

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Implementación de una prueba de RT-qPCR para la  
detección y monitoreo del *Cucurbit yellow stunting disorder  
virus* (CYSDV) en cultivos de cucúrbitas de interés comercial  
en Guatemala**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por

José Daniel De Paz Gil

para optar al grado académico de

Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Implementación de una prueba de RT-qPCR para la  
detección y monitoreo del *Cucurbit yellow stunting disorder  
virus* (CYSDV) en cultivos de cucúrbitas de interés comercial  
en Guatemala**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por

José Daniel De Paz Gil

para optar al grado académico de

Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,


2022

Vo. Bo

(f) Patty Herrera  
MSc. Martha Patricia Herrera González

Tribunal Examinador:

(f) Patty Herrera  
MSc. Martha Patricia Herrera González

(f)   
PhD. Luis Diego Archila Diaz

(f) Patrizia Lupo  
PhD. Patrizia Lupo

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre de 2022

## PREFACIO

El presente trabajo de graduación forma parte de un proyecto en conjunto con el Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA) de la Universidad del Valle de Guatemala. Este emplea técnicas moleculares como extracción de ARN y cuantificación por RT-qPCR para desarrollar una técnica de detección rápida y específica de virus fitopatógenos en cultivos de relevancia comercial en Guatemala.

Esta investigación es la culminación de cinco años de adquisición de conocimientos para mi desarrollo profesional, la cual me permitió poner en práctica lo aprendido y familiarizarme con las técnicas. Este proyecto me permitió recordar el por qué inicié este camino, a esforzarme por ir más allá de mis límites y a estar a la altura de las expectativas de todos los que me han apoyado y han confiado en mí.

Agradezco a las personas e instituciones involucradas en el desarrollo del presente trabajo de graduación:

A mi asesora y mentora, la MSc. Patty Herrera, por su apoyo en la realización de esta investigación. Gracias por la confianza, tiempo, ayuda y dedicación durante mi periodo como tesista y practicante. Agradezco todos los consejos y experiencias brindadas, las cuales son para mi crecimiento personal y profesional, así como para el éxito de este trabajo. Gracias por los ánimos y las enseñanzas.

A la Lic. Nina Figueroa y la Lic. Lizbeth Coxaj por todo su apoyo en el transcurso de la investigación. Gracias por su compañía, ayuda y resolución de dudas en todo el desarrollo de la investigación, su apoyo me guió a ser un mejor profesional. Gracias por todas las experiencias y enseñanzas, por las risas y las historias compartidas en el laboratorio.

Al director de mi carrera, el PhD. Diego Archila, por la confianza, apoyo y consejo a lo largo del año, no solo para el trabajo de investigación sino para mi desarrollo como profesional.

Al Laboratorio de Protección Vegetal y al Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios, por haber brindado los recursos y las instalaciones requeridas para llevar a cabo la investigación, al igual que al Departamento de Bioquímica, Microbiología y Biotecnología Molecular por permitirme utilizar las instalaciones y equipos necesarios.

A mi familia, mi mamá, mi papá y mi hermano, por su amor y apoyo a lo largo de toda mi vida. Nunca alcanzarán las palabras para agradecerles por estar siempre presentes, darme ánimos cuando más lo he necesitado, por llenarme de alegría, por tenerme paciencia, y ser un apoyo incondicional. De ustedes tres he aprendido mucho, y no sería la persona

que soy ahora si no es por todo lo que han hecho por mí. Ustedes me inspiran a ser la mejor versión de mí mismo porque siempre han visto el potencial en mí.

A mis mejores amigos, quienes con un mensaje siempre me motivaron, y me apoyaron en toda la carrera. Atesoro las horas que pasé charlando y compartiendo café con ustedes dos. Me enorgullece haber trabajado con ustedes y realizar nuestra primera publicación de muchas por venir. El apoyo y motivación que siempre nos brindamos nos trajo hasta aquí, y me llevo todos los recuerdos que vivimos y las enseñanzas que me dejaron. Nada de esto hubiese sido posible sin ustedes.

A mis amigos y compañeros, gracias por todas las vivencias. De cada uno aprendí algo para la vida, y agradezco su apoyo a lo largo de estos años. Recuerden siempre que aprendimos y crecimos de los éxitos y fracasos.

A Dios, por darme la vida, guiarme hasta aquí y permitir que las cosas ocurran como deben de ocurrir para que pueda desarrollarme como persona y cumplir mis metas.

# ÍNDICE

PREFACIO.....	iii
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO .....	6
4.1 Cultivos de cucurbitáceas de interés comercial.....	6
4.1.1 Generalidades de los cultivos.....	6
4.1.2 Condiciones de siembra .....	6
4.1.3 Distribución.....	7
4.1.4 Exportación e importancia económica .....	8
4.1.5 Beneficios de su consumo.....	10
4.2 Enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas .....	11
4.2.1 Hongos .....	11
4.2.2 Bacterias.....	12
4.2.3 Virus.....	13
4.2.3.1 Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus (CYSDV) .....	13
4.2.3.1.1 Estructura del virus y ciclo de replicación.....	13
4.2.3.1.2 Transmisión .....	14
4.2.3.1.3 Cultivos afectados.....	15
4.2.3.1.4 Sintomatología.....	15
4.2.3.1.5 Distribución .....	15
4.2.3.1.6 Métodos de detección .....	16

4.2.3.1.7	Prevencción y control.....	16
4.3	Pruebas de susceptibilidad en hospederos.....	17
4.4	PCR de transcripción reversa en tiempo real .....	19
4.5	Diseño de cebadores y sondas para PCR de tiempo real.....	20
4.5.1	Diseño de cebadores.....	20
4.5.2	Diseño de sondas.....	20
4.5.3	Selección del marcador fluorescente y el extintor .....	22
4.5.4	Consideraciones de diseño .....	23
4.5.5	Herramientas para evaluar la funcionalidad y especificidad.....	24
V.	METODOLOGÍA .....	25
5.1	Hipótesis.....	25
5.2	Flujo de trabajo de la metodología a seguir .....	25
5.3	Diseño de sondas y cebadores para el ensayo de RT-qPCR .....	26
5.4	Colecta de material vegetal para la detección del CYSDV .....	27
5.5	Extracción y cuantificación de ARN.....	27
5.6	RT-PCR convencional.....	28
5.7	Inoculación mecánica de virus en plantas indicadoras.....	30
5.8	Optimización y validación de RT-qPCR.....	30
5.9	Monitoreo de CYSDV en cucúrbitas .....	32
VI.	RESULTADOS .....	33
6.1	Diseño de cebadores y sonda para la prueba de RT-qPCR .....	33
6.2	Optimización de RT-qPCR .....	35
6.3	Validación de RT-qPCR.....	38
6.4	Cuantificación de ARN .....	41
6.5	Monitoreo del CYSDV en Guatemala por RT-qPCR .....	42
VII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
VIII.	CONCLUSIONES.....	49

IX.	RECOMENDACIONES .....	50
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	51
XI.	ANEXOS.....	62

## LISTA DE CUADROS

1. Principales cultivos de cucurbitáceas domesticadas de importancia económica mundial -----	9
2. Marcadores fluorescentes comúnmente utilizados, y su longitud de onda de excitación y emisión -----	22
3. Extintores comúnmente utilizados y su rango de acción -----	23
4. Preparación de mezcla de reacción para la transcripción reversa de muestras de ARN -----	28
5. Temperaturas de incubación para la obtención de ADNc por transcripción reversa -----	28
6. Preparación de mezcla de reacción para la amplificación de muestras de ADNc para la detección de CYSDV -----	29
7. Programa de PCR para la amplificación de muestras de ADNc para la detección de CYSDV -----	29
8. Preparación de mezcla de reacción para la amplificación de muestras de ARN por RT-qPCR -----	30
9. Programa de PCR para la amplificación de muestras de ARN por RT-qPCR -----	31
10. Departamentos de Guatemala evaluados en el monitoreo de CYSDV -----	32
11. Cebadores y sondas diseñados para la detección y monitoreo de CYSDV -----	33
12. Valores Ct similares para las muestras en la amplificación para la optimización de RT-qPCR -----	35
13. Mezcla de reacción final para la amplificación de muestras de ARN de CYSDV por RT-qPCR -----	36
14. Programa de RT-qPCR optimizado para la amplificación de muestras de ARN de CYSDV -----	36
15. Resumen estadístico de la cuantificación de ARN de las muestras evaluadas -----	40

## LISTA DE FIGURAS

1. Principales departamentos productores de cucurbitáceas en Guatemala -----	8
2. Sintomatología de CYSDV en cucurbitáceas -----	15
3. Distribución mundial del CYSDV hasta julio de 2022 -----	16
4. Procedimiento del PCR en tiempo real para la emisión de la señal fluorescente --	21
5. Flujo de trabajo propuesto para la investigación -----	25
6. Secuencia del gen de la proteína de cápside de CYSDV obtenida de NCBI con los cebadores y la sonda identificados -----	34
7. Cultivos inoculados con CYSDV para la optimización de RT-qPCR -----	35
8. Curva de amplificación de muestras vegetales con inóculo de CYSDV para la optimización de la prueba de RT-qPCR -----	36
9. Primera curva de amplificación estándar con diluciones seriadas -----	38
10. Primera validación de la prueba de detección de CYSDV -----	39
11. Segunda curva de amplificación estándar con diluciones seriadas -----	40
12. Segunda validación de la prueba de detección de CYSDV -----	40
13. Curva de amplificación de RT-qPCR para el monitoreo de CYSDV -----	42
14. Departamentos de Guatemala con cultivos positivos para CYSDV -----	43

## RESUMEN

El *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV por sus siglas en inglés), o el virus del trastorno del retraso del crecimiento amarillo de las cucurbitáceas, es un patógeno transmitido por el vector *Bemisia tabaci* que afecta a cultivos de melón, sandía y pepino a nivel mundial. Este es de rápida diseminación, y al ser uno de los principales virus patógenos de las cucurbitáceas, requiere de métodos de detección rápidos que permitan identificar al virus y tomar medidas preventivas y de control para evitar pérdidas comerciales y económicas. El presente estudio consistió en el desarrollo de una prueba de diagnóstico rápido mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR) de tipo TaqMan<sup>®</sup> para identificar la presencia del CYSDV en cultivos nacionales, y realizar el monitoreo de este. Se diseñaron y validaron los cebadores y la sonda necesarios para detectar el gen asociado a la proteína de la cápside del virus, y se optimizó tanto la temperatura de anillamiento de la prueba, como la concentración de reactivos a emplear. Se estableció la prueba de detección del CYSDV, cuya validación presentó una eficiencia de entre 97.62 y 99.45%, así como un límite de cuantificación de  $4.27 \times 10^{-5}$  ng. Del monitoreo del virus se demostró que el 92.16% de las muestras analizadas fueron positivas para el CYSDV, las cuales representan a los departamentos productores de cucúrbitas, en las regiones central, nororiente, suroriente y suroccidente de Guatemala. Con la prueba establecida, es posible realizar monitoreos constantes del virus en el país para tomar medidas preventivas, con las cuales se minimicen los efectos adversos del vector y se recupere la productividad agrícola al reducir la pérdida de cultivos afectados por el virus.

# I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala, el sector agrícola es de importancia en la economía nacional, ya que es uno de los pilares de esta al generar empleos e ingresos por ventas a nivel local como por exportaciones. Entre los cultivos de exportación y consumo local frecuentes se encuentra la familia de las cucurbitáceas. Estas abarcan cultivos como sandía, melón, pepino, calabaza, ayote, entre otros, los cuales forman parte de la dieta básica de los guatemaltecos. A nivel de exportaciones de cucurbitáceas, Guatemala forma parte de las naciones líderes, donde la sandía y el melón son parte de los principales frutos de exportación (MINECO, 2018).

Las cucurbitáceas al cultivarse son propensas a padecer enfermedades de diverso origen, a causa de microorganismos patógenos como lo son las bacterias, virus y hongos. Estas infecciones causan la pérdida de nutrientes, una mala calidad del fruto, y la muerte del cultivo, por lo que el efecto de estos patógenos en las especies vegetales resulta en pérdidas económicas importantes para los agricultores.

Entre las enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas, se cuenta con el *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), el cual es un patógeno que causa el trastorno del retraso en el crecimiento y un amarillamiento de las cucurbitáceas, reportando una sintomatología casi indistinguible de otros virus del género *Crinivirus*. Este virus ha sido reportado en Asia, África, Norteamérica y Europa, siendo el principal virus patógeno de esta familia. El CYSDV se transmite por el vector *Bemisia tabaci* conocido como mosca blanca, el cual tiene una eficiencia de transmisión elevada, lo que resulta en una propagación rápida del patógeno a múltiples cultivos. Actualmente el método de control de este virus consiste en la eliminación de los cultivos infectados y la reducción de las poblaciones del vector mosca blanca.

En consideración a lo mencionado, en el presente trabajo se propone emplear una técnica de PCR de transcripción reversa en tiempo real mediante el uso de sondas TaqMan<sup>®</sup> para la detección del virus CYSDV, como método de detección de fitopatógenos en cucurbitáceas en Guatemala, debido al impacto de estos cultivos a la economía nacional.

## **II. OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo general

- Implementar una prueba de RT-qPCR que permita el monitoreo del virus CYSDV que afectan a cucurbitáceas de interés comercial nacional.

### 2.2 Objetivos específicos

- Diseñar cebadores y sondas específicas que permitan la detección del virus.
- Optimizar la prueba de RT-qPCR para obtener la mejor sensibilidad y especificidad en los resultados de amplificación del virus.
- Aplicar la prueba implementada en el monitoreo de la presencia del CYSDV en cultivos comerciales de Guatemala entre 2017 y 2022.

### III. JUSTIFICACIÓN

El sector agrícola tiene un rol de gran relevancia en la economía nacional, siendo uno de sus principales pilares, al contribuir en la generación de ingresos y empleos. Según el MAGA (2016), Guatemala cuenta con 7.3 millones de hectáreas a disposición de la agricultura, correspondiente al 67.5% del territorio de la nación, de las cuales el 12% es utilizado para los cultivos anuales, entre los cuales se incluye a las hortalizas de consumo local. Debido a las condiciones naturales, se presenta una amplia variedad de cultivos que contribuyen a la economía, donde el sector agropecuario reportó una contribución del 10.8% al PIB nacional en el año 2020. Adicionalmente, los productos agrícolas de exportación contribuyeron un 36.2% al PIB durante el mismo año; de esto, el 2% corresponde al cultivo de hortalizas y legumbres nacionales (Turcios, 2021).

Entre los cultivos para consumo local se presenta la familia de cucurbitáceas la cual cuenta con especies que conforman parte de la dieta básica de la población; de estas se menciona al pepino, melón, sandía, ayote y calabaza como cultivos de consumo local. (MAGA, 2016). Con respecto a la presencia e importancia de estos en Latinoamérica, se cuenta con una amplia diversidad, donde en el caso de México, se cuenta con 135 especies siendo este el punto de mayor diversidad, con 64 especies endémicas de importancia cultural y económica (Lira y Rodríguez, 2006), (Lira, 2021). Adicionalmente, se ha reportado que esta familia de cultivos tiene una importancia en diversos sectores de la población a nivel mundial lo que ha hecho que se les dé la prioridad de estudios de diversidad genética y sus aplicaciones (Delgado et al., 2014).

