

Secuenciamiento de alto rendimiento (HTS) para la detección de patógenos vegetales: Implicancias y desafíos

G. Müller & J. Kreuze

Lima, agosto 31 2018

La "secuenciación de alto rendimiento" o HTS (por sus siglas en inglés), es una colección de técnicas de secuenciación genética que mejoran el proceso de secuenciación original de Sanger. Estos métodos de secuenciación de ADN y ARN utilizan procesos paralelos masivos para trabajar de manera más rápida y rentable que el método Sanger.

1ra –generación de tecnología de secuenciación (1977)

Método SANGER

Next-generation sequencing technology (NGS) (2005)

Technologías Basadas en PCR

Technologías de Secuenciación de moléculas únicas (SMS)



Roche 454 GS-FLX



Roche GS-Junior



Illumina MySeq



Illumina HiSeq 2000



Applied Biosystems (SOLiD) 5500xl Genetic Analyzer



Ion-Torrent Sequencing

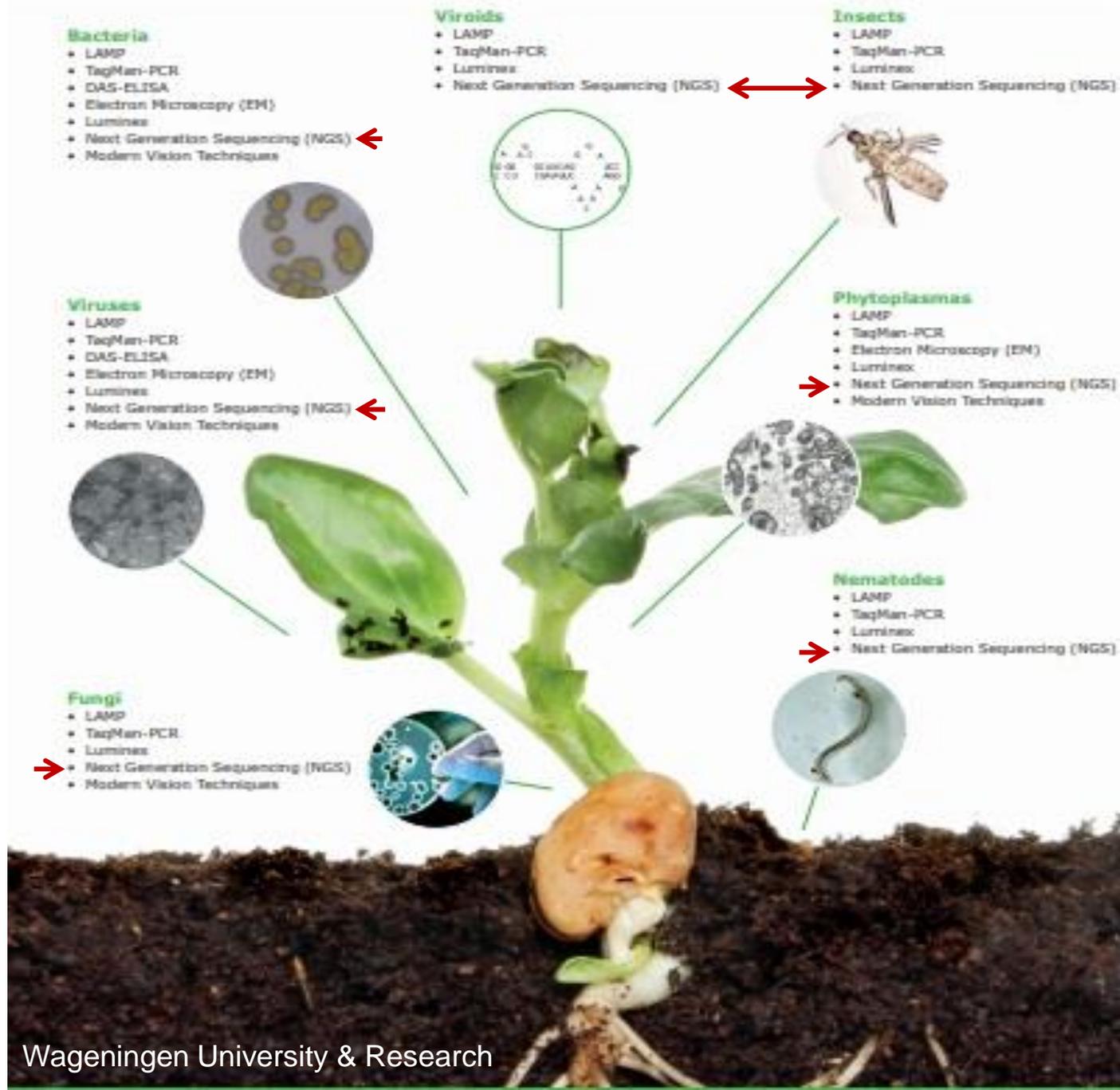


(Shokralla et al 2012)

Las tecnologías HTS utilizan una química bastante diversa, sin embargo, comparten 2 pasos principales:

- fragmentación de librería / preparación de librería a partir de un amplicon.
- detección de nucleótidos incorporados.

