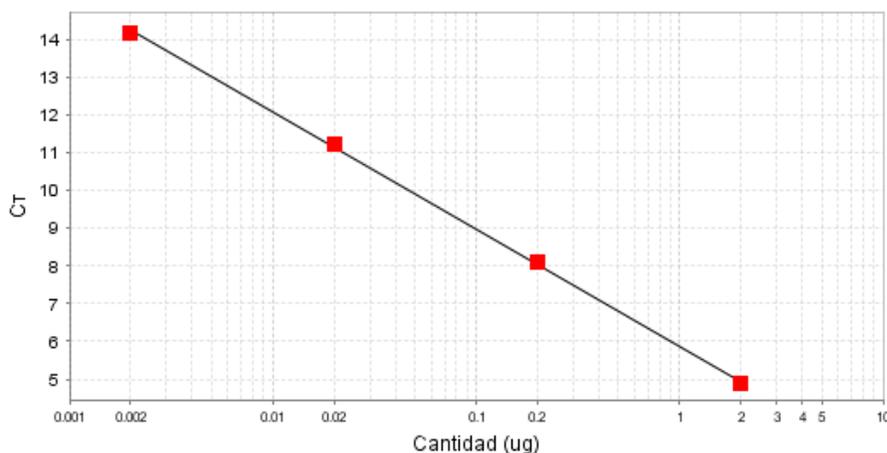
Descripción: amplificación del control positivo del marcador MP. Las combinaciones efectivas fueron las siguientes: 0.5uM de sonda con 1.0uM de cebador, 1.0uM de cebador con 1.0uM de sonda. Las otras combinaciones (0.5uM de cebador y 0.2uM de sonda no amplificaron en duplicado y no amplificó en absoluto respectivamente).

6.4. Validación de pruebas individuales RT-qPCR

6.4.1. Validación prueba para la detección del marcador de la proteína de la cápside (CP)

Se realizó una prueba con las concentraciones 0.5uM de cebador y 0.25uM de sonda y diluciones seriadas del control positivo partiendo de la concentración de 2ug. Las diluciones fueron 1:10 hasta llegar a 0.0002ug (Fig 14).

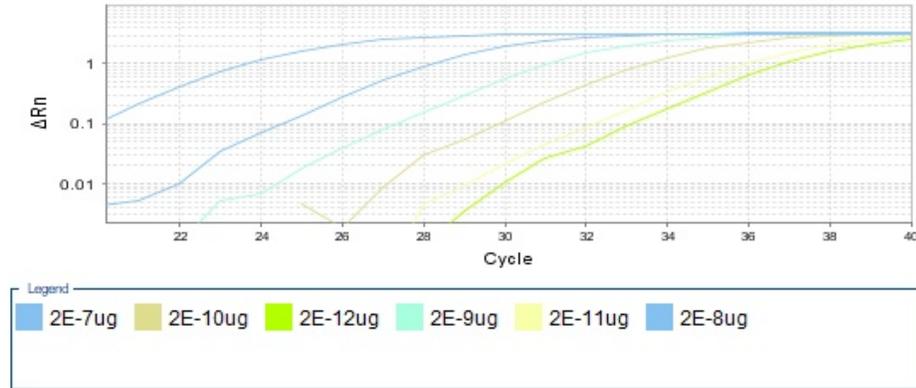
Figura 14: Estandarización de la prueba para CP.



El R^2 indica una regresión lineal de 1.0, la ecuación de la recta es $y = 5.885 - 3.094x$. Esto indica una eficiencia de 110.498%. Cabe mencionar que continuar con las diluciones aumenta la eficiencia ya que realizada a partir de 2×10^{-7} hasta 2×10^{-12} presenta una eficiencia de 170.238% y un espaciado