Referente a las cucurbitáceas en Guatemala, el melón y la sandía destacan como cultivos de exportación, del cual la sandía reportó para el año 2017 una exportación a Estados Unidos equivalente a US\$25.3 millones, con un crecimiento del 15% respecto a años anteriores, colocando al país como el segundo mayor proveedor en América Latina (MINECO, 2018). En el caso del cultivo del melón, la cosecha se concentra mayoritariamente en Zacapa, seguido de Santa Rosa y Jutiapa, con una producción de 13

mil quintales reportada para el 2016. De esto, las exportaciones equivalen a US\$160 millones, siendo Guatemala el principal proveedor de melón (MINECO, 2018), (MAGA, 2016).

Los cultivos de cucurbitáceas pueden verse afectados por distintas razones, entre las cuales está la infección con virus fitopatógenos, los cuales afectan el rendimiento de los cultivos, teniendo un impacto en la economía por pérdidas de producto de exportación. El *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYDSV) es un fitopatógeno transmitido por el vector mosca blanca, el cual se caracteriza por afectar la calidad de los cultivos de cucurbitáceas, lo que resulta en una disminución en el rendimiento de cultivo. De este, se ha reportado su presencia en Medio Oriente, el Mediterráneo, Estados Unidos, y México, donde ocasiona pérdidas económicas debido a la reducción del valor económico de los cultivos principales por la apariencia de estos (Álvarez et al., 2012).

Con respecto a los reportes de este virus, Guatemala no se encuentra en el listado de países que evidenciaran la presencia del CYSDV, pero estudios internacionales enfocados en otros virus de las cucurbitáceas han indicado que este se encuentra en países de América como Estados Unidos, México y Guatemala (Brown et al., 2007; Álvarez et al., 2012; Jeyaprakash et al., 2015). Por este motivo, es de importancia implementar una prueba de detección, para determinar la presencia de este virus en cultivos de interés nacional, ya que las cucurbitáceas como la sandía y el melón forman parte relevante de la economía agrícola del país. Además, en los últimos años ha crecido el interés por implementar el desarrollo de pruebas de detección individual de fitopatógenos de relevancia, entre los cuales se incluye al CYSDV (Kader et al., 2021).

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Cultivos de cucurbitáceas de interés comercial

#### 4.1.1 Generalidades de los cultivos

La familia de plantas *Cucurbitaceae*, conocida como cucurbitáceas, conforma un grupo de cultivos con más de 180 géneros y 800 especies. Esta es una de las familias de plantas más diversa, caracterizándose también por su cultivo en gran variedad de condiciones ambientales en todo el mundo (Rolnik y Olas, 2020). Su uso general es para fines culinarios, aunque también son de importancia por su uso ornamental y en investigación para aplicaciones médicas (Rolnik y Olas, 2020). En esta familia se encuentran tres géneros de importancia comercial, *Cucumis*, que agrupa a los pepinos y melones, *Cucurbita*, que agrupa calabazas, calabacines y zapallos, y *Citrullus*, donde se agrupa a las sandías (Schaffer y Paris, 2003).

#### 4.1.2 Condiciones de siembra

Las cucurbitáceas cuentan con requerimientos de cultivo similares entre especies, pese a las diferencias morfológicas que se presentan entre las semillas de cada una. Estos cultivos requieren luz solar y humedad para su crecimiento, por lo que se busca que la zona sea cálida y húmeda con lluvias, aunque algunos cultivos soportan zonas áridas. En el caso de la tierra de siembra, el suelo debe ser neutro o levemente alcalino, con un pH de 7.0, a este se le puede adicionar materia orgánica si el terreno cuenta con arcilla, o bien se puede adicionar compost si es una superficie pesada; como alternativa, también pueden cultivarse en sitios arenosos (Singh y Bharati, 2016).

Las cucurbitáceas requieren de la fertilización del suelo de siembra para el desarrollo adecuado del fruto, donde se necesita un alto contenido de potasio y fósforo, y un bajo contenido de nitrógeno. El requisito mínimo de temperatura para su crecimiento es de 15°C, siendo el rango óptimo entre 25 y 30°C. La semilla se siembra a 1-2 pulgadas de profundidad del suelo, donde se adicionan de 4 a 5 semillas por área, dejando un espacio de 4 a 8 pies de distancia entre cada sitio de siembra, según el tipo de cucurbitácea a cultivar (Lerner y Dana, 2001).

En el caso no se presente una temporada de lluvias, se debe de regar con agua cada 3 a 5 días, intentando cubrir una pulgada de profundidad de suelo. Por último, para la vigilancia y prevención de insectos y enfermedades, se utilizan fungicidas y pesticidas que eviten la dispersión de enfermedades que afecten la calidad del cultivo. En el caso de los fungicidas, se recomienda el uso de mezclas de estos en el sistema radicular; para el caso de los pesticidas, se buscan preparados comerciales que no afecten al cultivo y que reduzcan la presencia de vectores de enfermedades virales que afecten a las cucurbitáceas (Lerner y Dana, 2001; Singh y Bharati, 2016).

#### **4.1.3 Distribución**

La domesticación de los cultivos de cucurbitáceas inició hace miles de años en Asia, donde se fue ampliando a nivel mundial, hasta contar en la actualidad con más de 300 especies para uso humano, de las cuales, poco más de 30 especies se utilizan con fines alimenticios; de estos, 10 cultivos son de importancia comercial mundial, mientras que el resto son de cultivo y consumo local (Chomicki et al., 2019). La distribución natural de las cucurbitáceas son los trópicos, aunque se reporta también la presencia de algunos géneros en regiones templadas, con una tolerancia a altas y bajas temperaturas, por lo que se distribuyen en casi todas las regiones cultivables del mundo (Schaffer y Paris, 2003). Actualmente, los principales productores de cucurbitáceas son Turquía, China, India y Estados Unidos, estos, seguidos por Latinoamérica, África y el Sureste de Asia, debido a que las regiones presentan variedades de especies de cucurbitáceas nativas (Lebeda et al., 2007; Mariod et al., 2017).

Con respecto a la distribución de las cucurbitáceas en Guatemala (Figura 1), el melón y la sandía son los que destacan como cultivos de exportación; de estos, la cosecha de melón se da mayoritariamente en los departamentos de Zacapa, Santa Rosa y Jutiapa (MAGA, 2016). Para el cultivo de sandía, se ha reportado la cosecha principalmente en los departamentos de Escuintla y Zacapa, seguidos de El Progreso, Santa Rosa, Suchitepéquez y Jutiapa (INE, 2004). En el caso del ayote y los calabacines, estos se encuentran en todo el país, pero su cultivo se centra en el altiplano de Guatemala (Orellana, 2012).

Figura 1. Principales departamentos productores de cucurbitáceas en Guatemala



Fuente: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 (CC BY-SA 3.0) con modificaciones propias

#### 4.1.4 Exportación e importancia económica

Los diez cultivos de importancia económica mundial se describen en el Cuadro 1. Estos se cultivan con fines de distribución local, y exportación, debido a su fruto para consumo humano, así como por sus semillas y propiedades para aplicación medicinal y de investigación (Chomicki et al., 2019).

Cuadro 1. Principales cultivos de cucurbitáceas domesticadas de importancia económica mundial

<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Zona de origen</b>
<i>Cucurbita argyrosperma</i>	Calabaza de semilla de plata	México
<i>Cucurbita maxima</i>	Calabaza	Sudamérica
<i>Cucurbita pepo subsp. pepo</i>	Calabazas y calabacines	México
<i>Cucurbita pepo subsp. tejana</i>	Calabaza de bellota	Texas
<i>Citrullus lanatus</i>	Sandía	Sudán
<i>Benincasa hispida</i>	Calabaza de cera	Sudeste de Asia
<i>Cucumis melo</i>	Melón	India y Australia
<i>Cucumis sativus</i>	Pepino	India
<i>Lagenaria siceraria</i>	Calabaza de botella	África
<i>Momordica charantia</i>	Calabaza amarga	África

Adaptado de: Chomicki et al., 2019

En cuanto a la exportación global, el pepino (*Cucumis sativus*) es el cultivo de cucurbitáceas de mayor valor económico, el cual ha reportado cifras de US\$40.2 millones para el año 2016, dato que ha ido en incremento; adicionalmente, se reportó en 2018 una producción global total de 75.2 millones de toneladas métricas, del cual el 75% de la producción y exportación es por parte de China, siguiéndole Irán, Turquía, Rusia y México. Para la sandía (*Citrullus lanatus*), esta es la segunda especie de cucurbitáceas de importancia económica, y el segundo cultivo de frutas de relevancia mundial seguido del banano. Este reportó en 2018 una producción global de 103.9 millones de toneladas métricas, con ingresos de US\$34 millones; igualmente, su principal productor es China, seguido de Irán, Turquía, India y Brasil. En el caso del melón (*Cucumis melo*), este es considerado por la FAO como uno de los cultivos de frutas de importancia económica, reportando una producción de 27.3 millones de toneladas métricas para el año 2018, con ingresos de US\$13.2 millones; referente a su producción, esta es mayoritaria en el continente de Asia. Por último, las calabazas (*Cucurbita maxima*), son uno de los cultivos de cucurbitáceas de mayor distribución global, por su resistencia a temperaturas y

enfermedades, siendo los países de Sudamérica los principales productores y exportadores (Ebert et al., 2021; FAOSTAT, 2018).

En cuanto a la situación reportada para Guatemala, MINECO (2018) y MAGA (2016) reportan cifras de ingresos por exportaciones de los últimos años para los cultivos de sandía y melón. En el caso de la primera, se reporta una exportación equivalente a US\$25.3 millones, siendo el segundo mayor proveedor en América Latina, contando con un crecimiento constante respecto a años previos. Por otro lado, para el melón, se cuenta con una producción equivalente a 13 mil quintales, la cual reporta en exportaciones un total de US\$160 millones, donde se considera a Guatemala como el principal proveedor de melón para Estados Unidos.

#### **4.1.5 Beneficios de su consumo**

El consumo de cucúrbitas aporta fibra dietética, así como son una buena fuente de proteínas. Los beneficios se deben por el consumo del fruto, y por las propiedades reportadas en las semillas de estas, las cuales aportan no solo proteínas y lípidos, sino minerales, entre los cuales se menciona al hierro, zinc, fósforo, magnesio y cobre. La composición química de las cucurbitáceas consiste en fitoquímicos, los cuales cuentan con compuestos de interés para el estudio por su valor nutritivo (Salehi, Capanoglu et al., 2019). Se ha reportado la actividad múltiple de los compuestos presentes en las cucúrbitas, en beneficio para la salud, como lo es la actividad cardiovascular, donde estos presentan glucósidos cardíacos y saponinas que se utilizan para el tratamiento de enfermedades cardíacas; también, se cuenta con cucurbitacinas, que son compuestos esteroideos que presentan efectos ateroscleróticos. Es de importancia mencionar que su consumo beneficia a la salud por su actividad antioxidante, debido al contenido de carotenoides en el fruto, y compuestos fenólicos en las semillas (Patel y Rauf, 2017; Salehi, Sharifi et al., 2019).

Se cuenta también con propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias, donde las saponinas y cucurbitacinas presentes en los cultivos reportan actividades anti mutagénicas y antitumorales, a causa de la inducción de apoptosis en células cancerígenas; respecto a la propiedad antiinflamatoria, las cucurbitacinas B y E inhiben mediadores de inflamación,

mientras que los polisacáridos presentes modulan la inflamación y respuesta inmune (Rolnik y Olas, 2020). Otro beneficio encontrado se debe a los terpenoides presentes en las cucúrbitas, puesto que estos cuentan con propiedades antifúngicas y antimicrobianas, por su efecto disruptor de membrana. Por último, se ha reportado un beneficio de su consumo para la diabetes, debido a compuestos como el ácido nicotínico, la trigonelina y el D-quirositol, que tiene actividad hipoglucémica, así como reducen los marcadores oxidativos (Patel y Rauf, 2017; Rolnik y Olas, 2020).

## **4.2 Enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas**

Los cultivos de cucúrbitas son propensos a padecer diversas patologías, a causa de microorganismos patógenos como bacterias, virus, hongos y algunas especies de nemátodos. Las infecciones a causa de estos resultan en un déficit de nutrientes y en una mala calidad del fruto, lo que reduce la producción de las cucúrbitas, causando pérdidas económicas importantes. Debido a sus condiciones de cultivo, son propensas a diversas enfermedades, por lo que algunas de estas cuentan con un amplio rango de hospederos vegetales. Adicional a lo anterior, las cucúrbitas se ven afectadas por insectos, los cuales son transmisores de virus fitopatógenos. Para la identificación y diagnóstico general, se revisa el fruto, las hojas, las raíces y el tallo del cultivo para verificar la presencia de síntomas característicos del patógeno, y se complementa con pruebas de diagnóstico de laboratorio (Chand, 2021).

### **4.2.1 Hongos**

Las cucurbitáceas son una buena fuente de nutrientes, lo que hace que sean susceptibles a un amplio rango de patógenos que afecten su cultivo. En el caso de los hongos fitopatógenos, existen diversos géneros identificados los cuales afectan al cultivo ya sea por su presencia a través del suelo, o por su desarrollo en la semilla del cultivo. Respecto a los hongos presentes en el suelo, estos tienen un efecto sobre la raíz y el tallo, causando su marchitamiento y descomposición, del cual se ha reportado los géneros *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*, y *Fusarium sp.* (Ayala et al., 2020). En el caso de los hongos presentes en semillas, estos afectan directamente la calidad y desarrollo del cultivo, lo que resulta en una reducción del rendimiento, así como una pobre germinación de la planta.

Para las cucurbitáceas existe un amplio rango de hongos presentes en semillas, los cuales dependen del cultivo, y pueden ser específicos de cucúrbitas o de amplio rango afectando más cultivos (Amza, 2018; Shanti et al., 2021).

De los géneros de hongos causantes de enfermedades, se ha reportado la presencia de *Fusarium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Acremonium sp.* y *Pythium sp.*, de los cuales la infección a las cucúrbitas resulta en pérdidas de hasta el 70% del rendimiento del cultivo (Shanthi et al., 2021). Respecto a *Fusarium sp.* y *Phytophthora sp.*, estos son los patógenos que causan la mayor cantidad de muertes de cucúrbitas en todo el mundo; en el caso del género *Phytophthora*, todas las especies de cucúrbitas son susceptibles a este, pero se presenta una mayor susceptibilidad en cultivos de calabaza, y una leve tolerancia reportada para melón y pepino (Chehri, Abbasi et al., 2010). En relación al género *Fusarium*, estos son responsables de la descomposición no solo del fruto sino de raíces, además que se ha demostrado, son de dispersión rápida y agresiva, lo que permite que dañen al cultivo en su totalidad (Chehri, Salleh et al., 2011).

#### **4.2.2 Bacterias**

Las afecciones por bacterias sobre los cultivos de cucurbitáceas tienen la peculiaridad de ser específicas para ciertas especies bacterianas, reportando distintos tipos de enfermedades y síntomas, que en general, afectan la producción de cultivos de interés comercial en todo el mundo (Tuttle, 2004). Los principales géneros bacterianos reportados con efectos sobre las solanáceas y cucurbitáceas son *Acidovorax sp.*, *Clavibacter sp.*, *Pectobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Ralstonia sp.* (Catara y Bella, 2020). Se cuenta con la enfermedad destructiva de cultivos denominada mancha bacteriana de la fruta, que es una enfermedad causada por *Acidovorax avenae subsp. citrulli*, la cual se caracteriza por afectar desde las semillas del cultivo, además de utilizar plantas adultas como reservorio para su infección posterior a frutos, de los cuales, las cucúrbitas son altamente susceptibles, especialmente la sandía y el melón (Bahar et al., 2009).