Plataformas para detección de Patógenos vegetales





Rapid Communication

Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses

Jan F. Kreuze ^{a,d,*}, Ana Perez ^c, Milton Untiveros ^a, Dora Quispe ^a, Segundo Fuentes ^c, Ian Barker ^c, Reinhard Simon ^b

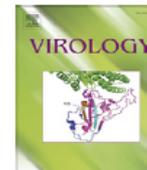
MOLECULAR PLANT PATHOLOGY

DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00545.X

Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology

IAN P. ADAMS^{1,*}, RACHEL H. GLOVER¹, WENDY A. MONGER¹, RICK MUMFORD¹, ELENA JACKEVICIENE², MELETELE NAVALINSKIENE³, MARIJA SAMUITIENE³ AND NEIL BOONHAM¹

Virology 387 (2009) 395–401

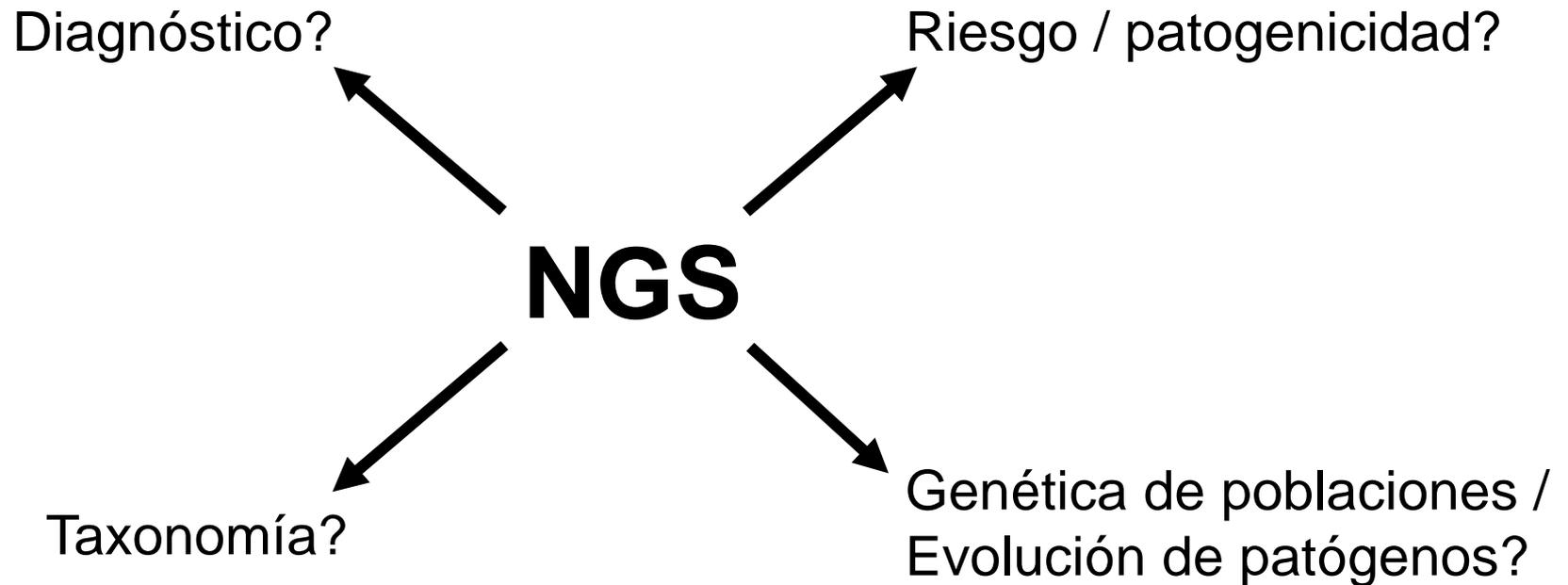


Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus

M. Al Rwahnih, S. Daubert, D. Golino, A. Rowhani ^{*}

✓ **Amplia y gran adopción de etiología: desde 2009, >100 nuevos virus y 300+ publicaciones**

Aplicaciones



Hay una necesidad de colaboración internacional para manejar los desafíos de integrar HTS en el estudio de virus de plantas, diagnóstico y evaluación de riesgos

Taxonomía?

CONSENSUS STATEMENT

OPEN

CONSENSUS STATEMENT

Virus taxonomy in the age of metagenomics

Peter Simmonds¹, Mike J. Adams², Mária Benkő³, Mya Breitbart⁴, J. Rodney Brister⁵, Eric B. Carstens⁶, Andrew J. Davison⁷, Eric Delwart^{8,9}, Alexander E. Gorbalenya^{10,11}, Balázs Harrach³, Roger Hull^{12}, Andrew M.Q. King¹³, Eugene V. Koonin⁵, Mart Krupovic¹⁴, Jens H. Kuhn¹⁵, Elliot J. Lefkowitz¹⁶, Max L. Nibert¹⁷, Richard Orton⁷, Marilyn J. Roossinck¹⁸, Sead Sabanadzovic¹⁹, Matthew B. Sullivan²⁰, Curtis A. Suttle^{21,22}, Robert B. Tesh²³, René A. van der Vlugt²⁴, Arvind Varsani²⁵ and F. Murilo Zerbini²⁶*



Se incorporarán secuencias metagenómicas (es decir, virus de secuencia única) para la clasificación taxonómica

HTS Puede ser usada para Diagnóstico?

❖ Retos Técnicos

- Protocolo de Laboratorio?
- Algoritmos bioinformáticos?

❖ Evaluación de desempeño

- Sensibilidad, variabilidad?
- Especificidad?
- Reproducibilidad?
- Repetibilidad?