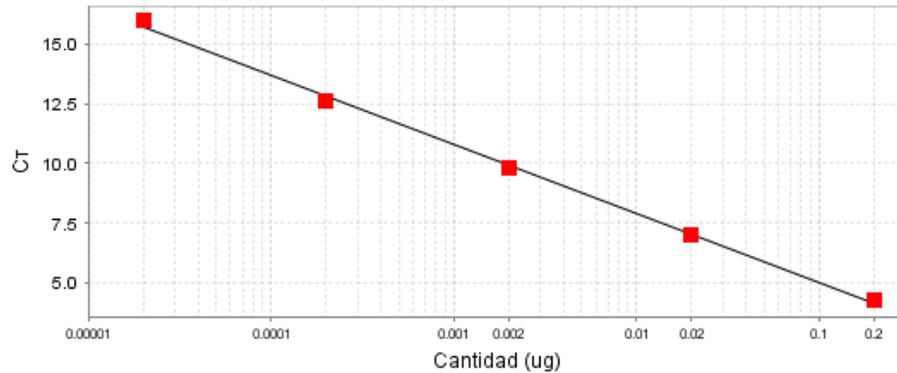
menor entre las curvas de amplificación (Fig 15). Además el ciclo de cuantificación 30 es sobrepasado con la dilución $2.0 \times 10^{-9} \text{ug}$

Figura 15: Curva de amplificación de diluciones seriadas a partir de 2×10^{-7} hasta $2 \times 10^{-12} \text{ug}$ de marcador CP



6.4.2. Validación prueba para la detección del marcador de la proteína de movimiento (MP)

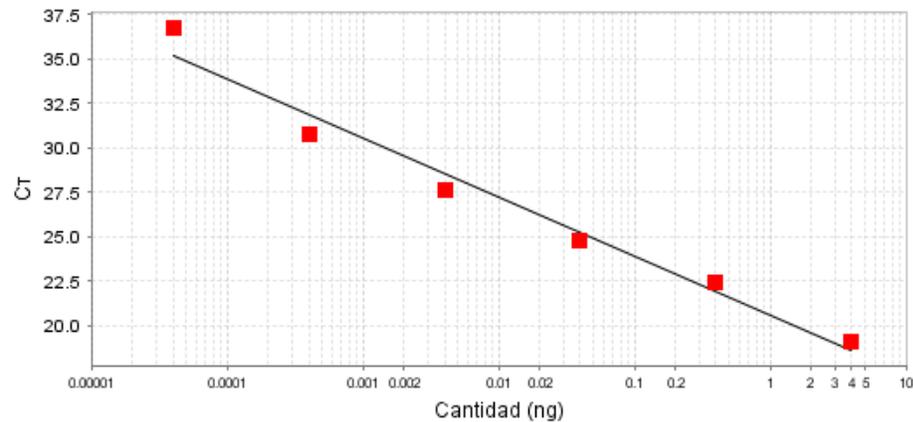
Figura 16: Validación de prueba para la detección de MP.



Se realizó una curva estándar partiendo de 0.2ug hasta 0.000002ug utilizando la concentración de cebadores de 0.5uM y de sonda de 0.25uM. El R^2 indica una regresión lineal de 0.998, la ecuación de la recta es $y = 2.118 - 2.896x$. Esto indica una eficiencia de 121.47% (Fig 16). La dilución de las muestras también afectó la eficiencia aumentando a 143.519% al partir de $2 \times 10^{-7} \text{ug}$, además que el ciclo de cuantificación traspasa los 30 ciclos con la dilución $2.0 \times 10^{-12} \text{ug}$.