Otra enfermedad de importancia es el marchitamiento bacteriano, el cual es causado por *Erwinia tracheiphila*, que afecta el xilema de la planta y causa su marchitamiento; de esta hay pocos cultivos resistentes por lo que la mayoría de especies de importancia comercial se ven afectadas, entre las cuales está el melón, pepino y calabaza (Rojas et al., 2015). Por último, otra afección de interés es conocida como la mancha angular de las cucurbitáceas, la cual se da por *Pseudomonas syringae subsp. lachrymans*, la cual tiene distribución mundial, afectando cultivos al presentarse en condiciones húmedas, por lo que se ha reportado epidemias con incidencias de la enfermedad en cucurbitáceas de al menos del 80% de los cultivos (Newberry et al., 2016).

### **4.2.3 Virus**

Las enfermedades virales son el factor limitante para la producción de cucurbitáceas a nivel mundial. Se ha reportado más de 70 especies de virus que infectan a estos cultivos, asociado a su crecimiento en una amplia variedad de ecosistemas agrícolas; adicionalmente, la diversidad de los virus que afectan a esta familia de plantas se asocia a la diversidad genética y ecológica de los hospederos. Las cucurbitáceas pueden verse afectadas por uno o más virus, que en conjunto con su distribución global dificultan el establecer el impacto de cada uno. Los patógenos de mayor incidencia se clasifican acorde al vector transmisor, siendo el *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) y *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) los que se presentan mayoritariamente por áfidos, mientras que el *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), y *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) los que principalmente se presentan por transmisión por mosca blanca (Lecoq y Katis, 2014).

#### **4.2.3.1 Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus (CYSDV)**

##### **4.2.3.1.1 Estructura del virus y ciclo de replicación**

El virus del trastorno del retraso en el crecimiento del amarillo de las cucurbitáceas (CYSDV por su nombre en inglés) es un patógeno perteneciente al género *Crinivirus*, el cual está conformado por dos moléculas de ARN monocatenario de sentido positivo, las cuales se recubren de la cápside para formar el virión desnudo. Los ARN que conforman

al virus se denominan ARN-1 y ARN-2; de estos, el primero presenta 5 marcos de lectura abierta, los cuales codifican para múltiples proteínas, entre las que se encuentra una proteasa similar a la papaína, la ARN helicasa, una metiltransferasa y los dominios de la ARN polimerasa dependiente de ARN. En el caso del ARN-2, esta contiene los marcos de lectura abierta característicos de la familia *Closteroviridae*, además de codificar para el homólogo de la proteína de choque térmico, y las proteínas de cubierta mayor y menor (Martelli y Gallitelli, 2008; Rubio et al., 2013). La diversidad genética de los aislamientos del virus ha sido estudiada con un enfoque sobre la proteína de choque térmico HSP70h y los genes de la proteína de cubierta del ARN-2 (Marco et al., 2003).

Respecto al ciclo de replicación del virus, este es altamente dependiente del vector; no se ha descrito con precisión la replicación de CYSDV, pero se podría explicar de igual manera que los demás virus de la familia *Closteroviridae* (Martelli y Gallitelli, 2008). El vector transmite el virus al cultivo a través de su saliva, donde se libera de la cápside para que el genoma viral se mantenga en el citoplasma. En este proceso se da el transporte al ribosoma para ensamblar la polimerasa, la cual emplea una plantilla de ARN para generar ARN monocatenario negativo, que va a utilizarse para la síntesis de ARN viral. El virión se recubre de la cápside y se libera para volver a ser captada por el vector (Aguilar et al., 2003; Markham et al., 1994).

#### **4.2.3.1.2 Transmisión**

El CYSDV es transmitido de forma semi persistente y exclusiva por el vector *B. tabaci* conocido como mosca blanca; esto ya que el periodo de adquisición e inoculación es de 18 a 24 horas, mientras que el de transmisión es de 2 horas a 9 días (CABI, 2022). De manera específica, las especies de mosca blanca denominadas MEAM1 y MED, anteriormente conocidos como biotipos B y Q respectivamente, son los que presentan una transmisión eficiente superior a otros biotipos reportados. El virus es adquirido por el vector a través de plantas infectadas, en periodos de adquisición de duración variada, lo que ha demostrado una eficiencia de transmisión elevada (Orfanidou et al., 2021; Wintermantel et al., 2017).

#### 4.2.3.1.3 Cultivos afectados

Los hospederos naturales del CYSDV se restringen a cultivos de cucurbitáceas; de estos, se reporta principalmente la presencia del virus en cultivos de sandía, pepino, melón y calabacín (Jones, 2005).

#### 4.2.3.1.4 Sintomatología

La presencia de CYSDV en cucurbitáceas está caracterizada por el amarillamiento severo donde ocurre un moteado intervenal en hojas viejas; además, se presenta un moteado clorótico y un retraso en el crecimiento del cultivo (Figura 2A). En cultivos de pepino y melón, luego del moteado de nervaduras, se da un amarillamiento completo en la lámina de la hoja, seguido de una atrofia y enrollamiento de esta (Figura 2B). Reportes indican que la sintomatología del CYSDV es indistinguible de la causada por el virus pseudo amarilleo de la remolacha (BPYV), y de otros virus del género *Crinivirus* (Martelli y Gallitelli, 2008; Wintermantel et al., 2017).

Figura 2. Sintomatología de CYSDV en cucurbitáceas



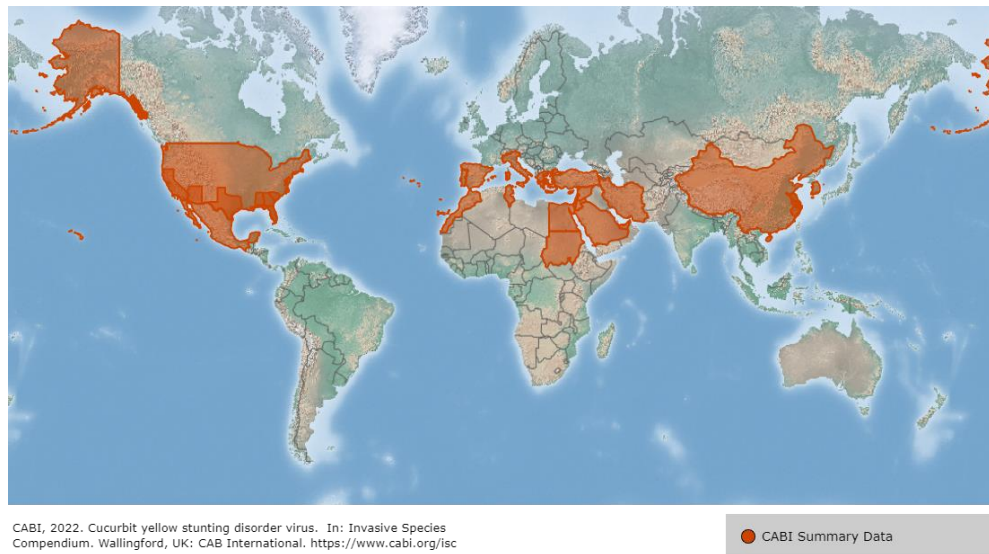
Fuente: Wintermantel et al., 2017

#### 4.2.3.1.5 Distribución

El CYSDV fue detectado inicialmente en Emiratos Árabes Unidos y España, para posteriormente obtener registros de este en distintas partes del mundo, como se presenta en la Figura 3. Se ha reportado su presencia en países de Asia, África, Norteamérica y Europa. De estos, se clasifica el virus en dos grupos según su aislamiento, el primero compuesto por las cepas detectadas en España, Líbano, Jordania, Turquía, Estados Unidos y México,

mientras que el otro grupo se compone de los aislamientos realizados en Arabia Saudí y regiones cercanas (EPPO, 2022; Jones, 2005; Martelli y Gallitelli, 2008).

Figura 3. Distribución mundial del CYSDV hasta julio de 2022



Fuente: CABI, 2022

#### 4.2.3.1.6 Métodos de detección

La detección de CYSDV se da mediante técnicas serológicas, moleculares y de observación; de esta última, se realiza la evaluación de síntomas, pero se da la limitante de la similitud entre síntomas presentados por otros virus del género *Crinivirus*. Respecto a las técnicas serológicas, se cuenta con antisuero para emplear la prueba de ELISA indirecta y el Inmunoblot. En el caso de pruebas moleculares se realiza el Dot Blot con sondas específicas para la detección de moléculas del virus, además, se realiza la detección en tejido infectado a través de la prueba de RT-PCR (Boubourakas et al., 2006; Marco et al., 2003).

#### 4.2.3.1.7 Prevención y control

El control de CYSDV está enfocado al control del insecto vector, específicamente en la reducción de poblaciones de los portadores del virus y de las fuentes de infección. Referente al control de *B. tabaci*, el control químico por insecticidas tradicionales no ha sido efectivo para prevenir la dispersión de la plaga, debido a resistencias propias de la

mosca blanca, y por el amplio rango de hospederos. Se ha evaluado el uso de cultivos genéticamente resistentes, los cuales han sido de éxito limitado (Marco et al., 2003; Martelli y Gallitelli, 2008).

Otro método de controlar el vector ha sido mediante estrategias biológicas que emplean el uso de antagonistas naturales. Los escarabajos mariquita *Delphastus catalinae* son el predador más utilizado para controlar poblaciones de mosca blanca en cultivos, aunque para cucúrbitas se emplea también el chinche *Macrolophus pygmaeus*. En el caso de los hongos entomopatógenos, se ha empleado a *Beauveria bassiana*, el cual reporta una supresión de poblaciones del vector del 90%, empleándose para cultivos de melón, pepino y calabazas. Otro antagonista de relevancia es el nemátodo *Steinernema feltiae*, el cual se ha utilizado para reducir las poblaciones del vector en cultivos de cucurbitáceas y solanáceas (Abubakar et al., 2022).

En el caso del control de fuentes de infección se busca eliminar cultivos infectados para prevenir la diseminación, se recomienda también a manera de prevención la evaluación de semillas para utilizar las que sean libres de patógenos, así como la sanitización adecuada tanto en el manejo de cultivos como en la eliminación de infectados (Reddy, 2016).

### **4.3 Pruebas de susceptibilidad en hospederos**

Para evaluar la susceptibilidad en hospederos, se suele seleccionar una batería de plantas de distintas especies para identificar los síntomas que desarrollan según el virus de estudio, lo que también se ha empleado para establecer resistencias naturales (Martín y Picó, 2021). Esto se implementó debido a la pérdida de cultivos comerciales y del rendimiento de estos a causa de microorganismos patógenos que afectan a plantas de consumo humano. La detección con respecto a qué virus infecta un grupo de plantas puede ser complicada debido a la variabilidad de síntomas durante el transcurso de la infección y la especie evaluada, por lo que se realiza una serie de evaluaciones sobre cultivos representativos o de interés, en las cuales se evalúa la sintomatología presentada, y se confirma la presencia por herramientas moleculares o serológicas. De esto, debe

considerarse la posibilidad de falsos negativos por diversidad de plantas, distribución del virus, y cepa empleada (Lacroix et al., 2016).

En el caso del CYSDV, se realiza la evaluación de sintomatología en cultivos de solanáceas y cucurbitáceas representativas, con las pruebas de PCR y variaciones, en conjunto con el ensayo de ELISA. Los cultivos de interés reportados para la evaluación de susceptibilidades y resistencias a virus que afectan cucurbitáceas son *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita máxima*, y *Cucurbita moschata* (García y Palukaitis, 2008; Martín y Picó, 2021; Webster et al., 2017). En la literatura disponible, no existe una descripción detallada de los hospederos alternos para CYSDV, además de la sandía, pepino, melón y calabacín (Jones, 2005).

Se realiza también el ensayo de inoculación mecánica, el cual consiste en inocular el virus en las plantas de manera mecánica, para diagnosticar el efecto y síntomas del virus en la planta según sea la reacción de cada especie, de manera que se puede evaluar la distribución del virus (local o sistémico), así como los hospederos específicos. Esta prueba consiste en frotar con un preparado del virus, la superficie de las hojas del cultivo a evaluar, de manera que se dé la ruptura de las células presentes en la superficie sin causar daño. Entre las consideraciones de este ensayo se encuentra el número de pruebas y virus a realizar por cultivo, ya que se debe de evitar la contaminación cruzada, por lo que se busca inocular un virus por hoja; además, se recomienda colocar los cultivos a evaluar en zonas oscuras para incrementar su sensibilidad. Los inconvenientes de la prueba se deben al daño excesivo de la hoja al realizar el daño mecánico, o al estado del cultivo previo a la evaluación (Hull, 2009).

A manera de confirmación de la presencia e identidad de virus fitopatógenos, se suele emplear pruebas moleculares y serológicas específicas para cada patógeno de interés, como lo es la prueba de PCR y el ensayo de ELISA, los cuales son los más utilizados.

#### **4.4 PCR de transcripción reversa en tiempo real**

La técnica de PCR en tiempo real tiene un principio similar a la PCR tradicional, amplificar una región del material genético de muestras biológicas, pero esta presenta la diferencia en que se emplea el uso de una etiqueta de fluorescencia que permita determinar el contenido de producto de amplificación. La base de esto está en que la señal fluorescente es directamente proporcional a la concentración de material genético, por lo que el marcador fluorescente se une al material genético de forma indirecta o directa por sondas de hibridación, de forma que sea posible calcular el contenido de material genético según la correlación lineal entre el producto de PCR y la fluorescencia. Esto, se obtiene mediante la lectura de fluorescencia respecto al número de ciclos de la amplificación, donde al superar la línea base de fluorescencia inicial se da la detección por acumulación del producto de amplificación, donde al ciclo de amplificación en que ocurre este proceso se le denomina valor Ct. Para la detección, se cuenta con dos métodos: por colorantes, los cuales se incorporan a la hebra de ADN, para emitir fluorescencia y detectarla durante la amplificación, y por sondas fluorescentes de la metodología TaqMan<sup>®</sup>, donde estas conforman secuencias específicas con un indicador fluorescente y un apagador, donde al adherirse la sonda al objetivo complementario, el apagador o extintor se separa, permitiendo la emisión de fluorescencia (Sigma-Aldrich, 2008; Wittwer et al., 2001).

Con respecto a la prueba de PCR de transcripción reversa, esta tiene la finalidad de realizar la amplificación de copias de ADNc, partiendo de una hebra de ARN. Este proceso generalmente involucra dos pasos, uno de transcripción reversa para generar el ADNc, y otro de amplificación tradicional. Esta técnica se utiliza para la detección de enfermedades genéticas y virus, por lo que se puede acoplar a reacciones individuales, o a las denominadas como multiplex las cuales tienen la finalidad de la detección de múltiples objetivos de ARN de distintos organismos en una sola reacción (Hidalgo, 2009).

## **4.5 Diseño de cebadores y sondas para PCR de tiempo real**

### **4.5.1 Diseño de cebadores**

Para el ensayo de PCR, se requiere del diseño de pares de cebadores específicos, así como de una sonda por par a la cual se acople el indicador y el extintor para dar la cuantificación. El indicador posee una molécula que emite fluorescencia, la cual se emplea para detectar la formación del producto de amplificación, por lo que requiere de un extintor, el cual prevenga o reduzca la emisión de fluorescencia, hasta el momento en que ocurra la amplificación por los cebadores (Mackay y Landt, 2007). Generalmente se realiza la revisión bibliográfica de cebadores reportados, pero, para el diseño de nuevas pruebas, se utilizan genomas de interés reportados en bases de datos genéticas; de esto, las secuencias se alinean y se seleccionan las regiones conservadas de interés para diseño del cebador (Buitrón y Morillo, 2017).