OPINION
published: 27 August 2018
doi: 10.3389/fpls.2018.01082

❖ Análisis rutinario

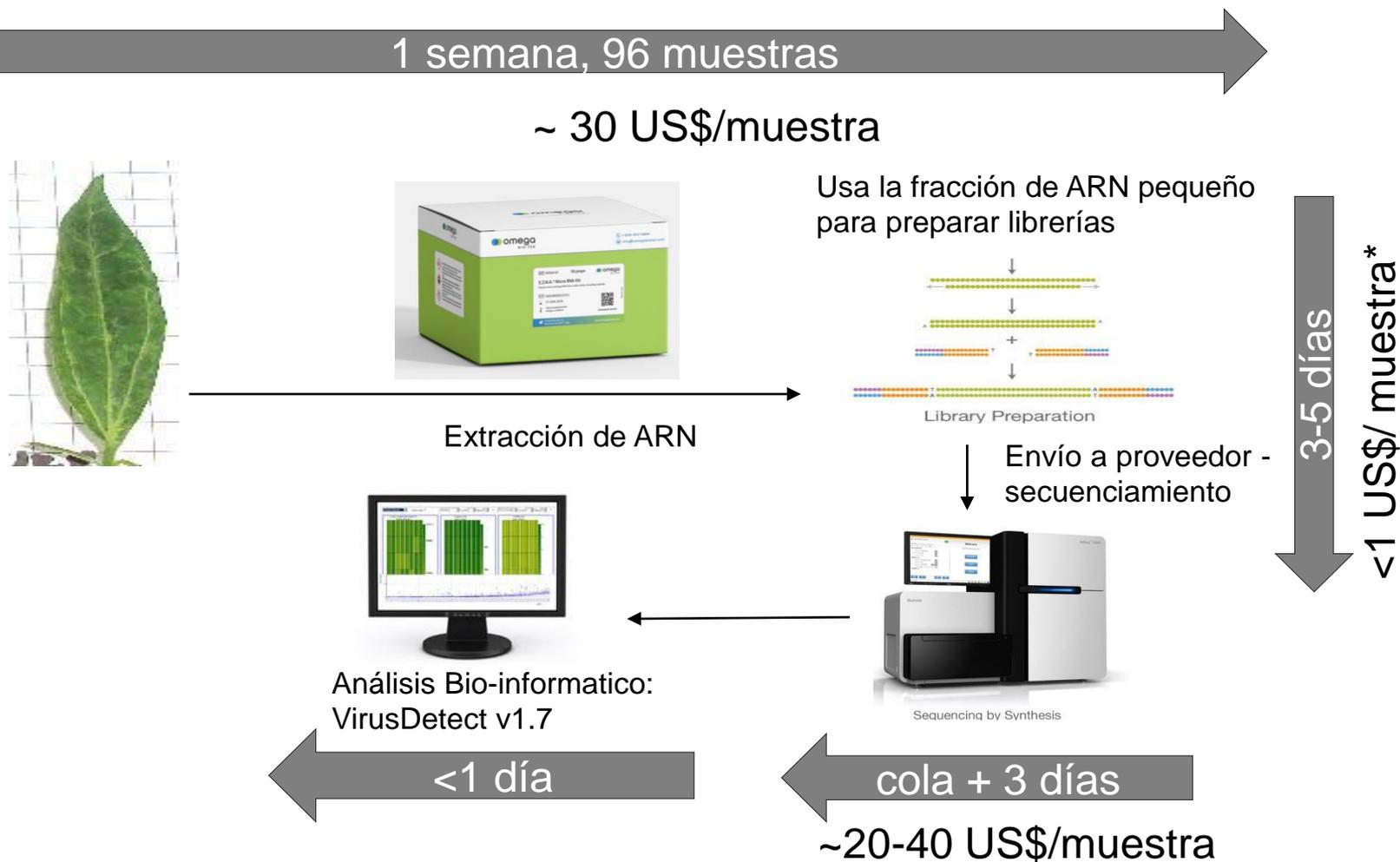
- Contaminación?



Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges

Hans J. Maree^{1,2*}, Adrian Fox³, Maher Al Rwahnih⁴, Neil Boonham⁵ and Thierry Candresse⁶

Protocolo de laboratorio



Validación de sRSA a pequeña escala para la detección rutinaria de virus en papa: comparativo lado a lado con la indexación estándar de virus

Library ID	Sample (CIP number)	Country	Standard Indexing (from potato and/or indicator plants grown in greenhouse)	sRSA ⁴ (from <i>in vitro</i> potato plant extractions)	PCR confirmation (from <i>in vitro</i> potato plant extractions)
GAF318-1	706735	Argentina	PVX ^{1,2,3}	PVX, PVA ⁵	PVX, PVA
GAF318-2	396009.258	Peru	-	-	-
GAF318-3	703471	Peru	PVS ¹	PVS	PVS
GAF318-4	705268	Ecuador	PLRV ¹ , PVX ^{1,2,3}	PLRV, PVX	PLRV, PVX
GAF318-5	700744	Peru	PVS ^{1,2,3} , PVT ¹	PVS, PVT	PVS, PVT
GAF318-6	706851	Peru	PVX ^{2,3} , PVS ¹	PVX, PVS, PVT	PVX, PVS, PVT
GAF318-7	703518	Colombia	PVS ¹	PVS	PVS
GAF318-8	704832	Bolivia	PLRV ³ , APLV ^{1,3} , PVX ³	PLRV, APLV, PVT	PLRV, APLV, PVT
GAF318-9	703573	Colombia	-	-	-
GAF318-10	308328.32	Peru	-	-	-
GAF318-11	398098.20	Peru	-	-	-
GAF318-12	396272.12	Peru	PVS ^{1,3}	PVS	PVS
GAF318-13	396063.1	Peru	PLRV ³	PLRV	PLRV
GAF318-14	598198.4	Peru	-	-	-
GAF318-15	304413.45	Peru	-	-	-
GAF318-16	393046.7	Peru	PVX ^{1,2,3} , PVS ^{1,2}	PVX, PVS	PVX, PVS