6.4.3. Validación prueba para la detección del control interno *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)

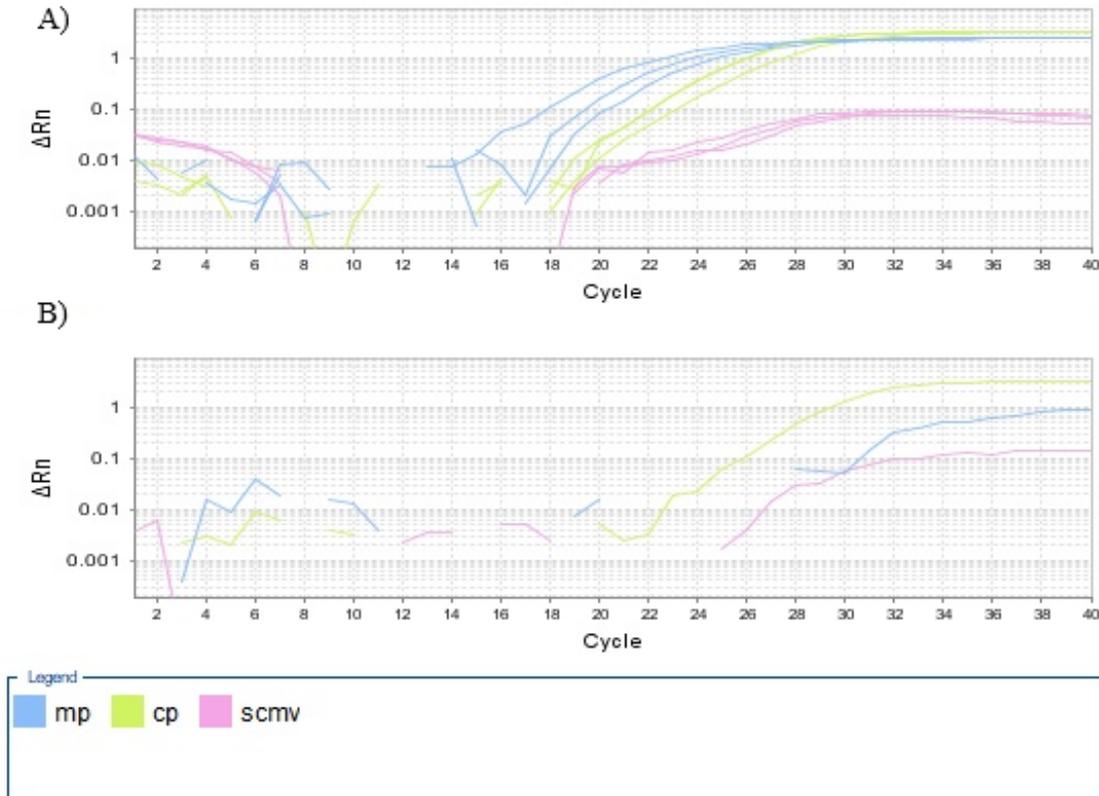
Figura 17: Validación de prueba de detección de SCMV.



La validación de la prueba para SCMV fue realizada con una curva partiendo de 4ng de ARN extraído por el método CTAB con una pureza de A260/A280 de 1.99 y A260/A230 de 2.07. La concentración de cebadores y sondas fue de 0.2uM para ambos componentes. La ecuación de la recta fue $y = 20.607 - 3.32x$ con un R^2 de 97.3 y una eficiencia de 100.097%. Se realizó una curva estándar utilizando ARN total extraído de una planta de cardamomo positiva para SCMV (Herrera, Dubón, y Palmieri, 2021) partiendo desde 4ng hasta 4.0×10^{-5} ng utilizando las concentraciones de cebadores de 0.5uM y de sonda de 0.25uM sin embargo la eficiencia de esta prueba fue de 228.515% (Fig 17). En este caso, las reacciones más diluidas 4.0×10^{-5} y 4.0×10^{-4} ng presentaron el mismo Ct similares siendo 31.8 y 31.31 respectivamente.

6.4.4. Prueba RT-qPCR múltiple

Figura 18: Amplificación de los tres marcadores en una misma reacción para la detección de ToBRFV y su control interno.



Descripción: A) Controles positivos de la reacción múltiple en duplicado. B) Controles negativos (NTC) de la reacción múltiple. Cada marcador se encuentra identificado por color siendo azul MP, verde CP y rosa SCMV.

Bajo las condiciones previamente establecidas se realizó una prueba múltiple (Fig 18). Con esta prueba se establecieron los límites de detección en la reacción múltiple. Se estableció que las muestras con un Ct de valores mayores o iguales a 28.50, 30.81 y 28.00 para CP, MP y SCMV respectivamente serán reevaluadas para ser tomadas como negativas. La prueba bajo las condiciones establecidas detecta hasta 4.0×10^{-4} ng de SCMV, 2.0×10^{-6} ug de MP y 2.0×10^{-5} ug de CP.

Análisis de resultados

Se realizó este trabajo con el fin de estandarizar un método de detección de *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* mediante el uso de RT-qPCR con sondas TaqMan®. Para cumplir con esto se comparó métodos de extracción de ARN de semillas, se optimizó la mezcla de reacción de RT-qPCR y se validó de forma individual y múltiple los cebadores y sondas utilizados.