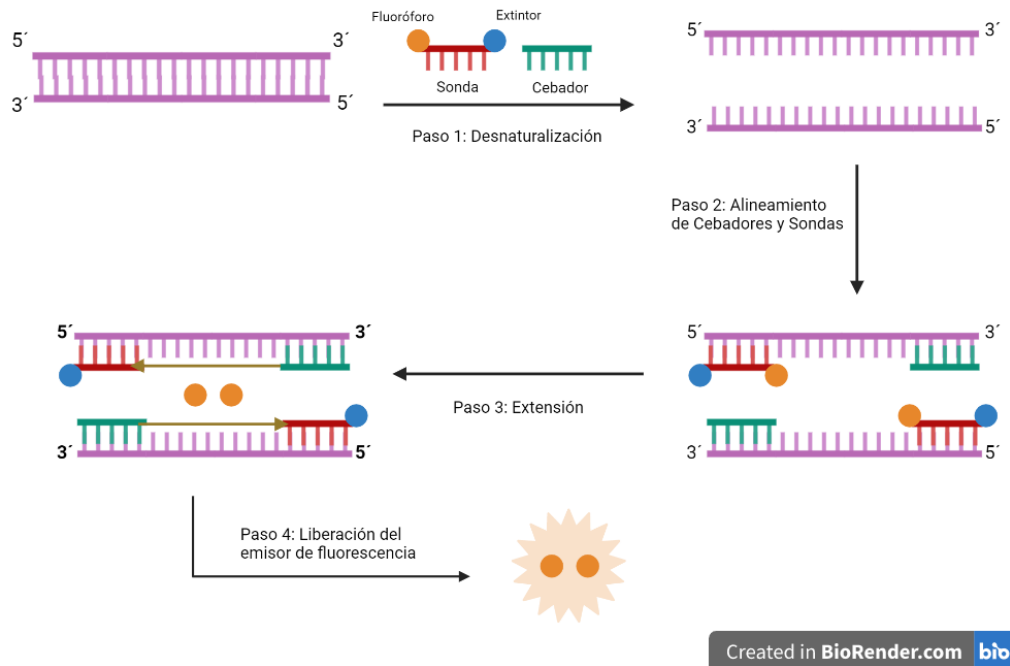
Es importante considerar que los cebadores deben de estar óptimamente diseñados, por lo que se deben de tomar en cuenta consideraciones en su diseño. Se debe de buscar una longitud de 18 a 30 bases para los cebadores, siendo 22 bases el valor óptimo para establecer un balance entre la pureza, especificidad, temperatura de fusión; respecto a la última, se recomienda una temperatura de fusión de 62°C como óptima, la cual no debe de diferir en 4°C entre ambos cebadores. En el caso del contenido de guanina y citosina, este debe de ser del 35 al 65% para cada cebador, siendo 50% el valor ideal; además, se debe de evitar contenidos de guanina o citosina de 3 o más bases seguidas, ya que puede causar el deslizamiento de la polimerasa (Nolan et al., 2014; Pazdernik et al., 2020).

### **4.5.2 Diseño de sondas**

Respecto a las sondas para la prueba de PCR, estas al igual que los cebadores, precisan de la unión específica a segmentos del material genético, por lo que se realiza el diseño de un tercer oligonucleótido, para ser el emisor de fluorescencia que permita la cuantificación (Nolan et al., 2014). El emisor de fluorescencia y el extintor a seleccionar son clave para el diseño, puesto que de su interacción se da la emisión o bloqueo de la fluorescencia (Figura 4). Esto se debe a que la proximidad entre ambos evita la detección

de fluorescencia, y el paso de la polimerasa resulta en la emisión de fluorescencia por liberación del marcador (Hawkins y Guest, 2017; Wittwer et al., 2001).

Figura 4. Procedimiento del PCR en tiempo real para la emisión de la señal fluorescente.



Fuente: Adaptado de Hawkins y Guest, 2017

En el diseño de sondas, se busca la cercanía de estas con los oligonucleótidos que actúan como cebadores, de manera que sea posible la liberación del emisor de fluorescencia. En cuanto a longitud, se recomienda que sea entre 20 y 30 bases, ya que en este intervalo se obtienen valores de temperatura de fusión ideales sin alterar la distancia entre el indicador fluorescente y el extintor; respecto a la temperatura de fusión, esta debe ser superior en 6-8°C respecto a la de los cebadores, por lo que se establece un rango entre 66 y 70°C para una unión adecuada al objetivo. Respecto al contenido de guanina y citosina, al igual que en el caso de los cebadores, se busca un rango de 35 a 65%, pero se recomienda evitar la presencia de guaninas en el extremo 5 terminal de la secuencia para evitar problemas de interacción con el indicador de fluorescencia (Nolan et al., 2014; Pazdernik et al., 2020).

### 4.5.3 Selección del marcador fluorescente y el extintor

Cuando se realizan las pruebas de PCR en tiempo real, se debe seleccionar la emisión de fluorescencia de la sonda utilizada en la amplificación, para poder facilitar el aislamiento de una señal para el análisis que permite cuantificar la concentración de material genético en cada ciclo. El fluoróforo o marcador fluorescente, va a depender del instrumento que se utiliza para realizar la reacción, debido a la compatibilidad de estos; de igual forma, el extintor de fluorescencia debe de ser compatible con el fluoróforo de manera que pueda reducir la emisión de fluorescencia previo a la amplificación del objetivo (Hawkins y Guest, 2017; Nolan et al., 2014). El Cuadro 2 detalla los fluoróforos comúnmente seleccionados en pruebas de tiempo real.

Cuadro 2. Marcadores fluorescentes comúnmente utilizados, y su longitud de onda de excitación y emisión

<b>Fluoróforo</b>	<b>Excitación (nm)</b>	<b>Emisión (nm)</b>
Alexa 530	350	440
FAM/SYBR Green	492	516
HEX/JOE/VIC	535	555
Cy3	545	568
TAMRA	556	580
ROX/Texas Red	585	610

Fuente: Adaptado de Sigma-Aldrich, 2008

En cuanto a los extintores de fluorescencia, se busca la compatibilidad con los marcadores fluorescentes acorde a la longitud de onda en que ambos actúan. El Cuadro 3 presenta los extintores comúnmente utilizados. TAMRA es altamente utilizado como fluoróforo y extintor, pero este, al contar con la capacidad de producir fluorescencia, genera una pobre señal cuando se utiliza como extintor, por lo que presenta complicaciones. Por este motivo, se ha optado por el uso de extintores oscuros, como los *Black Hole Quencher*, los cuales absorben la energía emitida por los fluoróforos, mientras emiten calor en lugar de fluorescencia; con esto, es posible actuar sobre un amplio rango de longitud de onda, lo

que hace a este tipo de extintores ideales para las pruebas (Hawkins y Guest, 2017; Nolan et al., 2014).

Cuadro 3. Extintores comúnmente utilizados y su rango de acción

<b>Extintor</b>	<b>Rango de acción</b>
<i>Black Hole Quencher – 1</i>	480-580 nm
<i>Black Hole Quencher – 2</i>	550-650 nm
<i>Black Hole Quencher – 3</i>	620-730 nm
TAMRA	550-576 nm
DABCYL	453

Fuente: Adaptado de Sigma-Aldrich, 2008

#### **4.5.4 Consideraciones de diseño**

Es importante evaluar la especificidad y calidad de los cebadores y sondas, ya que estos pueden presentar complicaciones tales como la auto complementariedad, que da la unión del cebador o sonda con si mismo formando un heterodímero, lo que da lugar también a la formación de estructuras secundarias como horquillas, de las cuales, la formación de estructuras conlleva a la emisión de fluorescencia que resulta ser de interferencia en la cuantificación de la región blanco (Thorton y Basu, 2015). Otra complicación presente es la formación de dímeros entre los demás cebadores y sondas diseñadas, donde se da la unión no específica entre oligonucleótidos, ya que la probabilidad de esto aumenta con el número de cebadores y sondas presentes. Por este motivo, se recomienda la búsqueda de regiones en la secuencia, que codifiquen específicamente para la especie de interés, y a partir de ello realizar el diseño de cebadores y sondas, de manera que la región conservada que se evalúe corresponda con su respectivo oligonucleótido. Esto último se relaciona con otra complicación presentada, y es la unión no específica de cebadores a la secuencia blanco, lo que interfiere con la amplificación y cuantificación específica de la prueba (Bustin y Huggett, 2017; Rodríguez et al., 2015).

#### 4.5.5 Herramientas para evaluar la funcionalidad y especificidad

Para establecer la viabilidad de los cebadores y sondas en la prueba de qPCR, se debe de evaluar la funcionalidad de estos, en la cual se reduzca la probabilidad de formación de dímeros, de estructuras secundarias, y la inespecificidad de hibridación. Para ello, se han empleado herramientas que permitan el diseño y verificación de la especificidad y calidad de cada oligonucleótido diseñado. La herramienta *Primer BLAST* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), fue desarrollada para el diseño de cebadores a partir de secuencias de interés, así como para verificar la especificidad entre los cebadores diseñados y la secuencia objetivo; esto, ubicando los cebadores en regiones de la plantilla que no comparten una gran similitud con otros organismos, por lo que se complementa con otras herramientas de NCBI para identificar organismos y regiones de similitud (Ye et al., 2012).

Se dispone también de herramientas para diseño de cebadores como lo es *PrimerQuest* de IDT®, la cual permite el diseño para pruebas de PCR tiempo real, donde el algoritmo genera los oligonucleótidos en base a la secuencia de interés, permitiendo evaluar las consideraciones de diseño como longitud, contenido de guanina y citosina, temperatura de fusión, y estabilidad. Con la herramienta, se puede evaluar también la formación de estructuras secundarias, y realizar pruebas *in silico* al configurar la herramienta con los parámetros de interés para la prueba de PCR (Harshitha y Arunaj, 2021; Owczarzy et al., 2008). En complemento a *PrimerQuest*, se presenta también *OligoAnalyzer*, la cual analiza las propiedades de cada secuencia de oligonucleótidos, así como permite el análisis individual y en conjunto de cebadores y sus posibles interacciones ya en la reacción, por lo que ha sido una herramienta ampliamente reportada para el análisis *in silico*, debido al asesoramiento que brinda respecto a modificaciones o condiciones de trabajo y reactivos en pruebas de tiempo real (Elkins, 2011; Pazdernik et al., 2020).

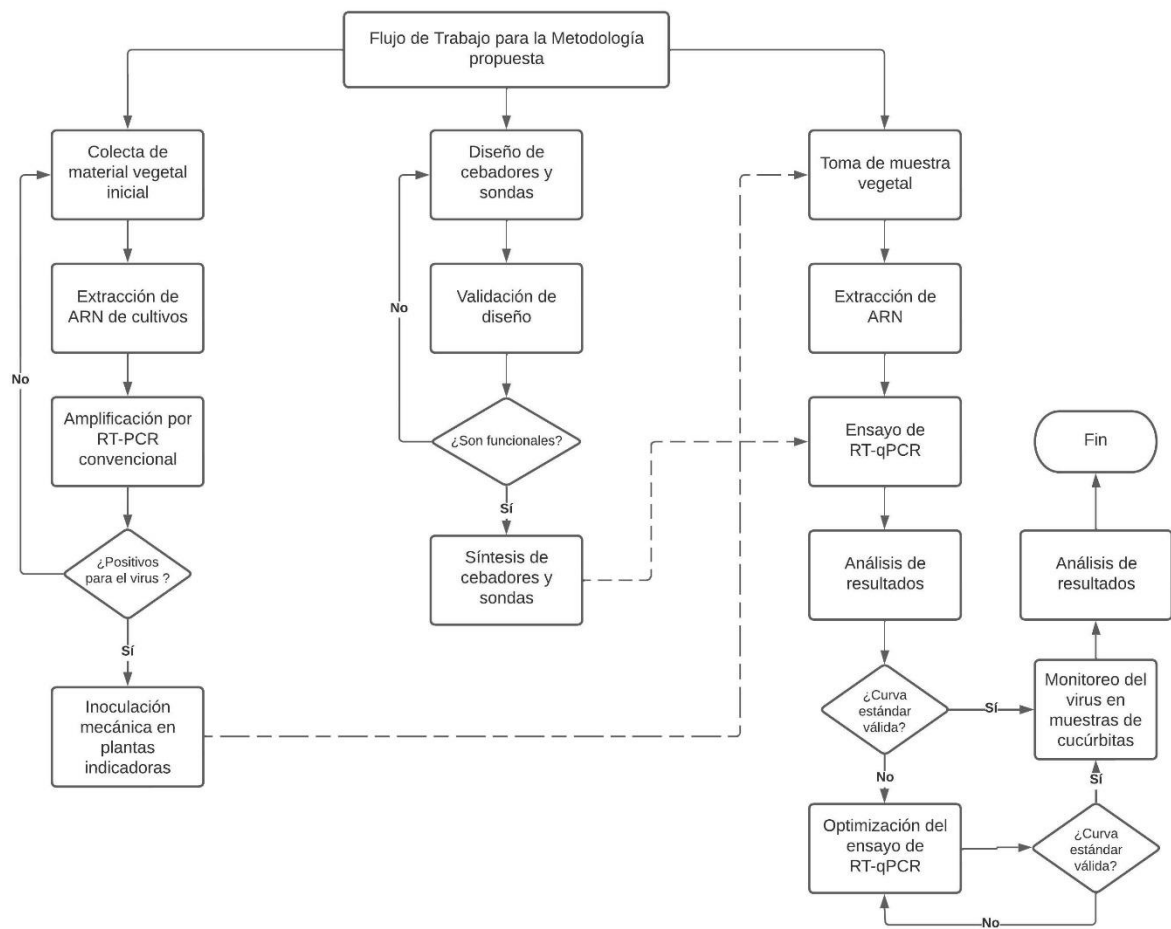
# V. METODOLOGÍA

## 5.1 Hipótesis

Se espera que la prueba de RT-qPCR a implementar permita la detección específica y sensible del virus CYSDV en muestras de cucurbitáceas, según el diseño y selección de cebadores y sonda, así como la optimización de la concentración de estos y de la temperatura de anillamiento.

## 5.2 Flujo de trabajo de la metodología a seguir

Figura 5. Flujo de trabajo propuesto para la investigación



### 5.3 Diseño de sondas y cebadores para el ensayo de RT-qPCR

Las regiones del genoma que se consideraron candidatas para el diseño de los cebadores y la sonda para CYSDV fueron la proteína p22, el homólogo a la proteína de choque térmico HSP70 y la proteína de cápside. Para ello se inició obteniendo secuencias disponibles en la base de datos de NCBI para la proteína de la cápside, mientras que las secuencias para el homólogo de HSP70 y de la proteína p22 fueron obtenidas del Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA) de la Universidad del Valle de Guatemala (Campus Central). De las secuencias seleccionadas, se generó un archivo de texto con los accesos a las secuencias, y se descargó un archivo tipo fasta con las múltiples secuencias del virus, mediante el uso de la herramienta *Batch Entrez* de NCBI. Los accesos a las secuencias de la región de la proteína de la cápside se presentan en el Anexo 1. El alineamiento de las secuencias fue realizado con el programa *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform* (MAFFT) en su versión online, para generar un archivo de múltiples secuencias alineadas. Para la visualización de los alineamientos se utilizó de la herramienta de visualización y edición de secuencias AliView v1.26 de Larsson (2014). Con esta, se visualizaron y seleccionaron las regiones mayoritariamente conservadas de las regiones candidatas, para obtener los cebadores y la sonda con base en las consideraciones generales de diseño establecidas por la literatura.