- ✓ Indexado estándar- métodos de diagnóstico complementario: ELISA, Bioensayo y NASH / PCR
- ✓ Prueba de ELISA del indexado solo para virus comunes en región andina (no incluye PVA ni PVM)
- ✓ Bioensayo (Rango de hospederos) permite detección de virus transmitidos mecánicamente y por injerto pero no distinguirlos en infecciones mixtas (caso GAF318-1)

REVIEWS

 APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING

Reference standards for next-generation sequencing

Simon A. Hardwick^{1,2}, Ira W. Deveson^{1,3} and Tim R. Mercer^{1,2,4}

CAP Laboratory Improvement Programs

Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Laboratory Practice

Next-generation Sequencing: Standardization of Clinical Testing (Nex-StoCT) Workgroup Principles and Guidelines

Supplementary Guidelines

College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests

Nazneen Aziz, PhD; Qin Zhao, PhD; Lynn Bry, MD, PhD; Denise K. Driscoll, MS, MT(ASCP)SBB; Birgit Funke, PhD; Jane S. Gibson, PhD; Wayne W. Grody, MD; Madhuri R. Hegde, PhD; Gerald A. Hoeltge, MD; Debra G. B. Leonard, MD, PhD; Jason D. Merker, MD, PhD; Rakesh Nagarajan, MD, PhD; Linda A. Palicki, MT(ASCP); Ryan S. Robetorye, MD; Iris Schrijver, MD; Karen E. Weck, MD; Karl V. Voelkerding, MD



ANDREW M. CUOMO
Governor

Department
of Health

HOWARD A. ZUCKER, M.D., J.D.
Commissioner

SALLY DRESLIN, M.S., R.N.
Executive Deputy Commissioner

UPDATED AND REVISED

March 2016

Oncology – Molecular and Cellular Tumor Markers

“Next Generation” Sequencing (NGS) guidelines for somatic genetic variant detection

ERCC RNA Spike-In Control Mixes

ERCC RNA Spike-In Mix
ERCC ExFold RNA Spike-In Mixes

Catalog Number 4456740, 4456739

Publication Number 4455352

Revision D

Published online 13 April 2015

Nucleic Acids Research, 2015, Vol. 43, No. 14 e89
doi: 10.1093/nar/gkv303

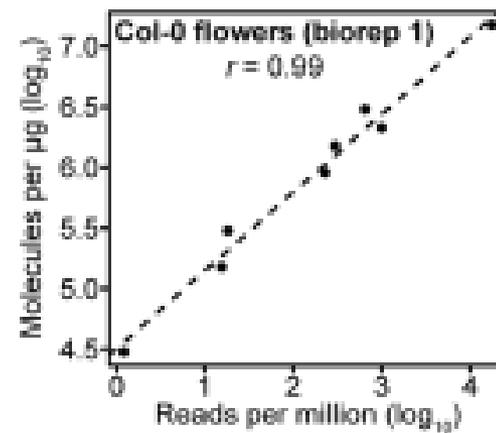
Improving small RNA-seq by using a synthetic spike-in set for size-range quality control together with a set for data normalization

Mauro D. Locati^{1,†}, Inez Terpstra^{1,†}, Wim C. de Leeuw^{1,2}, Mateusz Kuzak^{1,2},
Han Rauwerda^{1,2}, Wim A. Ensink¹, Selina van Leeuwen¹, Ulrike Nehrdich³, Herman
P. Spaink³, Martijs J. Jonker¹, Timo M. Breit^{1,*} and Rob J. Dekker¹

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Novel small RNA spike-in oligonucleotides enable absolute normalization of small RNA-Seq data