La comparación de métodos se basó en el análisis de concentración y pureza del ARN extraído evaluado por espectrofotometría. Las pruebas de Wilcoxon indican que existió una diferencia significativa en los tres parámetros evaluados (Fig 6,7,8). De los valores de pureza, la razón A260/A280 del método de CTAB cumple con las expectativas de 2.1 al tomar en cuenta la media de 2.14 indicando que es ARN (Viljoen, 2005). El rango Intercuartil de 0.22 también indica que la mayoría de datos se conglomeran cercano a 1.91 indicando que no hay mucha distribución de datos. En cuanto a la razón A260/A230 ninguno de los métodos cumple el rango establecido de 1.8-2.2, sin embargo las extracciones realizadas con el método CTAB son las que se acercan mayormente a este valor con 1.6 de media y mediana de 1.47. Esto indica contaminación de sales, carbohidratos y fenoles (Johnson y cols., 2012). Dado que el método de purificación utilizado en la extracción de CTAB implica uso de fenol, esto es concordante con los resultados. Existen diversas fuentes que indican que contaminantes por fenol pueden inhibir o alterar los resultados de una reacción PCR (Cirera, 2013; Popova, Martin, y Morgavi, 2010); sin embargo se ha reportado que el fenol puede cambiar el ciclo de cuantificación levemente, mas no ser un cambio relevante si la contaminación es menor a 0.02% de la muestra. El cambio de Ct en una reacción con una contaminación menor a 0.02% puede ser de 3.0 Ct lo que puede llevar a falsos negativos, sin embargo esto es correlacional a la cantidad de ARN en la reacción por lo que varía (Unger, Lokmer, Lehmann, y Axmann, 2019).

La extracción y purificación por columna es un método que ha dado buenos resultados en cuanto a concentración y pureza de ARN y es recomendado (ISHI-Veg, 2019; Siles, Eastmond, y Kurup, 2020). Una práctica muy utilizada por la dificultad de extraer de semillas por diferentes componentes es la combinación de método de extracción utilizando tampones CTAB y purificación por columnas (De Wever y cols., 2020; Jordon-Thaden, Chanderbali, Gitzendanner, y Soltis, 2015; Sangha, Gu, Kaur, y Yin, 2010) por lo que esta puede ser una solución para mejorar tanto la concentración y pureza de los métodos, sin embargo esto último aumentaría gastos monetarios. Por otro lado, se podría incrementar el volumen utilizado para la extracción de ARN por columna dado que se utilizó menos que el recomendado por el fabricante (PROMEGA, 2018), sin embargo, esto implicaría alterar

el procedimiento solicitado por la Unión Europea (of the European Union, 2020).

El método de CTAB también demostró ser útil para extraer el ARN de grupos de menor tamaño de semillas (Fig 10) indicando que se puede proponer una alternativa a las estipulaciones de la Unión Europea para pequeños exportadores. Al comparar el método de extracción por CTAB entre las fuentes de semillas (Fig 11), no se esperaba ver un cambio por lo que la falta de diferencia significativa es ideal. El único parámetro diferente fue la concentración; sin embargo esto se puede deber a la diferencia en el tamaño de la semilla. El promedio de pesaje de 250 semillas de tomate fue 0.6400 ± 0.0002 g y el de Chile pimiento fue de 1.70 ± 0.00 g por lo que se puede relacionar el tamaño con la cantidad de ARN contenido en la semilla (Birtić y Kranner, 2006; Siles y cols., 2020).

En cuanto a las reacciones de RT-qCPR es importante mencionar la importancia del uso de ambos cebadores para el virus ToBRFV ya que al ser un virus de ARN este puede tener altas tasas de mutación por lo que la eficiencia de detección puede disminuir en alguno de los marcadores (Maayan y cols., 2018; Nayar y cols., 2021). Las concentraciones de cebadores y sondas utilizadas, se pueden observar en las Figuras 12 y 13 junto con el Cuadro 4 que 1 µg del control positivo puede ser detectado a diferentes concentraciones de los componentes de la reacción de CP y MP. Sin embargo, como la Figura 12 demuestra en la curva de amplificación, estas pueden ser una línea no definida e indicar ruido en segmentos, esto se debe a una concentración de sonda o cebador elevada que provoca que el ruido de fondo este interfiriendo (Technologies, 2011; Keer, 2008). La concentración utilizada para las validaciones de MP y CP fue tomada del Manual de Tecnologías de PCR (Aldrich, 2014). En ambos casos la eficiencia aumenta conforme se diluyó la muestra. Una alta eficiencia ($>130\%$) indica inhibidores de la polimerasa que alteran los Ct evaluados (Gunstream y cols., 2020). Sin embargo, ya que la eficiencia es la razón del número de moléculas diana amplificadas por ciclo, este valor es afectado tanto por concentraciones muy diluidas como por concentraciones muy altas ya que en ambos casos la eficiencia de la polimerasa disminuye con el pasar de los ciclos por lo que afecta si el Ct se da de forma tardía o temprana (Adams, 2020; Keer, 2008; Aldrich, 2014).