Una vez establecidos los cebadores y la sonda en las secuencias, estos se validaron utilizando múltiples herramientas. Para evaluar su especificidad a secuencias de la base de datos y establecer el tamaño del producto se empleó *Primer-Blast* de NCBI; además, de la misma, se utilizó *Blast* para evaluar similitudes de los oligonucleótidos con secuencias disponibles en la base de datos, de diversas especies y de los virus de interés. Se verificó la interacción del cebador y/o sonda entre sí y entre los demás para prevenir la formación de homo y heterodímeros, así como se la formación de estructuras secundarias y *hairpins*; esto mediante la herramienta *OligoAnalyzer* de *Integrated DNA Technologies* (IDT). Los cebadores y sondas seleccionados se analizaron en la herramienta *Multiple Primer Analyzer* de *ThermoFisher Scientific*, con el fin de evaluar la interacción en conjunto, donde se buscó que el porcentaje de guaninas y citosinas sea

del 50%, temperaturas de fusión que no difieran de 2°C entre cebadores y que difieran en 6°C como mínimo entre cebadores y sondas, y que la secuencia no presentara especificidad con las del resto de oligonucleótidos en la prueba.

#### **5.4 Colecta de material vegetal para la detección del CYSDV**

Los cultivos de cucúrbitas infectados se obtuvieron de LPV. Las muestras fueron conservadas de hoja fueron conservadas en frío con gel de sílice, mientras que las muestras de fruto se almacenaron a -20°C en un congelador. La toma de muestras sintomáticas se obtuvo del pericarpio o fruto de las cucurbitáceas, específicamente de la región cercana al pecíolo (corona), así como de la parte del mesocarpio cercana a la corteza del fruto, y de la hoja y flor del cultivo. De las muestras obtenidas para el año 2022, se realizó una extracción de ARN, seguido de una prueba de RT-PCR convencional, para confirmar la presencia de CYSDV.

El material vegetal positivo para el virus se empleó en la inoculación mecánica de este en plantas indicadoras conservadas en un invernadero con las adecuaciones para supervisar el desarrollo de la planta. Para obtener las diferentes muestras para el análisis por la prueba de RT-qPCR a diseñar, se seleccionaron los cultivos de cucúrbitas con síntomas característicos del virus. Los cultivos positivos se utilizaron para la optimización de la prueba. Para el monitoreo, se evaluó la presencia del virus en muestras de sandía y melón también pertenecientes a LPV, las cuales abarcaron el periodo de años entre 2017 y 2022.

#### **5.5 Extracción y cuantificación de ARN**

La extracción de ARN para las muestras obtenidas se realizó con base al protocolo establecido por Locali y asociados (2003), con modificaciones de LPV (Anexo 2). Se trabajó en un espacio desinfectado con cloro 10%, etanol 70% y solución para eliminar RNAsa. Las extracciones se mantuvieron en hielo hasta su uso ya sea en la prueba de RT-PCR convencional o en la prueba de RT-qPCR. El ARN obtenido, fue cuantificado empleando el protocolo de cuantificación de ácidos nucleicos para el espectrofotómetro UV-Vis *NanoDrop One* de *Thermo Fisher Scientific* (Anexo 3).

## 5.6 RT-PCR convencional

Se realizó la reacción de RT-PCR convencional para confirmar la presencia del virus en las muestras de ARN provenientes del material vegetal sintomático. La transcripción reversa se realizó siguiendo el protocolo establecido por Promega (2018) para el kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Anexo 4). Se preparó la mezcla de reacción acorde al número de reacciones (Cuadro 4). Los tubos de reacción se incubaron en el termociclador siguiendo los tiempos y temperaturas indicados en el Cuadro 5. Las muestras de ADNc obtenidas se almacenaron en frío (4°C) hasta su uso.

Cuadro 4. Preparación de mezcla de reacción para la transcripción reversa de muestras de ARN

<b>Transcripción reversa</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>1X (µl)</b>	<b>X (µl)</b>
Agua libre de nucleasas	3.875	
Buffer <i>GoScript™</i> 5X	4	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	
dNTP's (2.5mM)	4	
Rnasin (40U/µl)	0.125	
Transcriptasa reversa <i>GoScript™</i>	1	
<b>Total</b>	15µl	

Fuente: Promega, 2018

Cuadro 5. Temperaturas de incubación para la obtención de ADNc por transcripción reversa

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (Min)</b>
25	5
42	60
70	15

Fuente: Promega, 2018

La amplificación de CYSDV se realizó según la receta de PCR y el programa de amplificación establecidos por Álvarez y asociados (2012). Se preparó la mezcla de reacción siguiendo la receta indicada en el Cuadro 6. Los tubos se colocaron en el termociclador, donde se realizó la amplificación siguiendo el programa indicado en el Cuadro 7.

Cuadro 6. Preparación de mezcla de reacción para la amplificación de muestras de ADNc para la detección de CYSDV

Reactivo	1X (µl)	X (µl)
Agua grado molecular	15.8	
Buffer <i>GoTaq Green 5x</i>	5	
dNTP's	1	
Cebador CYSDV <i>Forward</i> MA156 5'-GAAGAATTCCAGGCAAGG-3'	1	
Cebador CYSDV <i>Reverse</i> MA129 5'-TCACATCATCAATCCAAAAG-3'	1	
Taq polimerasa	0.2	
ADNc	1	
<b>Total</b>	25µl	

Fuente: Álvarez et al., 2012

Cuadro 7. Programa de PCR para la amplificación de muestras de ADNc para la detección de CYSDV (Álvarez et al., 2012).

Programa de PCR para CYSDV			
Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	92°C	2 min	1
Desnaturalización de ADN	92°C	30s	34
Alineamiento de cebadores	53°C	30s	
Extensión de la polimerasa	72°C	30s	
Extensión final	72°C	10 in	1

Fuente: Álvarez et al., 2012

## 5.7 Inoculación mecánica de virus en plantas indicadoras

La inoculación mecánica de los virus se realizó acorde al protocolo de inoculación establecido por LPV (2021). Para supervisar la evolución de las plantas, se verificaron los síntomas desarrollados respecto a los controles cada 3 a 5 días (Anexo 5). Este procedimiento se realizó para obtener muestras vegetales positivas de CYSDV, de forma que se obtuviera una mayor cantidad de virus disponible para realizar la optimización de la prueba de RT-qPCR a implementar.

## 5.8 Optimización y validación de RT-qPCR

La prueba de RT-qPCR se realizó acorde al protocolo de Promega (2018) para el *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR Protocol* con modificaciones propias (Anexo 6). Se preparó la mezcla de reacción indicada en el Cuadro 8, manteniendo en frío los reactivos y la mezcla de reacción. Se configuró el programa de amplificación para el termociclador *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems* (Cuadro 9). Al finalizar la amplificación, se recolectaron y visualizaron los resultados.

Cuadro 8. Preparación de mezcla de reacción para la amplificación de muestras de ARN por RT-qPCR

<b>RT-qPCR Múltiplex</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>1X (µl)</b>	<b>X (µl)</b>
<i>GoTaq® Probe qPCR Master Mix</i>	10	
<i>GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR</i>	0.4	
Cebador <i>Forward</i>	1	
Cebador <i>Reverse</i>	1	
Sonda	1	
ARN	2-5	
Agua libre de nucleasas	X	
<b>Total</b>	20µl	

Fuente: Promega, 2018

Cuadro 9. Programa de PCR para la amplificación de muestras de ARN por RT-qPCR

<b>Programa de RT-qPCR Múltiplex</b>			
<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Transcripción reversa (RT)	45°C	15 min	1
Inactivación de la RT Activación de la <i>GoTaq® Polymerase</i>	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	15s	40
Alineamiento y extensión	60°C	1 min	

Fuente: Promega, 2018

El ensayo de RT-qPCR puede verse comprometido por diversos factores que puedan alterar la reacción; por este motivo, se realizaron pruebas de optimización con modificaciones en la temperatura de alineamiento y extensión, así como de concentraciones de los reactivos, de forma que fuese posible establecer las condiciones óptimas de trabajo para obtener una mejor detección.

Para la validación de la prueba, se siguió el protocolo de validación y análisis de datos en pruebas de qPCR establecidas por Pazdernik y colaboradores (2020). Al finalizar el ensayo de RT-qPCR, se obtuvo la curva de amplificación lineal y logarítmica para establecer el número de ciclos de la amplificación para detectar el virus. También se obtuvo también la curva estándar, donde se preparó una serie de diluciones de la muestra, para graficar la cantidad del producto de amplificación respecto al ciclo de cuantificación. Para considerar el ensayo de qPCR como exitoso, se considera un rango de eficiencia de 90-110%. Este valor de eficiencia es presentado por el equipo al realizar la curva estándar.

Se estableció también el límite de detección mediante la curva estándar para determinar la concentración más baja a la que se detecta el 95% de muestras positivas en el ensayo diseñado. Se obtuvo también el límite de cuantificación para representar la cantidad más baja de muestra que se puede cuantificar de forma precisa.

## 5.9 Monitoreo de CYSDV en cucúrbitas

Para evaluar la presencia del CYSDV en departamentos de Guatemala, se seleccionaron cultivos de sandía y melón pertenecientes a LPV, previamente positivos o negativos para otros virus de cucúrbitas. Las muestras obtenidas representaron a departamentos productores de cucúrbitas, por lo que se evaluó la presencia del virus en el periodo de años entre 2017 y 2022. A estas, se les realizó la prueba de RT-qPCR, ya establecida y optimizada, para así identificar los cuáles cultivos se presenta el CYSDV, así como la fecha y departamento de proveniencia para lograr el monitoreo del virus (Cuadro 10).

Cuadro 10. Departamentos de Guatemala evaluados en el monitoreo de CYSDV

<b>Departamentos</b>	<b>Muestras evaluadas</b>
Zacapa	28
Santa Rosa	4
Jutiapa	6
Escuintla	3
Suchitepéquez	1
El Progreso	6
Desconocido	3

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Diseño de cebadores y sonda para la prueba de RT-qPCR

De las regiones candidatas para la obtención de los cebadores y la sonda, se obtuvo un total de 100 secuencias para la proteína de la cápside, 89 secuencias para la proteína p22, y 14 secuencias para la proteína de choque térmico HSP70. Del alineamiento de estas, se seleccionó la región de la proteína de la cápside, donde se observó una secuencia ampliamente conservada para esta región en las secuencias analizadas, por lo que se utilizó esta para la selección de la sonda y los cebadores que se presentan en el Cuadro 11. Dichos segmentos de la región seleccionada se identifican en la Figura 6.

Cuadro 11. Cebadores y sonda diseñados para la detección y monitoreo de CYSDV

Cebador/Sonda	Secuencia (5'-3')
CYSDV_Fw	ATTGAAGGCAACAGGAAAGG
CYSDV_Rv	GCCAAATCGTCTTCGGATAT
CYSDV_Pr	JOE-ACCATCATCTTCAAGCGAAACATGG-BHQ1

La evaluación de dichas secuencias demostró su especificidad al CYSDV, así como carece de la formación de homo y heterodímeros, y no presenta la formación de estructuras secundarias y *hairpins*. Respecto al porcentaje de guaninas y citosinas este fue de 45% para los cebadores y de 44% para la sonda, y en el caso de la temperatura de fusión, esta fue de 58°C para el cebador *forward*, de 56.6°C para el cebador *reverse*, y 61.7°C para la sonda. De estos, se obtuvo un producto de amplificación de 132 pares de bases.

Figura 6. Secuencia del gen de la proteína de cápside de CYSDV obtenida de NCBI con los cebadores y la sonda identificados.

>MF960769.1

CACGTGGAAGATGAGTCTGACAATGAAACAAAGGGTGTGGCAAAGAAAGAT  
ATCGATGGTGATAACAAATCCACCTACAATCCTAGGGATCTGATCACCGCAG  
ATCACATGGATCCAACGAAATTGAAAGACATCAAGGTCTTTTCAAATAGAGC  
AGATGTGATGAGTGATCAAGATGAAGCAACCTTTGCTAAGTGCATGAAAGAT  
TTTGCAACCATAGTTTTTTGGAAAAGAACCTGACGAGAAAGAATTCTTAACCTT  
TTACATAAGCTTGGTTCAATGTTGGTTAAACCAGAGCACGTCAATGAAGAAC  
GCCAAACAGATGAATCTGACCAACACACTCATGCACGGTGACCAAAGAAGA  
CATGGAGGACGGCTGACTTTATCAATTATGTTAAGGGGAACCTTCCACACGTG  
CCCAACCCGTTTCGACAATACGCCAGGGCTCATGAACATGAAATTGAGATAT  
TGAAGGCAACAGGAAAGGTCACTGTTGACCATCATCTTCAAGCGAAACATGG  
GGTATTACCGCAGTTTTTGGAAATGTTCCAGCAGATTATGTCAATGGTTCGTTAA  
TGAACATATCCGAAGACGATTTGGCAGCCAATCTGTTGATGAAATGCCAGGC  
TTTGAAAAGAAACGAGAAA

- Cebador CYSDV\_Fw
- Cebador CYSDV\_Rv
- Sonda CYSDV\_Pr

## 6.2 Optimización de RT-qPCR

La evaluación inicial de la prueba se realizó con los cultivos inoculados de CYSDV, los cuales se presentan en la Figura 7. Estos se caracterizaron por presentar síntomas como necrosis general, aclaramiento de venas, amarillamiento de bordes, puntos necróticos, y por contar con posible daño por insecto. Adicionalmente, los controles sin inóculo del virus para el cultivo de melón presentaron los síntomas anteriormente mencionados.

Figura 7. Cultivos inoculados con CYSDV para la optimización de RT-qPCR

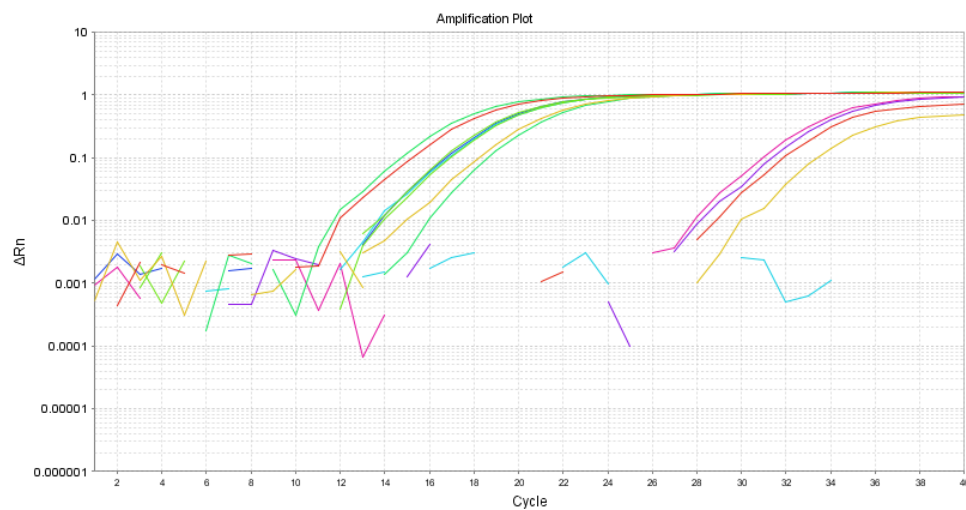


Descripción: A) Cultivo de melón variedad Edisto, inoculado con virus proveniente de sandía. B) Cultivo de sandía variedad Mickey Lee, inoculado con virus proveniente de sandía. C) Cultivo de sandía variedad Mickey Lee, inoculado con virus proveniente de sandía. D) Cultivo de melón variedad Edisto, sin inóculo de virus.