Received: 9 February 2017

Accepted: 9 June 2017

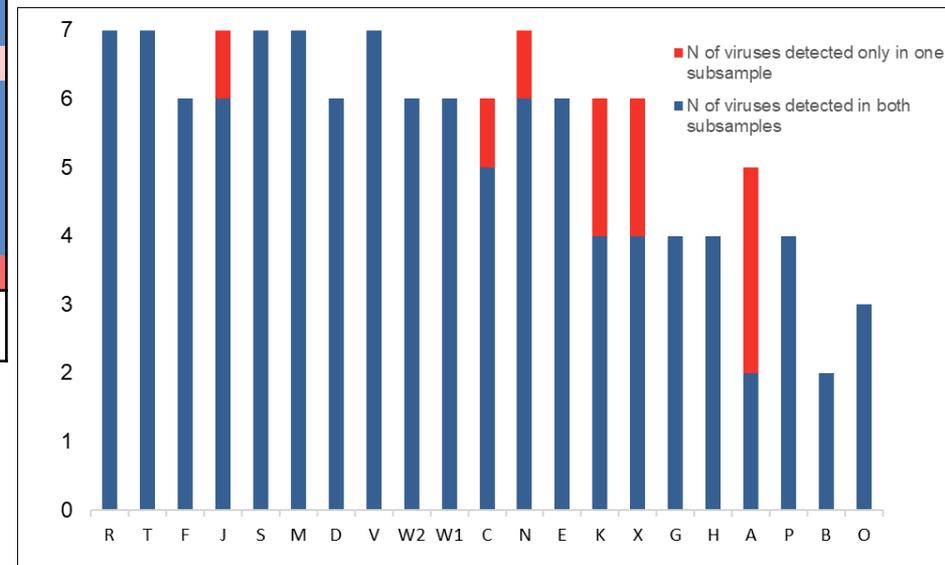
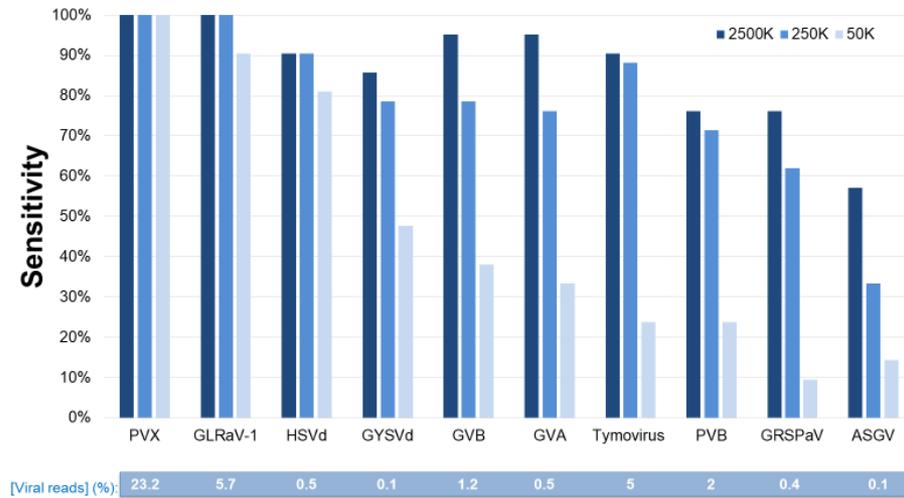
Published online: 19 July 2017

Stefan Lutzmayer, Balaji Enugutti & Michael D. Nodine

Las estrategias Bioinformáticas: Que tan consistentes son?

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-18-0067-R>

LAB ID	SENSITIVITY				FALSE DISCOVERY RATE		
	2,500,000	250,000	50,000	AVERAGE	RATE		
					2,500,000	250,000	50,000
A	90%	53%	10%	51%	0%	0%	0%
B	80%	35%	30%	48%	0%	0%	0%
C	80%	71%	60%	70%	0%	0%	0%
D	100%	82%	50%	77%	17%	7%	9%
E	80%	82%	30%	64%	0%	0%	0%
F	100%	88%	80%	89%	0%	0%	0%
G	100%	53%	20%	58%	0%	0%	0%
H	70%	65%	30%	55%	0%	0%	0%
J	100%	94%	70%	88%	0%	0%	9%
K	90%	71%	40%	67%	0%	0%	0%
M	90%	94%	50%	78%	0%	6%	18%
N	90%	82%	30%	67%	0%	0%	0%
O	40%	41%	20%	34%	0%	0%	0%
P	70%	59%	20%	50%	0%	0%	0%
R	100%	100%	100%	100%	9%	6%	9%
S	100%	100%	50%	83%	0%	0%	0%
T	100%	100%	90%	97%	0%	0%	0%
V	80%	88%	60%	76%	0%	0%	0%
W1	90%	82%	40%	71%	0%	0%	0%
W2	90%	82%	60%	77%	0%	0%	0%
X	80%	71%	30%	60%	0%	8%	27%
AVERAGE	87%	76%	46%	70%	GLOBAL FDR RATE: 1.9%		