La validación de la prueba individual para la detección de SCMV (Fig 17) implica una manera de asegurar que durante la extracción el ARN no sea degradado. Además, indica que la extracción es efectiva en virus de ARN y que este no contenga contaminantes que inhiban la reacción completamente y que la cantidad de templado añadida es suficiente (ISHI-Veg, 2019; Osman, Hodzic, Kwon, Wang, y Vidalakis, 2015). Cabe mencionar que el ARN utilizado fue ARN total de una planta catalogada como positiva por un estudio previo (Herrera y cols., 2021) por lo que los valores de concentración no expresan la cantidad de material genético de SCMV por lo que es necesario determinar por otros métodos como RT-qPCR utilizando genes constitutivos para extrapolar carga viral (Baek, Yoon, y Palukaitis, 2017; Gadiou y Kundu, 2012).

La prueba múltiple presentó la amplificación de los tres marcadores el $Ct < 25$. Se estableció que la amplificación del control negativo (NTC) es común a pesar de utilizar el método de sondas TaqMan® ya que esto puede indicar que existen estructuras secundarias en alguno de los componentes que provocan la detección de fluorescencia (Aldrich, 2014).

1. Se estableció un método de detección de *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* en semillas utilizando extracción de ARN utilizando CTAB-fenol-cloroformo dado la mejor concentración y pureza, y RT-qPCR con control interno de SCMV.
2. Según los resultados obtenidos, el método de extracción de ARN por CTAB-Fenol-Cloroformo brinda resultados significativamente mejores en términos de integridad, pureza y concentración.
3. Se estableció que las concentraciones finales de los componentes debe ser 0.5uM para los cebadores de los marcadores CP y MP, 0.2uM para los cebadores de SCMV, 0.25uM para las sondas de CP y MP y 0.2uM para la sonda de SCMV.
4. Se validó la reacción individual de los marcadores MP y CP utilizando oligos sintéticos siendo las eficiencias de 121 % y 110 % para MP y CP respectivamente.
5. Se validó la reacción de SCMV utilizando ARN total de una planta contaminada siendo la eficiencia 100 %.
6. Se determinaron, con base en las curvas estándar de validación, los límites de detección para los marcadores de CP, MP y SCMV siendo 2×10^{-5} ug, 2×10^{-7} ug, y 4×10^{-4} ng respectivamente. Estas concentraciones corresponden a oligos sintéticos de los marcadores MP y CP y a ARN total de una planta infectada de SCMV.
7. Se determinó, según las curvas estándar de validación, que un Ct menor a 25 corresponde a un resultado positivo para las pruebas realizadas.
8. Se realizó un RT-qPCR múltiple sin intervención entre marcadores para la detección de ToBRFV utilizando como control interno SCMV.
9. Se determinó que la amplificación del control negativo NTC al sobrepasar el Ct de 29 es común en este ensayo.

Recomendaciones

1. Se recomienda evaluar la posibilidad de combinar métodos de extracción y purificación de ARN con el fin de obtener muestras más concentradas pero con menor cantidad de contaminantes teniendo en cuenta que puede implicar mayores costos para el laboratorio.
2. Dada la sensibilidad de la prueba, se recomienda siempre evaluar el ciclo de cuantificación del NTC en cada ensayo para determinar si no hubo contaminación de la reacción.
3. Se recomienda establecer controles positivos de ARN para los marcadores de MP y CP, ya que los utilizados fueron de ADN sintético para evaluar si las curvas de amplificación disminuyen su ΔR_n y asimismo establecer los límites de detección.