Se evaluó la concentración de sonda y cebadores para la detección del virus, así como la temperatura de anillamiento y extensión. Para esta, se modificó la temperatura a 62°C para aproximarla a un valor cercano a la temperatura de anillamiento de la sonda,

mientras que se mantuvo una concentración mínima de 0.1µM de cebadores y sonda. Adicionalmente, se trabajó la muestra en su concentración original, y con diluciones 1:5 y 1:10 para evaluar el rango de detección. La prueba inicial presentó resultados positivos para las tres concentraciones de muestra evaluadas, detectando el virus en todas las plantas indicadoras, exceptuando en el control negativo de la prueba. Eso se observa de manera gráfica en la Figura 8.

Figura 8. Curva de amplificación de muestras vegetales con inóculo de CYSDV para la optimización de la prueba de RT-qPCR



Se observó una variación leve entre el valor Ct de la muestra y sus respectivas diluciones, como se presenta en el Cuadro 12. Por lo tanto, se consideró como óptimas las condiciones utilizadas para la amplificación del material genético del CYSDV.

Cuadro 12. Valores Ct similares para las muestras en la amplificación para la optimización de RT-qPCR

Muestra	Dilución	Concentración de cebador (µM)	Concentración de sonda (µM)	Valor Ct
Sandía	Original	0.1	0.1	15.17
	1:5	0.1	0.1	17.33
	1:10	0.1	0.1	17.19

De la optimización, se obtuvo las condiciones finales de trabajo, donde la concentración y cantidad óptima de reactivos se presenta en el Cuadro 13, siendo 0.1µM el mejor valor de concentración para trabajar con la sonda y los cebadores, mientras el programa de RT-qPCR a utilizar (Cuadro 14), presenta el cambio en la temperatura de anillamiento y extensión, la cual fue de 62°C.

Cuadro 13. Mezcla de reacción final para la amplificación de muestras de ARN de CYSDV por RT-qPCR

<b>Reactivo</b>	<b>1X (µl)</b>
<i>GoTaq® Probe qPCR Master Mix</i>	10
<i>GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR</i>	0.4
Cebador <i>Forward</i> (CYSDV_Fw) 0.1µM	0.2
Cebador <i>Reverse</i> (CYSDV_Rv) 0.1µM	0.2
Sonda (CYSDV_Pr) 0.1µM	0.2
ARN	2
Agua libre de nucleasas	7
<b>Total</b>	20µl

Adaptado de Promega (2018) con modificaciones propias.

Cuadro 14. Programa de RT-qPCR optimizado para la amplificación de muestras de ARN de CYSDV.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Transcripción Reversa (RT)	45°C	15min	1
Inactivación de la RT Activación de la <i>GoTaq® Polymerase</i>	95°C	2min	1
Desnaturalización	95°C	15s	40
Alineamiento y extensión	62°C	1min	

Adaptado de Promega (2018) con modificaciones propias.

### 6.3 Validación de RT-qPCR

Se realizó una curva estándar partiendo de una muestra de 427.7 ng/ul de concentración con una pureza de A260/280 de 2.05, y A260/230 de 1.83. De esta se realizaron diluciones seriadas desde 1:10 hasta 1:100 (Figura 9). Para generar la curva, se emplearon las condiciones optimizadas de RT-qPCR. Se obtuvo la ecuación de la recta, la cual fue  $y = 21.932 - 3.38x$ ; esta presentó un  $R^2$  de 0.996, y una eficiencia del 97.624% (Figura 10).

Figura 9. Primera curva de amplificación estándar con diluciones seriadas

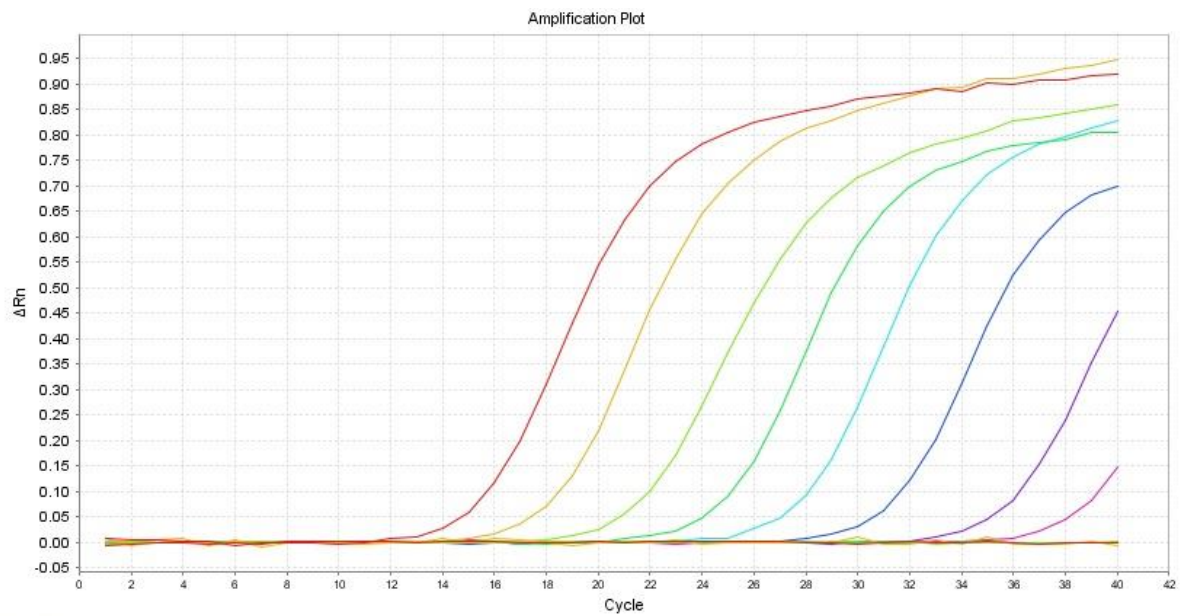
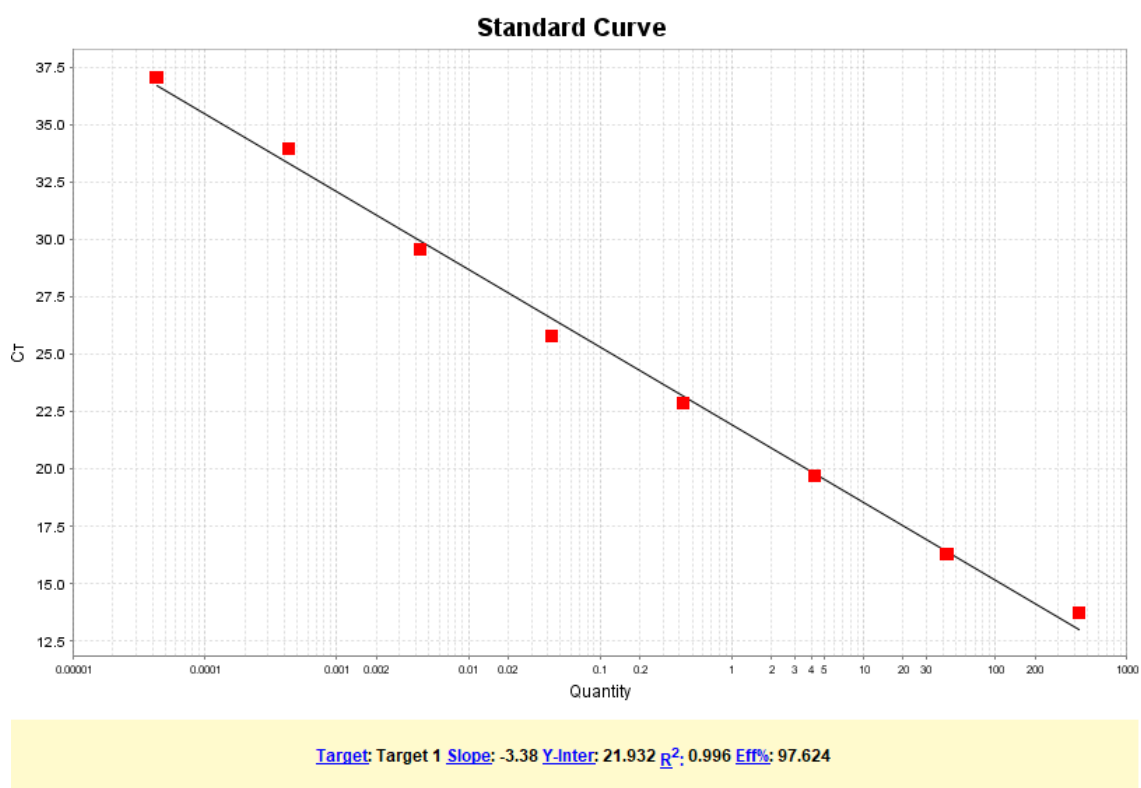


Figura 10. Primera validación de la prueba de detección de CYSDV



Se realizó una segunda curva estándar para evaluar la detección ante una menor concentración. La muestra evaluada presentó una concentración de 351.5 ng/ul con una pureza de A260/280 de 1.98, y A260/230 de 1.84. De igual forma que en la curva anterior, se realizaron diluciones seriadas desde 1:10 hasta 1:100 (Figura 11). Se obtuvo la ecuación de la recta, la cual fue  $y = 25.814 - 3.335x$ ; esta presentó un  $R^2$  de 0.991, y una eficiencia del 99.457% (Figura 12).

Figura 11. Segunda curva de amplificación estándar con diluciones seriadas

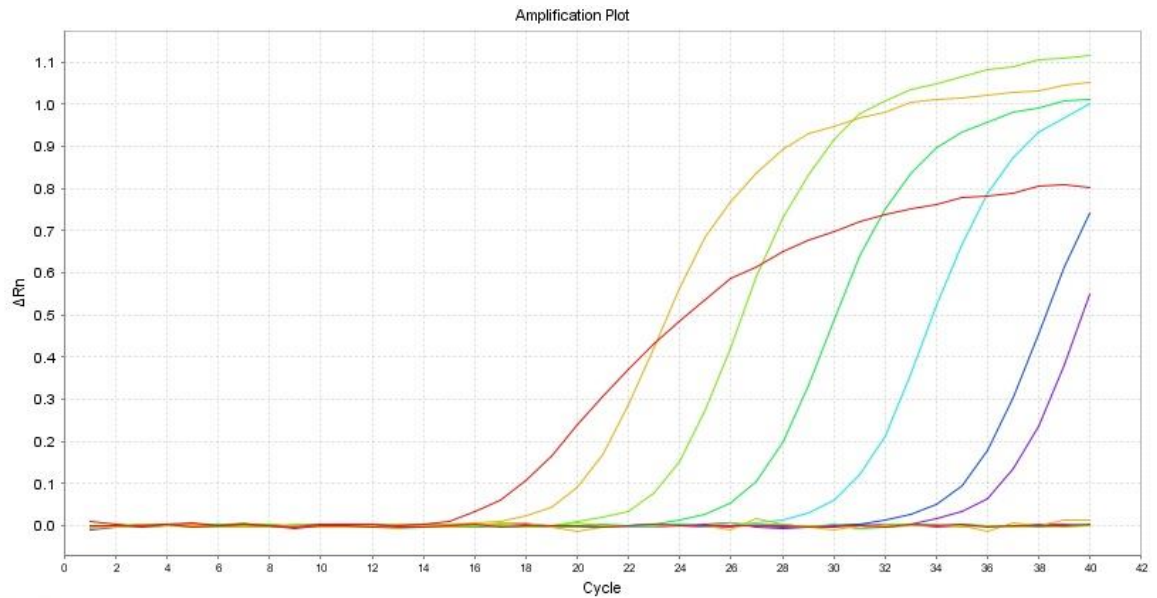
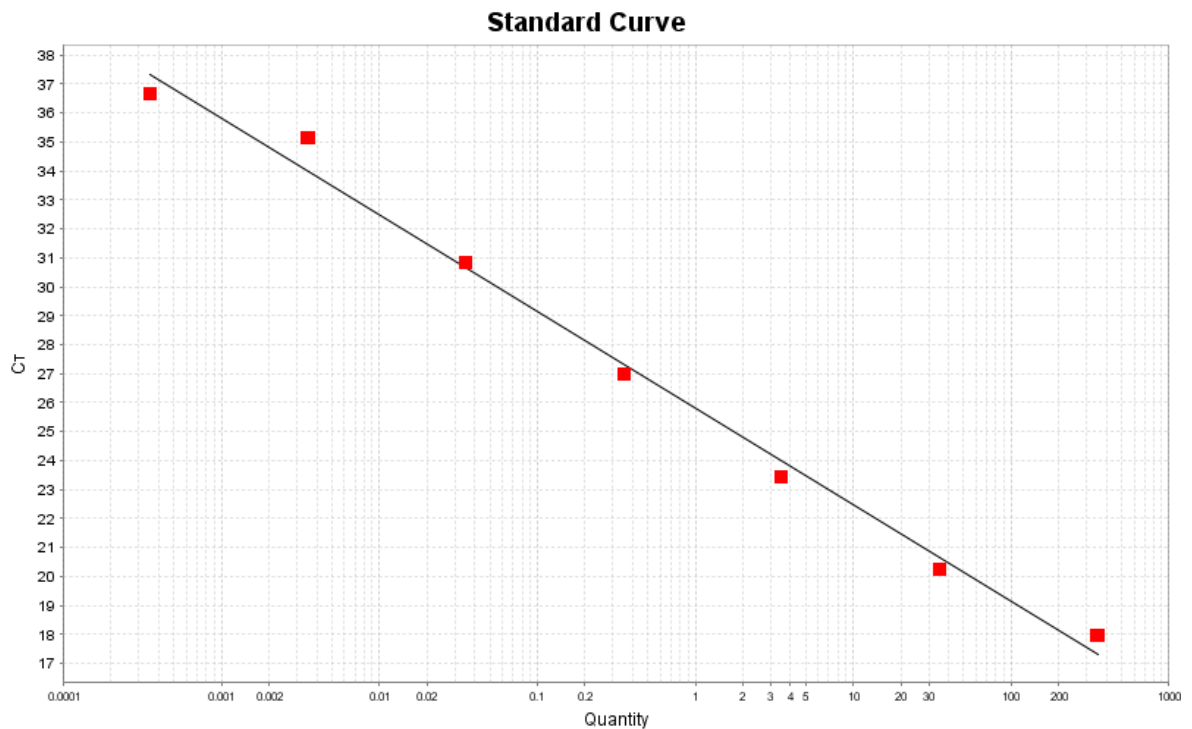


Figura 12. Segunda validación de la prueba de detección de CYSDV



Target: Target 1 Slope: -3.335 Y-Inter: 25.814 R<sup>2</sup>: 0.991 Eff%: 99.457

Respecto al límite de cuantificación de la primera validación, se obtuvo un valor de  $4.27 \times 10^{-5}$  ng, mientras que, para la segunda validación, el límite fue de  $3.51 \times 10^{-4}$  ng. Por lo tanto, las diluciones preparadas deben permitir que las muestras de ARN que se emplean para la prueba puedan ser detectadas hasta  $4.27 \times 10^{-5}$  ng que fue el valor de cuantificación más bajo.