Lab ID	Building the contigs						BLAST comparison		
	Software	Extension step	Minimal contig length (nt)	k-mer range	Removal redundant reads	Host filtering	Method	Database	Cut off used
A	Velvet/Oases then Seqman	N	100	13-21	Y	Y	MegaBLAST + BLASTN	GenBank (nr)	None
B	CLC Genomics Workbench	Y	60	Variable	N	N	BLASTX + BLASTN	GenBank (viruses and viroids)	e-value of 10 ⁻³
C	CLC Genomics Workbench	N	30	16-19	N	N	BLASTN	Local databases of complete virus and viroid genomes mined from Genbank	None
D	Velvet/Assembly Assembler	Y	38	(9-)11-25	N	Y	BLASTX + BLASTN	GenBank (viruses and viroids)	None
E	CLC Genomics Workbench	N	50	15-21	N	N	BLASTX + BLASTN	GenBank (nr + nt)	None
F	Velvet	Y	26	13-17	N	N	BLASTX + BLASTN	GenBank (nr)	e-value of 10 ⁻² Homology cut off >80%, 100% coverage for known viruses identification
G	Velvet	N	N	17	N	N	BLASTN +TBLASTX of non-ID contigs	Local databases (viruses and viroids; ribosomal RNA; host) and GenBank (nr) for TBLASTX	Sequencing depth >5
H	Velvet/Assembly Assembler	N	21	7-21	N	N	BLASTX + BLASTN	Genbank (nr)	None
J	Velvet	Y (Only the 2,5M depth)	40	13-15-17	N	N	BLASTN/X/P	GenBank (nr)	Default parameters, e-value 10 ⁻¹
K	Mapping and then de novo assembly with Velvet	N	31	13-15-17	Y	N	MegaBLAST / BLASTN	GenBank (viruses and viroids)	e-value 10 ⁻¹⁰ Homology >95%
M	Velvet	N	29	15-17	N	N	BLASTX + BLASTN	GenBank (viruses and viroids)	e-value 10 ⁻⁴ (BLASTX) e-value 10 ⁻⁶ (BLASTN)
N	Velvet and BWA backtrack	N	50	11-19	Y	N	BLASTX + BLASTN	GenBank (viruses and viroids)	Bit score >= 30
O	CLC Genomics Workbench	N	50	16-19	N	N	BLASTN	GenBank (nt)	e-value 10 ⁻³ Homology >85%
P	Velvet/Assembly Assembler	N	21	9-31	N	N	BLASTX + BLASTN	GenBank (nr + nt)	e-value 10 ⁻³
R	Mapping against refseqdB, and de novo assembly, both in CLC Genomics Workbench	Y	21	12	N	Y	BLASTX + BLASTN	GenBank (nr)	None
S	VirusDetect	N	40	9-19	N	Y	BLASTX + BLASTN	GenBank (nt + nr)	Sequencing depth >5; reference genome coverage >10%; e-value 10 ⁻⁵
T	Blasting raw reads against Genbank (nt) and de novo assembly with CLC Genomics Workbench	N	50	17	N	N	BLASTN	Genbank (nt) + Refseq virus and viroids	e-value 10 ⁻⁴
V	AByss	N	16	16	N	N	BLASTN	GenBank (nt)	e-value 10 ⁻⁵
W1	CLC Genomics Workbench	N	60	14	N	N	BLASTX	GenBank (viruses and viroids)	e-value 10 ⁻³
W2	CLC Genomics Workbench	N	60	Variable	N	N	BLASTX	GenBank (viruses and viroids)	e-value 10 ⁻³
X	CLC Genomics Workbench	Y	21	17	N	N	BLASTN + BLASTX	GenBank virus + viroid	e-value 10 ⁻³

Las **estrategias bioinformáticas influyen** de manera importante en la **detección sensible de virus** en sets de datos de ARN provenientes de HTS. A esto se suma,

- (i) la dificultad para detectar agentes virales cuando son nuevos y/o su abundancia de ARNs es baja,
- (ii) la influencia de la selección de parámetros clave tanto en los pasos de ensamblaje como de anotación,
- (iii) la importancia de la integridad de las bases de datos de secuencias de referencia y
- (iv) el nivel significativo de experiencia científica necesario para interpretar los resultados de los flujos de análisis.

Cómo se puede usar HTS para ayudar a tomar decisiones regulatorias apropiadas con fines fitosanitarios?

Detección e identificación de plagas → Evidencia de plagas vivas o daños a la planta / productos vegetales??

Interpretación de resultados: Más allá de la detección e identificación...

- La interpretación de los resultados es el mayor desafío en el contexto fitosanitario;
- Todavía no se ha desarrollado una guía sobre la interpretación de los resultados de HTS: estas tecnologías pueden utilizarse actualmente para evaluar envíos, pero no para formar la base de decisiones finales para el caso de virus nuevos (por ejemplo, destrucción o rechazo de envíos);
- No todos los organismos asociados con las plantas son plagas: algunos pueden ser mutualistas o agentes comensales.

- Detección de organismos no-viables;
- HTS para fines fitosanitarios: los **datos de validación** importantes y deben estar disponibles así como **los criterios** para su uso y las políticas para la **interpretación de los resultados** tendrían que desarrollarse para permitir las decisiones reglamentarias apropiadas.
- ¿Los organismos recientemente detectados representan un riesgo económico o comercial?
- ¿Cuál es el significado biológico (por ejemplo, el rango de hospederos) del organismo recientemente detectado?
- ¿Cómo se determina la distribución geográfica de este organismo si el organismo se descubrió recientemente y es de naturaleza críptica o latente?
- ¿Qué tipo de acciones serían apropiadas después de los hallazgos basados en tecnologías HTS (por ejemplo, destrucción de un envío importado, pruebas adicionales utilizando otras metodologías)?



A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies

Sebastien Massart^{1*}, Thierry Candresse², José Gil³, Christophe Lacomme⁴, Lukas Predajna⁵, Maja Ravnikar⁶, Jean-Sébastien Reynard⁷, Artemis Rumbou⁸, Pasquale Saldarelli⁹, Dijana Škorić¹⁰, Eeva J. Vainio¹¹, Jari P. T. Valkonen¹², Hervé Vanderschuren¹³, Christina Varveri¹⁴ and Thierry Wetzel¹⁵