Referencias

- Adams, G. (2020, junio). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48–53. doi: 10.1042/BIO20200034
- Aldrich, S. (2014). *A Technical Guide PCR TECHNOLOGIES* [https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/197/153/pcr-technologies-guide.pdf].
- Anderson, D. R., y Sweeney, D. J. (2011). *Statistics for business and economics* (11e [ed.] ed.). Australia ; Mason, Ohio: South-Western Cengage Learning.
- Baek, E., Yoon, J.-Y., y Palukaitis, P. (2017). Validation of reference genes for quantifying changes in gene expression in virus-infected tobacco. *Virology*, 520(1). doi: 10.1016/j.virol.2017.06.029
- BioRad. (s.f.). *Five Steps to Great One-Step Multiplex RT-qPCR | Bioradiations*. Descargado de <https://www.bioradiations.com/do-more-with-less-five-steps-to-great-results-using-one-step-multiplex-rt-qpcr/>
- Bio-Rad. (s.f.). *qPCR Assay Design and Optimization | LSR*. Descargado de <https://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/qpcr-assay-design-optimization?ID=LUS07RIVK#6>
- Birtić, S., y Kranmer, I. (2006, mayo). Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds. *Phytochemical Analysis*, 17(3), 144–148. doi: 10.1002/pca.903
- Cambrón-Crisantos, J. M., Rodríguez-Mendoza, J., Valencia-Luna, J. B., Alcasio-Rangel, S., García-Ávila, C. d. J., López-Buenfil, J. A., y Ochoa-Martínez, D. L. (2018). Primer reporte de Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1). doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Cirera, S. (2013, diciembre). Highly efficient method for isolation of total RNA from adipose tissue. *BMC Research Notes*, 6(1), 472. doi: 10.1186/1756-0500-6-472
- Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., y Panno, S. (2020). Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. *Plants*, 9(11), 1615. doi: 10.3390/plants9111615
- de Agricultura Ganadería y Alimentación, M. (2017). *Chile pimienta en cifras* [MAGA]. Descargado de <https://precios.maga.gob.gt/archivos/agro-en-cifras/individuales/Chile%20pimienta%20Agro%20en%20Cifras%202016.pdf>
- de Economía Guatemala, M. (2018). *Guatemala: Agrícola. El tomate*. Descargado de https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/infografia_tomate.pdf