## 6.4 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN para las muestras evaluadas presentó concentraciones variadas de este, como se presenta en el Cuadro 15. En promedio, el ARN extraído de las muestras vegetales fue de 1319.07 ng/ul, por lo que se contaba con suficiente plantilla para que los cebadores y la sonda sintetizados realizaran la amplificación de este por la prueba de RT-qPCR. De los valores de pureza, se obtuvo, al igual que con la concentración, valores variados para la absorbancia A260/280 y A260/230. Los datos de cuantificación individuales para las muestras analizadas se presentan en el Anexo 7.

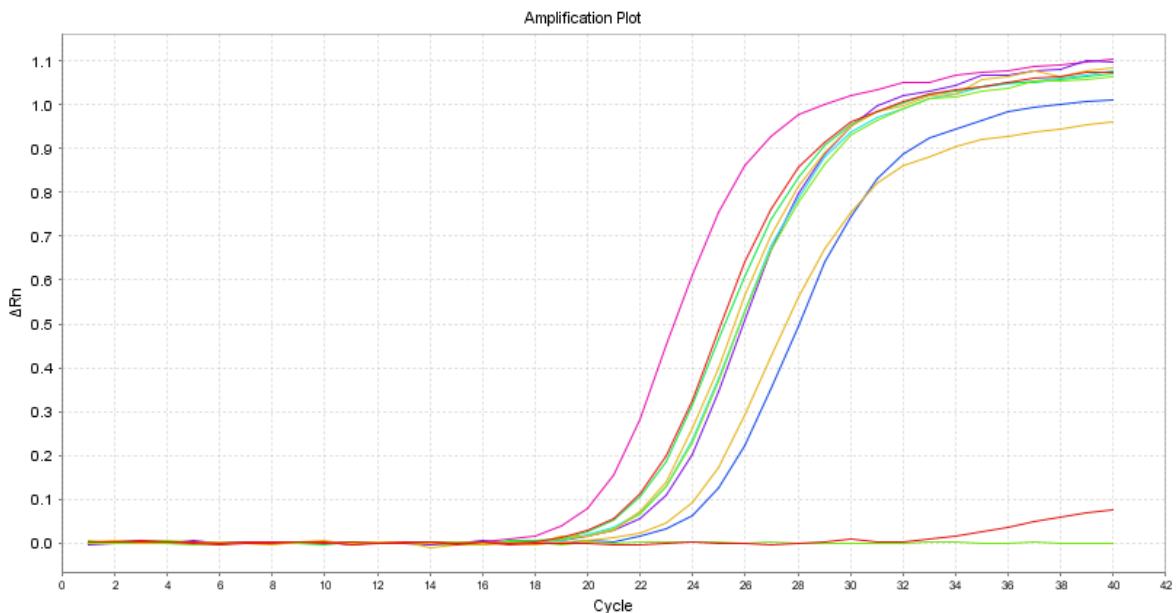
Cuadro 15. Resumen estadístico de la cuantificación de ARN de las muestras evaluadas

	<b>Concentración (ng/ul)</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>
<b>Media</b>	1319.07	1.83	1.53
<b>Desviación estándar</b>	±1935.95	±0.21	±0.36
<b>Valor máx.</b>	10656.20	2.13	2.16
<b>Valor mín.</b>	25.60	0.99	0.51

## 6.5 Monitoreo del CYSDV en Guatemala por RT-qPCR

El monitoreo fue efectuado en 51 muestras de sandía y melón pertenecientes a los departamentos de Zacapa, El Progreso, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla y Suchitepéquez, las cuales fueron obtenidas entre 2017 y 2022. Como se presenta en la Figura 13, las muestras trabajadas presentaron resultados positivos para el virus, con una amplificación adecuada, con valores Ct que van acorde a los resultados de optimización de la prueba. Es importante mencionar que la mayoría de las muestras evaluadas, presentaba una infección por SqVYV, además de CYSDV, por lo que la prueba permitió identificar de forma específica el virus de interés.

Figuras 13. Curva de amplificación de RT-qPCR para el monitoreo de CYSDV



Se obtuvo resultados positivos para 47 de las 51 muestras evaluadas, lo que representa un 92.16% del total de muestras. Las cuatro muestras negativas corresponden a El Progreso, Jutiapa, Zacapa y un sitio desconocido. Se identificó el CYSDV en los cultivos de todos los años trabajados, por lo que se establece que acorde a las muestras, el virus se presenta de forma constante en Guatemala desde el año 2017 hasta la fecha. Todos los departamentos que fueron evaluados (El Progreso, Zacapa, Jutiapa, Santa

Rosa, Escuintla y Suchitepéquez) se presentan afectados por el virus como se evidencia en la Figura 14. Cabe resaltar que estos representan a las regiones central, nororiente, suroriente y suroccidente del país.

Figura 14. Departamentos de Guatemala con cultivos positivos para CYSDV



Fuente: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 (CC BY-SA 3.0) con modificaciones propias

## VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El trabajo fue realizado con el fin de implementar una prueba de RT-qPCR que permita la detección del virus CYSDV que afectan a cucurbitáceas de interés comercial nacional. Por ello se realizó el diseño de cebadores y sonda, se optimizó y validó la prueba de RT-qPCR, para finalmente evaluar la presencia del virus en Guatemala.

Para el diseño de los cebadores y la sonda, se contaba con tres regiones candidatas. De estas se seleccionó finalmente la región de la proteína de la cápside ya que presentó la mayor similitud entre secuencias de distintos aislamientos de CYSDV, lo que permitió seleccionar los cebadores y la sonda de manera que tengan coincidencia con la mayoría de las secuencias. En el caso de las secuencias de la proteína p22, se observó una mayor diversidad en los aislamientos del país, pero se presentó también la formación de dímeros y otras estructuras secundarias. Para el homólogo de la HSP70 ocurrió el caso que la diversidad de secuencias no permitió la selección de un sitio específico en la secuencia para diseñar los cebadores y la sonda. La similitud de secuencia observada para la proteína de la cápside se debe a que los aislamientos del grupo occidental de CYSDV presentan una variación genética baja respecto al gen codificante para la proteína de la cápside, la cual se mantiene pese a la distancia geográfica y la separación temporal, lo que se asocia a la expansión del virus en todo el mundo y el modo de transmisión (Rubio et al., 2001).

Por ello, los cebadores y la sonda seleccionados fueron altamente específicos para el CYSDV, ya que la región seleccionada se caracteriza por una estabilidad genética tanto espacial como temporal. En el caso de las otras regiones candidatas, estas se evaluaron debido a estudios previos que utilizan dichas regiones para la detección del CYSDV (Lee et al., 2011; Álvarez et al., 2012; Abrahamian et al., 2013). Se seleccionó el homólogo a la proteína de choque térmico HPS70 ya que los virus de la familia *Closteroviridae* son caracterizados por la presencia de este gen (Livieratos, Avgelis y Coutts, 1999). Respecto a la proteína p22, su selección fue debido a que los Crinivirus presentan entre 0 y 3 marcos de lectura abiertos en la región del ARN1, por lo que esta proteína es codificada en uno de los marcos de CYSDV (Kataya et al., 2009).

De la extracción de ARN de tejido vegetal, tanto para la optimización de la prueba molecular, como para el monitoreo, se obtuvo una concentración media de 1319.07 ng/ul, con valores de absorbancia medios de 1.85 para la lectura A260/280, y de 1.63 para la lectura A260/230. De la concentración, la media obtenida evidencia que esta es suficiente para el análisis, considerando que la recomendación del sistema de RT-qPCR usado es de emplear al menos 100ng de ARN puro (Promega, 2018). Es importante resaltar que este material genético no es únicamente del virus CYSDV, sino que se presenta el ARN tanto viral como vegetal.

De los valores de pureza obtenidos, se observa que la lectura para A260/280 es inferior a 2.0, lo que indica que se presentó contaminantes en las muestras con estos valores. Esto podría asociarse a la presencia de fenoles u otros reactivos empleados en la extracción de ARN (Thermo Fisher Scientific, 2011). Este dato podría presentar una excepción, puesto que se ha sugerido que, para el ARN, la lectura A260/280 puede considerarse como aceptable a partir de lecturas de 1.5 o 1.8 (Viljoen, Nel y Crowther, 2005; Fleige y Pfaffl, 2006). Para las lecturas de A260/230, se considera un rango de 1.8 a 2.2 para considerar como puro el aislamiento de material genético; en este caso, las muestras fuera del rango indican la presencia de contaminantes. Al ser una muestra vegetal, esta puede presentar problemas en dicha lectura debido a carbohidratos remanentes que suelen afectar la pureza; otro elemento que podría afectar son residuos de fenoles utilizados en la extracción del ARN (Thermo Fisher Scientific, 2011).

Respecto a la optimización de la prueba de RT-qPCR, la concentración de la sonda y los cebadores fue efectiva para la amplificación del material genético del virus, ya que se obtuvo un valor de Ct bajo y una buena señal de fluorescencia al emplear la concentración de 0.1µM, lo que el aumento de este conllevaría la acumulación de productos no específicos o posiblemente de dímeros. Al estar cerca del límite de concentración sugerida para estos (0.05µM), se evidencia que la concentración obtenida es baja, pero no corre el riesgo de presentar una baja señal fluorescente, así como evidencia que el material genético presente en las muestras es abundante (Sigma-Aldrich, 2008; Rodríguez et al., 2015). Para la

temperatura de anillamiento y extensión, el programa sugiere un valor de 60°C para las pruebas de tiempo real. Al ser la temperatura estimada para la sonda de 61°C se optó por evaluar la amplificación utilizando un valor de 62°C para el paso de anillamiento y extensión, debido a las variaciones entre la temperatura teórica y la experimental. De esto, se obtuvo también valores bajos de Ct por lo que dicha temperatura es ideal para trabajar con los cebadores y la sonda diseñados. De igual forma, se evidenció que los valores de Ct se mantienen bajos en diluciones de la muestra, por lo que se da por optimizada la prueba, ya que dichos valores fueron los más bajos ante la temperatura y concentración empelada (Rodríguez et al., 2015; Zhao et al., 2021).

Para la validación de la prueba, las curvas estándar generadas permitieron establecer parámetros que actuaran como soporte para indicar que los resultados de detección del genoma viral por la RT-qPCR diseñada son válidos, tales como la eficiencia, especificidad, y el límite de cuantificación. Se obtuvo un porcentaje de eficiencia de reacción en un rango de 97.624 a 99.457%, lo cual indica que, el número de moléculas amplificadas por ciclo, entra en el rango de la literatura que establece que se duplican los productos en cada ciclo; este rango es de 90-110% (Kralik y Ricchi, 2017; Pazdernik et al., 2020). Bajo dicha premisa, la prueba presenta una eficiencia adecuada, la cual se acerca al 100% ideal, pero se toma en consideración la secuencia de las sondas y cebadores, las condiciones de la reacción, y las posibles impurezas en las muestras analizadas.

Es importante mencionar que en la prueba no se detectó la presencia de inhibidores que afectaran la amplificación, así como no se presentan errores de pipeteo, ya que el coeficiente de determinación  $R^2$  fue superior a 0.98 (0.996 para la primera validación y 0.992 para la segunda), por lo que la evaluación de la eficiencia de reacción por la curva estándar evidenció también la ausencia de elementos que causen interferencia (Kralik y Ricchi, 2017). Esto se da soporte a la especificidad de la prueba y diseño de oligonucleótidos, ya que se identificó de forma correcta las muestras positivas para el virus, de igual forma, el diagnóstico fue sensible para la detección específica de CYSDV en cultivos que presentaron una coinfección por el *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), otro

virus que afecta a cucúrbitas, lo que indica que la prueba se dirige a una única secuencia para realizar la amplificación (Rodríguez et al., 2015; Kralik y Ricchi, 2017).

Respecto al límite de cuantificación, para la primera validación se presentó el valor de  $4.27 \times 10^{-5}$  ng, mientras que, para la segunda, el límite obtenido fue de  $3.51 \times 10^{-4}$  ng, lo que indica que dicho rango establece la cantidad más baja a la cual se detectó el CYSDV con una precisión aceptable, considerando las condiciones establecidas para la prueba (Forootan et al., 2017; Pazdernik et al., 2020). Por ello se debe procurar trabajar con muestras cuya concentración de ARN no sea menor de dichos valores para obtener resultados confiables, resaltando nuevamente que el material genético con el que se trabaja no es únicamente del CYSDV, sino también de la muestra vegetal.

Referente al monitoreo del CYSDV en Guatemala, del total analizado, se obtuvo que el 92.16% de las muestras fueron positivas para el CYSDV. Esto indica que el virus se presenta al menos desde el año 2017 en todos los departamentos muestreados. Acorde al MAGA (2016), los principales departamentos productores de melones y otras cucúrbitas son Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa, Suchitepéquez, Escuintla y El Progreso; respecto a los cultivos evaluados, estos pertenecían a todos los departamentos productores mencionados. La presencia del CYSDV en Guatemala fue mencionada en el 2007 como parte de un estudio realizado en Estados Unidos y México, donde se reportó del surgimiento del virus en Arizona y Sonora, por lo que se toma este dato como el registro de mayor antigüedad del fitopatógeno en el país, pese a que la información específica para Guatemala no haya sido publicada (Brown et al., 2007; Álvarez et al., 2012).

Las muestras identificadas como positivas para el CYSDV por la prueba empleada fueron previamente descritas como positivas para el virus SqVYV; esto concuerda con lo indicado en el primer reporte del virus SqVYV en Guatemala, estudio realizado en Estados Unidos, en el cual se informó de la presencia de síntomas característicos al CYSDV en Zacapa, que resultó en la presencia de coinfecciones entre los dos virus mencionados en cucúrbitas de Guatemala (Jeyaprakash et al., 2015).

En cuanto a la descripción previa del CYSDV en América, los estudios de Estados Unidos y México mencionan que el vector de transmisión de este ha sido identificado como el biotipo B o especie MEAM1 de *B. tabaci*, por lo tanto, se recomienda realizar el monitoreo del vector, así como del virus, para identificar si se trata de dicho biotipo, ya que se asocia a una transmisión eficiente del virus (Moreno et al., 2009; Kaur et al., 2019; Wintermantel et al., 2019). De igual forma, se requiere de la secuenciación del virus obtenido en Guatemala para evaluar similitudes entre los aislamientos obtenidos en México y Estados Unidos, de manera que pueda corroborarse si la variación genética de la subpoblación del virus en América es baja, puesto que se ha descrito a tal como uniforme y de baja diversidad genética por la rápida expansión que ha tenido tanto el CYSDV como su vector (Rubio et al., 2001; Moreno et al., 2009).

Finalmente, con la evidencia de la presencia del CYSDV en los departamentos productores de cucúrbitas es importante emplear métodos de prevención de la diseminación del virus, así como de control del vector transmisor. Para ello, se propone emplear el uso de antagonistas biológicos que reduzcan las poblaciones de *B. tabaci*, para impedir la diseminación del virus. De igual forma, se sugiere eliminar las fuentes donde *B. tabaci* pueda reproducirse, para prevenir el desarrollo de esta. Como enfoque de estudio a futuro, se puede evaluar la resistencia natural y/o la resistencia inducida por modificaciones genéticas de manera que se recupere la productividad agrícola al reducir la pérdida de cultivos afectados por el virus (Marco et al., 2003; Castle, Palumbo y Prabhaker, 2009; Castle et al., 2016).