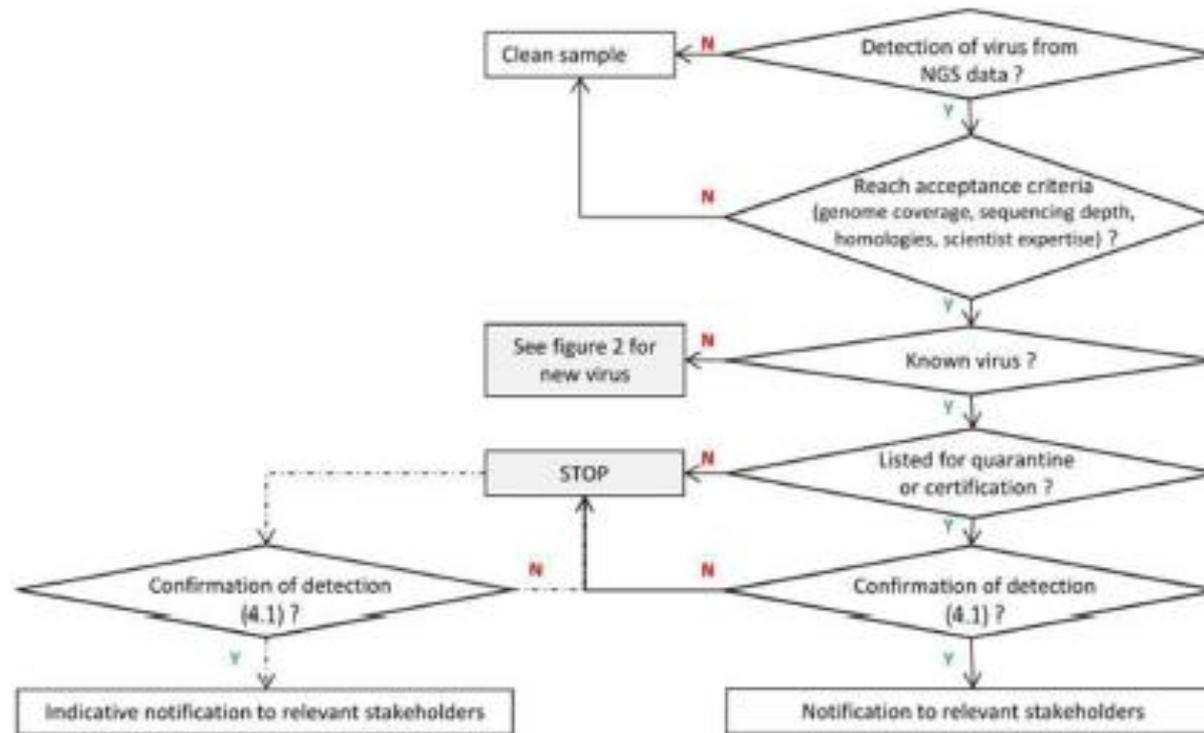


FIGURE 1 | Framework for known viruses. Y means positive response and N negative response (dotted lines correspond to optional analyses for non quarantine pathogens depending on the request of the customer).