- De Wever, J., Tulkens, D., Verwaeren, J., Everaert, H., Rottiers, H., Dewettinck, K., ... Messens, K. (2020, junio). A Combined RNA Preservation and Extraction Protocol for Gene Expression Studies in Cacao Beans. *Frontiers in Plant Science*, 11, 992. doi: 10.3389/fpls.2020.00992
- Dombrovsky, A., y Smith, E. (2017, diciembre). Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. En J. C. Jimenez-Lopez (Ed.), *Advances in Seed Biology*. InTech. doi: 10.5772/intechopen.70244
- Enza Zaden, B. (2019). Detection of infectious Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) in tomato and pepper seed. *ISHI-Veg*.
- EPPO-Global-Database. (s.f.). *Tomato brown rugose fruit virus(ToBRFV)*. Descargado de <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution>
- Farrell, R. E. (2010). *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization* (4th ed ed.). Amsterdam: Elsevier, Academic.
- Gadiou, S., y Kundu, J. K. (2012). Evaluation of reference genes for the relative quantification of apple stem grooving virus and apple mosaic virus in apple trees. *Indian Journal of Virology*, 23(1). doi: 10.1007/s13337-012-0065-4
- Gunstream, S., Hellemans, J., Lewis, L., Menezes, A., Owens, B., Rose, S., ... Vandesopele, J. (2020). *Real-time qPCR guide: Part 2—assay validation and data analysis*. IDT.
- Hernández-Guzmán, K., y Guzmán, C. (2013). Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de Solanum tuberosum Grupo Phureja. (1), 11.
- Herrera, M., Dubón, A., y Palmieri, M. (2021). Diversidad de microorganismos patógenos asociados al cardamomo (*Ellettaria cardamomum* L.) en alta verapaz y quiché. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*(41).
- ISHI-Veg. (2019). *Detection of Infectious Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Tomato and Pepper Seed*. Descargado de https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/09/Tomato-ToBRFV_2019.09.pdf
- Jimenez-Lopez, J. C. (2017). *Advances in Seed Biology*. S.l.: IntechOpen.
- Johnson, M. T. J., Carpenter, E. J., Tian, Z., Bruskiwich, R., Burris, J. N., Carrigan, C. T., ... Wong, G. K.-S. (2012, noviembre). Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS ONE*, 7(11), e50226. doi: 10.1371/journal.pone.0050226
- Jones, R. A. C. (2021). Global Plant Virus Disease Pandemics and Epidemics. *Plants*, 10(2), 233. doi: 10.3390/plants10020233
- Jordon-Thaden, I. E., Chanderbali, A. S., Gitzendanner, M. A., y Soltis, D. E. (2015, mayo). Modified CTAB and TRIzol protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Applications in Plant Sciences*, 3(5), 1400105. doi: 10.3732/apps.1400105
- Keer, J. T. (2008). Chapter 7. Quantitative Real-time PCR Analysis. En J. T. Keer y L. Birch (Eds.), *Essentials of Nucleic Acid Analysis* (pp. 132–166). Cambridge: Royal Society of Chemistry. doi: 10.1039/9781847558213-00132
- Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W.-S., y Hughes, J. d. (2014). Virus Diseases of Peppers (*Capsicum* spp.) and Their Control. En *Advances in Virus Research* (Vol. 90, pp. 297–354). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8
- Klap, C., Luria, N., Smith, E., Bakelman, E., Belausov, E., Laskar, O., ... Dombrovsky, A. (2020, mayo). The Potential Risk of Plant-Virus Disease Initiation by Infected Tomatoes. *Plants*, 9(5), 623. doi: 10.3390/plants9050623
- Klap, C., Luria, N., Smith, E., Hadad, L., Bakelman, E., Sela, N., ... Dombrovsky, A. (2020, agosto). Tomato Brown Rugose Fruit Virus Contributes to Enhanced Pepino Mosaic Virus Titers in Tomato Plants. *Viruses*, 12(8), 879. doi: 10.3390/v12080879
- Kumar, S., Udaya Shankar, A., Nayaka, S., Lund, O., y Prakash, H. (2011, septiembre). Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR: Detection of TMV and ToMV in pepper and tomato. *Letters in Applied Microbiology*, 53(3), 359–363. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03117.x
- Levitzky, N., Smith, E., Lachman, O., Luria, N., Mizrahi, Y., Bakelman, H., ... Dombrovsky, A. (2019, enero). The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown

- rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210871. doi: 10.1371/journal.pone.0210871
- Locali, E. C., Freitas-Astua, J., de Souza, A. A., Takita, M. A., Astua-Monge, G., Antonioli, R., ... Machado, M. A. (2003, noviembre). Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas. *Plant Disease*, *87*(11), 1317–1321. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.11.1317
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., ... Dombrovsky, A. (2017, enero). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLOS ONE*, *12*(1), e0170429. doi: 10.1371/journal.pone.0170429
- Maayan, Y., Pandaranayaka, E. P. J., Srivastava, D. A., Lapidot, M., Levin, I., Dombrovsky, A., y Harel, A. (2018). Using genomic analysis to identify tomato Tm-2 resistance-breaking mutations and their underlying evolutionary path in a new and emerging tobamovirus. *Archives of Virology*, *163*(7), 1863–1875. doi: 10.1007/s00705-018-3819-5
- Malapi-Wight, M., Adhikari, B., Zhou, J., Hendrickson, L., Maroon-Lango, C. J., McFarland, C., ... Hurtado-Gonzales, O. P. (2021). Hts-based diagnostics of sugarcane viruses: Seasonal variation and its implications for accurate detection. *Viruses*, *13*(8), 1627.
- Nayar, G., Seabolt, E. E., Kunitomi, M., Agarwal, A., Beck, K. L., Mukherjee, V., y Kaufman, J. H. (2021). Analysis and forecasting of global real time RT-PCR primers and probes for SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, *11*(1), 8988. doi: 10.1038/s41598-021-88532-w
- of the European Union, O. J. (2020). Commission Implementing Regulation (EU) 2020/1191 of 11 August 2020 establishing measures to prevent the introduction into and the spread within the Union of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) and repealing Implementing Decision (EU) 2019/1615. , *12.8.2020*(L 262), 6–13. Descargado de https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2020/1191/oj
- Oladokun, J. O., Halabi, M. H., Barua, P., y Nath, P. D. (2019). Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology*, *68*(9), 1579–1586. doi: 10.1111/ppa.13096
- Osman, F., Hodzic, E., Kwon, S.-J., Wang, J., y Vidalakis, G. (2015). Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative pcr (rt-qpcr) assay for the rapid detection of citrus tristeza virus, citrus psorosis virus, and citrus leaf blotch virus. *Journal of virological methods*, *220*, 64–75.
- Panno, S., Caruso, A. G., Barone, S., Lo Bosco, G., Rangel, E. A., y Davino, S. (2020, junio). Spread of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Sicily and Evaluation of the Spatiotemporal Dispersion in Experimental Conditions. *Agronomy*, *10*(6), 834. doi: 10.3390/agronomy10060834
- Panno, S., Ruiz-Ruiz, S., Caruso, A. G., Alfaro-Fernandez, A., Font San Ambrosio, M. I., y Davino, S. (2019). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of Tomato brown rugose fruit virus and comparison with other techniques. *PeerJ*, *7*, e7928. doi: 10.7717/peerj.7928
- Poon, N. K., Othman, R. Y., Mebus, K., y Teo, C. H. (2019, octubre). Optimization of CTAB-based RNA Extraction for in planta *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Gene Expression Study. *Sains Malaysiana*, *48*(10), 2125–2133. doi: 10.17576/jsm-2019-4810-07
- Popova, M., Martin, C., y Morgavi, D. P. (2010, julio). Improved protocol for high-quality Co-extraction of DNA and RNA from rumen digesta. *Folia Microbiologica*, *55*(4), 368–372. doi: 10.1007/s12223-010-0060-3
- PROMEGA. (2018). *SV Total RNA Isolation System*. Descargado de <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/sv-total-rna-isolation-system/?catNum=Z3101>
- PROMEGA. (2020). *GoTaq® Probe 1-Step® RT-qPCR System*. Descargado de <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/sv-total-rna-isolation-system/?catNum=Z3101>
- Rubio-Piña, J. A., y Zapata-Pérez, O. (2011, septiembre). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, *14*(5). doi: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-10
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., y Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting

- tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*, 161(2), 503–506. doi: 10.1007/s00705-015-2677-7
- Sangha, J. S., Gu, K., Kaur, J., y Yin, Z. (2010, diciembre). An improved method for RNA isolation and cDNA library construction from immature seeds of *Jatropha curcas* L. *BMC Research Notes*, 3(1), 126. doi: 10.1186/1756-0500-3-126
- Sastry, K. S. (2013). *Seed-borne plant virus diseases*. India: Springer India. doi: 10.1007/978-81-322-0813-6
- Siles, L., Eastmond, P., y Kurup, S. (2020, diciembre). Big data from small tissues: extraction of high-quality RNA for RNA-sequencing from different oilseed Brassica seed tissues during seed development. *Plant Methods*, 16(1), 80. doi: 10.1186/s13007-020-00626-0
- Techologies, B. (2011). *qPCR troubleshooting: interpreting amplification curves and diagnosing problems*. Descargado de <http://blog.biotech.com/thebiotechblog/bid/63622/qpcr-troubleshooting>
- Unger, C., Lokmer, N., Lehmann, D., y Axmann, I. M. (2019, abril). Detection of phenol contamination in RNA samples and its impact on qRT-PCR results. *Analytical Biochemistry*, 571, 49–52. doi: 10.1016/j.ab.2019.02.002
- Viljoen, G. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. doi: 10.1007/1-4020-3404-0
- Wang, L., y Stegemann, J. P. (2010, marzo). Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31(7), 1612–1618. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.024
- Zinger, A., Lapidot, M., Harel, A., Doron-Faigenboim, A., Gelbart, D., y Levin, I. (2021, enero). Identification and Mapping of Tomato Genome Loci Controlling Tolerance and Resistance to Tomato Brown Rugose Fruit Virus. *Plants*, 10(1), 179. doi: 10.3390/plants10010179