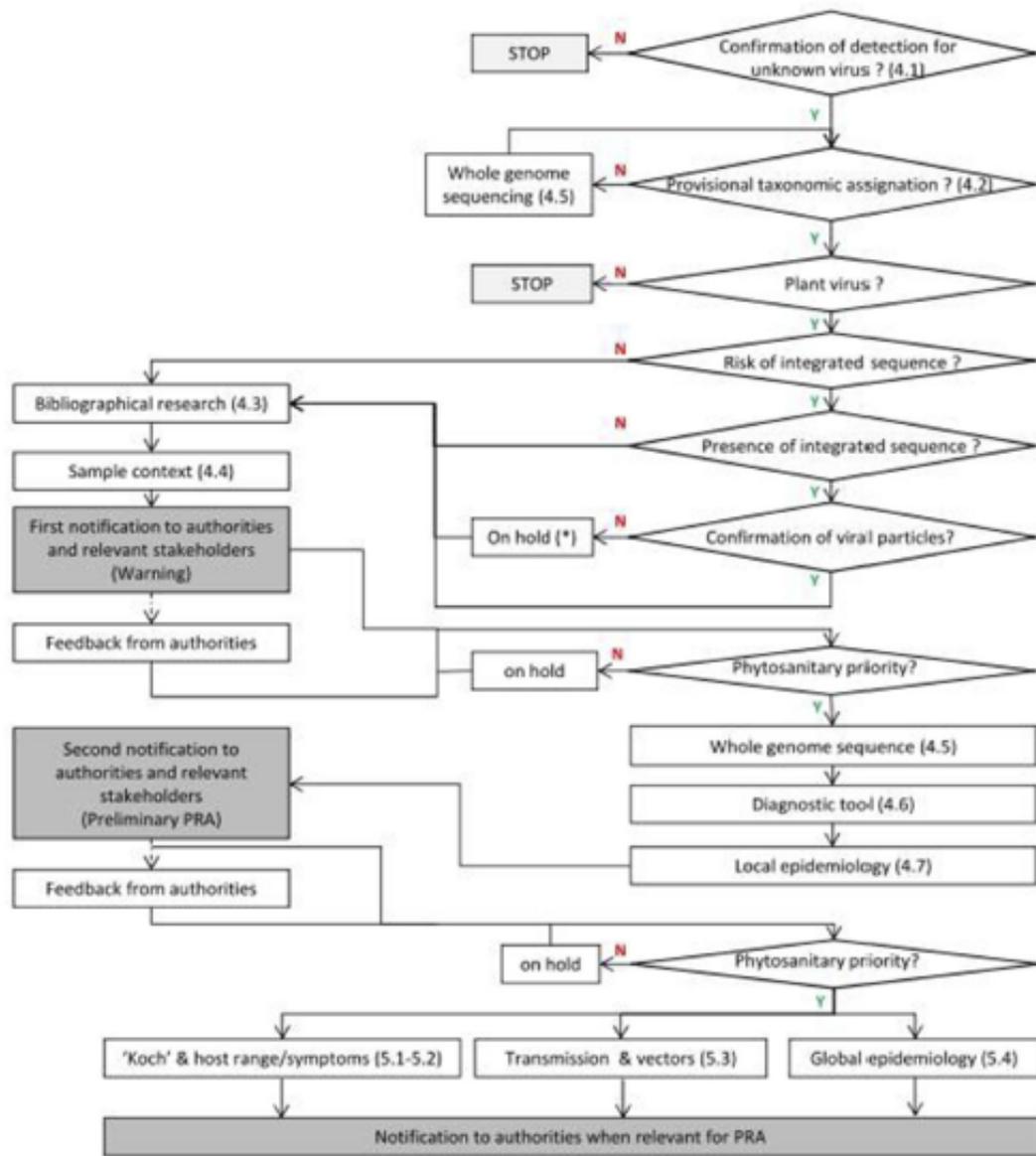


FIGURE 2 | Framework proposal following discovery of new viruses. Y means positive response and N negative response. The numbers between brackets correspond to the chapters in the text. *The absence of viral particle should be recorded and further experiments carried out if new cases are discovered.

Distribución geográfica: usar HTS para mapear todos los virus de un cultivo y su relación con síntomas



Home Participants Sampling Data

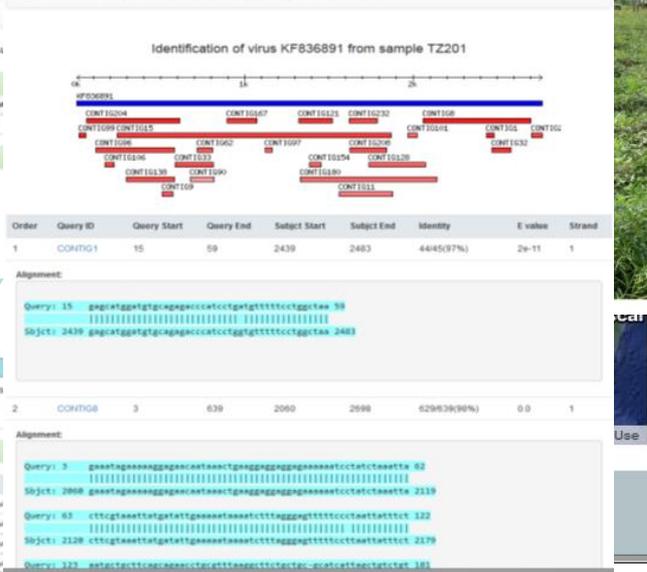
Samples in field TZF111

Sample	Date(DD/MM/YYYY)	Age(month)	Sample Image	Leaf Image
TZ201	28/03/2012	3	IMG_0289.JPG	IMG_0292.JPG
TZ202	28/03/2012	3	IMG_0294.JPG	IMG_0296.JPG
TZ203	28/03/2012	3	IMG_0297.JPG	IMG_0300.JPG
TZ204	28/03/2012	3	IMG_0301.JPG	IMG_0304.JPG
TZ205	28/03/2012	3	IMG_0305.JPG	IMG_0307.JPG



Field (TZF111) information

Filed No.: TZF111
Region: Mwanza



Pan-African Sweet Potato Virome
Home

Cursos de entrenamiento en HTS



Training workshop on Library preparation and bioinformatics for virus indexing by small RNA sequencing (sRSA)
25 – 29 June 2018, ICRAF, Nairobi

Germplasm Health Units: Securing the Path to Food Security

Genebank Platform
CGIAR

Sponsored by
NextGen Phytosanitation Project
& CGIAR Genebank Platform (GH Component)



Genebank Platform



RESEARCH PROGRAM ON
Roots, Tubers
and Bananas



Desde el 2011, el CIP ha organizado varios cursos, este año en Lima, Ghana y Kenya. Desde 2018, también ofrecemos el servicio de preparación de librerías y análisis bioinformático.

CGIAR & Crop trust: Asegurando el camino hacia la seguridad alimentaria



 cip_potato

cip_potato Farmers in #Rwanda will reap the benefits of clean planting materials. More than 448 households in Rwanda's Northern District of Musanze can expect to double their sweetpotato production this year. Disease accumulation over the years in sweetpotato planting materials can significantly reduce yields. By using clean vines farmers can jumpstart their productivity. Recipients took home orange-fleshed sweetpotato (OFSP) vines to replace the white-fleshed variety they usually plant. Attendees received talks about optimal planting times and nutritional information about the link between #OFSP and reducing hidden hunger caused by vitamin A deficiency. One grateful farmer, Dorothy Maniragana commented, "I would have never



ball.250, soph_tur, ben_crosby.co, pturilli, croplife_international, muller.mary, lacooperationagricole, megandmarknz, caden_carver24 and sophiemunns like this

7 DAYS AGO

Add a comment...



CIP - Potato Center @Cipotato · Oct 23

It's Phytosanitary Awareness Week, "Securing the Path to Food Security." Watch this feed for more #CgiarGHU @CGIAR



7

10





The International Potato Center (known by its Spanish acronym CIP) is a research-for-development organization with a focus on potato, sweetpotato, and Andean roots and tubers. CIP is dedicated to delivering sustainable science-based solutions to the pressing world issues of hunger, poverty, gender equity, climate change and the preservation of our Earth's fragile biodiversity and natural resources.

www.cipotato.org



Science for a food-secure future

CGIAR is a member of CGIAR

CGIAR is a global agriculture research partnership for a food secure future. Its science is carried out by the 15 research centers who are members of the CGIAR Consortium in collaboration with hundreds of partner organizations.

www.cgiar.org



GERMPLASM HEALTH UNITS: SECURING THE PATH TO FOOD SECURITY