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se estableció la prueba de detección del *Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus* en el fruto y hoja de las cucúrbitas, con la cual fue posible detectar la presencia del virus en muestras comerciales, a partir del diseño de oligonucleótidos específicos para la proteína de la cápside del virus.
2. Se estableció que la concentración final de los reactivos debe de ser de 0.1µM tanto para los cebadores como para la sonda. En el caso de las condiciones de amplificación, se estableció una temperatura de anillamiento y extensión óptima de 62°C.
3. Se validó la reacción utilizando los cultivos de cucúrbitas con inóculo del virus. De la reacción se obtuvo un rango de eficiencia de 97.624 - 99.457% para la detección de CYSDV.
4. Se determinó el límite de cuantificación para la prueba mediante la curva estándar de validación, siendo este de  $4.27 \times 10^{-5}$  ng, que establece la cantidad es la más baja a la cual se detectó el CYSDV.
5. Se obtuvo una alta especificidad al virus con la prueba de RT-qPCR, con la cual, fue posible realizar el monitoreo.
6. De las muestras trabajadas, el 92.16% de estas fueron positivas para el CYSDV, las cuales representan a los departamentos productores de cucúrbitas entre 2017 y 2022.
7. Los resultados obtenidos del monitoreo demostraron que el virus está establecido en plantaciones del país, por lo que se precisa del monitoreo constante del CYSDV, así como el control poblacional del vector para reducir las pérdidas comerciales y económicas.

## **IX. RECOMENDACIONES**

1. Secuenciar el material genético extraído para evaluar la diversidad genética del CYSDV en América.
2. Evaluar la especificidad de detección del CYSDV al utilizar muestras positivas para múltiples enfermedades que afectan a las cucúrbitas.
3. Incorporar la prueba a un ensayo de RT-qPCR múltiplex donde se pueda detectar de forma simultánea a los virus más representativos que afectan a las cucúrbitas.
4. Determinar los hospederos vegetales susceptibles al CYSDV.
5. Emplear la prueba para realizar el monitoreo constante del virus en el país para tomar medidas preventivas.
6. Una vez establecidos los cultivos infectados, se sugiere emplear agentes biológicos antagonistas para reducir las poblaciones del vector, de manera que se pueda prevenir su desarrollo y la propagación del CYSDV.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamian, P. E., Seblani, R., Sobh, H., & Abou-Jawdah, Y. (2013). *Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR*. Journal of Virological Methods, 193(2), 320–326. doi:10.1016/j.jviromet.2013.06.004
- Abubakar, M.; Koul, B.; Chandrashekar, K.; Raut, A.; Yadav, D. (2022). *Whitefly (Bemisia tabaci) Management (WFM) Strategies for Sustainable Agriculture: A Review*. Agriculture 2022, 12, 1317. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091317>
- Aguilar, J. M., Franco, M., Marco, C. F., Berdiales, B., Rodriguez-Cerezo, E., Truniger, V., Aranda, M. A. (2003). *Further variability within the genus Crinivirus, as revealed by determination of the complete RNA genome sequence of Cucurbit yellow stunting disorder virus*. Journal of General Virology Volume 84, Issue 9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19209-0>
- Álvarez-Ojeda, M. G., Guerrero-Gámez, C. E., Morales-Loredo, A., Chew-Madinaveitia, Y. I., Gutiérrez-Mauleón, H., Alvarado-Gómez, O. G. (2012). *Detección por RT-PCR del Virus del Amarillamiento y Enanismo de las Cucurbitáceas (CYSDV) del Centro-Norte de México*. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (Núm. Especial 5): 43 - 47, 2012.
- Amza, J. (2018). *Seed Borne Fungi; Food Spoilage, Negative Impact and Their Management: A Review*. Food Science and Quality Management. Vol.81, 2018. IISTE.
- Ayala-Doñas, A., de Cara-García, M., Talavera-Rubia, M., Verdejo-Lucas, S. (2020). *Management of Soil-Borne Fungi and Root-Knot Nematodes in Cucurbits through Breeding for Resistance and Grafting*. Agronomy 2020, 10, 1641; doi:10.3390/agronomy10111641
- Bahar, O., Kritzman, G., Burdman, S. (2009). *Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity*. Eur J Plant Pathol 123, 71–83 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9345-7>
- Boubourakas, I. N., Avgelis, A. D., Kyriakopoulou, P. E., Katis, N. I. (2006). *Occurrence of yellowing viruses (Beet pseudo-yellow virus, Cucurbit yellow stunting disorder*

- virus and Cucurbit aphid-borne yellows virus) affecting cucurbits in Greece. Plant Pathology* (2006) 55, 276–283 Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01341.x
- Brown, J. K., Guerrero, J. C., Matheron, M., Olsen, M., Idris, A. M. (2007). *Widespread Outbreak of Cucurbit yellow stunting disorder virus in Melon, Squash, and Watermelon Crops in the Sonoran Desert of Arizona and Sonora, Mexico*. *Disease Notes. Plant Disease* 91 (6), 773-773. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0773A>
- Buitrón-Bustamante, J. L., Morillo-Velastegui, L. E. (2017). *Estandarización de un método de detección molecular del Cucumber mosaic virus (cmv) en banano ecuatoriano*. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 18(1):113-124. [http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num1\\_art:562](http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:562)
- Bustin, S., Huggett, J. (2017). *qPCR primer design revisited*. *Biomolecular detection and quantification*, 14, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- CABI (2022). *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17070>
- Castle, S., Palumbo, J., & Prabhaker, N. (2009). *Newer insecticides for plant virus disease management*. *Virus Research*, 141 (2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.12.006>
- Castle, S., Palumbo, J., Merten, P., Cowden, C., Prabhaker, N. (2016). *Effects of foliar and systemic insecticides on whitefly transmission and incidence of Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Pest Management Science* 73 (7), 1462-1472. <https://doi.org/10.1002/ps.4478>
- Catara, V., Bella, P. (2020). *Bacterial Diseases*. In: Gullino, M., Albajes, R., Nicot, P. (Eds) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Plant Pathology in the 21st Century*, vol 9. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5_2)
- Chand, G. (2021). *Diseases of Cucurbits and Their Management: Integrated Approaches*. In: Chand, G., Akhtar, N., Kumar, S. (Eds) *Diseases Of Fruits And Vegetable Crops: Recent Management Approaches*. Apple Academic Press.
- Chehri, K., Abbasi, S., Reddy, K. R. N., Salleh, B. (2010). *Occurrence and pathogenicity of various pathogenic fungi on cucurbits from Kermanshah province, Iran*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4 (12), pp. 1215-1223, 18 June 2010.

- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R., Abbasi, S. (2011). *Molecular characterization of pathogenic Fusarium species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran*. Saudi journal of biological sciences, 18(4), 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.01.007>
- Chomicki, G., Schaefer, H., Renner, S. (2019). *Origin and domestication of Cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology*. New Phytologist, (2020), 1240-1255, 226(5). <https://doi.org/10.1111/nph.16015>
- Delgado, G., Rojas, C., Sencie, Á., y Vásquez, L. (2014). *Caracterización de frutos y semillas de algunas cucurbitáceas en el norte del Perú*. Revista fitotecnia mexicana, 37(1), 7-20. Recuperado en 22 de febrero de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802014000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000100004&lng=es&tlng=es).
- Ebert, A. W., Drummond E. B. M., Giovannini, P., van Zonneveld, P. (2021). *A global conservation strategy for crops in the Cucurbitaceae family*. Global Crop Diversity Trust. Bonn, Germany. <https://cdn.croptrust.org/wp/wp-content/uploads/2021/09/Cucurbitaceae-Conservation-Strategy.pdf>
- Elkins, K. M. (2011). *An in silico DNA cloning experiment for the biochemistry laboratory*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 39(3), 211–215. doi:10.1002/bmb.20466
- EPPO (2022). *Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV0)*. EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/CYSDV0>
- FAOSTAT. 2018. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Available at [www.fao.org/faostat/en/#home](http://www.fao.org/faostat/en/#home)
- Fleige, S., Pfaffl, M. W. (2006). *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Molecular Aspects of Medicine 27 (2–3), 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). *Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)*. Biomolecular detection and quantification, 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>

- García-Arenal, F., Palukaitis, P. (2008). *Cucumber Mosaic Virus*. In: van Regenmortel, M. H. V., Mahy, B. W. J. (Eds). Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Academic Press, Elsevier.
- Harshitha, R., Arunraj, D. R. (2021). *Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification*. Biochemistry and Molecular Biology Education. doi:10.1002/bmb.21552
- Hawkins, S. F. C., Guest, P. C. (2017). *Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR*. In: Guest, P.C. (Ed) *Multiplex Biomarker Techniques*. Methods in Molecular Biology, vol 1546. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8)
- Hidalgo Ashrafi, E., Yee, J. & Paul, N. (2009). *Selective control of primer usage in multiplex one-step reverse transcription PCR*. BMC Molecular Biol 10, 113 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-113>
- Hull, R. (2009). Hull, R. (2009). *Mechanical Inoculation of Plant Viruses*. Current Protocols in Microbiology, 16B.6.1–16B.6.4. doi:10.1002/9780471729259.mc16b06s13
- Instituto Nacional de Estadística [INE] (2004). *Número de Fincas Censales, Superficie Cosechada, Producción Obtenida de Cultivos Anuales o Temporales y Viveros*. Tomo II. IV Censo Nacional Agropecuario. Guatemala, Agosto 2004. <https://www.ine.gob.gt/sistema/uploads/2014/01/16/gDIQ8yuwJXGHFb2yHVk4oMIOhYLBCTp5.pdf>
- Jeyaprakash, A., Baker, C. A., Schubert, T. S., Badillo-Vargas, I. E., Roberts, P. D., Funderburk, J. E., Adkins, S. (2015). *First report of Squash vein yellowing virus in watermelon in Guatemala*. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-BR-15-0019.
- Jones, D. (2005). *Cucurbit yellow stunting disorder crinivirus*. Data sheets on quarantine pests. European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO] Bulletin 35, 442–444.
- Kader, A., Hendricks, K., Roberts, P., Paret, M. (2021). *Development of a simple one-step multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of DNA and RNA viruses of cucurbit leaf crumple virus, cucurbit yellow stunting disorder virus, squash vein yellowing virus, and cucurbit chlorotic yellows virus*. Physiological and Molecular

Plant Pathology, Volume 116, December 2021, 101734.  
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101734>

- Kataya, A. R. A., Suliman, M. N. S., Kalantidis, K., Livieratos, I. C. (2009). *Cucurbit yellow stunting disorder virus p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing*. Virus Research, 145(1), 48–53. doi:10.1016/j.virusres.2009.06.010
- Kaur, N., Chen, W., Fei, Z., Wintermantel, W. M. (2019). *Differences in gene expression in whitefly associated with CYSDV-infected and virus-free melon, and comparison with expression in whiteflies fed on ToCV- and TYLCV-infected tomato*. BMC Genomics 20, 654 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5999-0>
- Kralik, P., Ricchi, M. (2017). *A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything*. Frontiers in Microbiology 8(108). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Laboratorio de Protección Vegetal [LPV] (2021). *Inoculación mecánica de virus a plantas indicadoras*. Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA). Universidad del Valle de Guatemala.
- Lacroix, C., Renner, K., Cole, E., Seabloom, E. W., Borer, E. T., Malmstrom, C. M. (2016). *Methodological Guidelines for Accurate Detection of Viruses in Wild Plant Species*. Applied and environmental microbiology, 82(6), 1966–1975. <https://doi.org/10.1128/AEM.03538-15>
- Larsson, A. (2014). *AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets*. Bioinformatics 30 (22): 3276-3278.  
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lebeda, A., Widrlechner, M., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J. (2007). *Cucurbits (Cucurbitaceae; Cucumis spp., Cucurbita spp., Citrullus spp.)*. Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. NCRPIS Publications and Papers 2007; 8:271–376.
- Lecoq, H., Katis, N. (2014). *Control of Cucurbit Viruses*. Advances in Virus Research, 255–296. doi:10.1016/b978-0-12-801246-8.00005-6
- Lee, J. S., Cho, W. K., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, K. H. (2011). *Development of RT-PCR Based Method for Detecting Five Non-reported Quarantine Plant Viruses Infecting*

- the Family Cucurbitaceae or Solanaceae*. The Plant Pathology Journal 2011;27(1):93-97. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.1.093>
- Lerner, B. R., Dana, M. N. (2001). Growing Cucumbers, Melons, Squash, Pumpkins and Gourds. Department of Horticulture. Purdue University Cooperative Extension Service. <https://ag.purdue.edu/hla/pubs/HO/HO-8.pdf>
- Lira, R y Rodríguez, I. (2006). *Catálogo de la familia Cucurbitaceae de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto DS002. México D. F.
- Lira, R. (2021). *Estado actual y fitogeografía de las especies de la Familia Cucurbitaceae endémicas de México*. Versión 1.9. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/pipyqf> accessed via GBIF.org on 2022-02-22.
- Livieratos, I. C., Avgelis, A. D., Coutts, R. H. A. (1999). *Molecular characterization of the cucurbit yellow stunting disorder virus coat protein gene*. Phytopathology 89:1050-1055.
- Locali, E. C., Freitas-Astua, J., Alves de Souza, A., Takita, M. A., Astua-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima, E. W., Machado, M. A. (2003). *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. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.11.1317>
- Mackay, J., Landt, O. (2007). *Real-time PCR fluorescent chemistries*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 353, 237–261. <https://doi.org/10.1385/1-59745-229-7:237>
- Marco, C. F., Aguilar, J. M., Abad, J., Gómez-Guillamón, M. L., Aranda, M. A. (2003). *Melon resistance to Cucurbit yellow stunting disorder virus is characterized by reduced virus accumulation*. Phytopathology 93:844-852. The American Phytopathological Society.
- Mariod, A., Saeed Mirghani, M., Hussein, I. (2017). *Cucurbits, Cucurbita Species As New Oil Sources*. In: Unconventional Oilseeds and Oil Sources, (2017), 81-84. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809435-8.00014-7>

- Markham, P. G., Bedford, I. D., Liu, S., Pinner, M. S. (1994). *The transmission of geminiviruses by Bemisia tabaci*. Pesticide Science, 42(2), 123–128. doi:10.1002/ps.2780420209
- Martelli, G. P., Gallitelli, D. (2008). *Emerging and Reemerging Virus Diseases of Plants*. In: van Regenmortel, M. H. V., Mahy, B. W. J. (Eds). Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Academic Press, Elsevier.
- Martín-Hernández, A. M., Picó, B. (2021). *Natural Resistances to Viruses in Cucurbits*. Agronomy 2021, 11, 23. <https://dx.doi.org/doi:10.3390/agronomy11010023>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA] (2016). *Política agropecuaria 2016-2020*. <https://www.maga.gob.gt/download/politica-16-20.pdf>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA] (2016). *El Agro en Cifras 2016*. <https://www.maga.gob.gt/download/El%20agro16.pdf>
- Ministerio de Economía [MINECO] (2018). *Estudio de Mercado: Frutas Frescas – Estados Unidos*. [https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/estudio\\_de\\_mercado\\_frutas\\_frescas\\_estados\\_unidos.pdf](https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/estudio_de_mercado_frutas_frescas_estados_unidos.pdf)
- Moreno-Salazar, S. F., Rentería-Martínez, M. E., Brown, J. K., Canseco-Vilchis, E. P., Ochoa-Meza, A., Guerrero-Ruiz, J. C. (2009). *Descripción del Virus Amarillamiento de las Cucurbitáceas (Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus) su presencia en Sonora, México*. Biotecnia. XI (3), 57-66.
- Newberry, E. A., Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D., Babu, B., Koike, S. T., Bouzar, H., Goss, E. M., Jones, J. B., Bull, C. T., Paret, M. L. (2016). *Angular Leaf Spot of Cucurbits is Associated With Genetically Diverse Pseudomonas syringae Strains*. Plant Disease, 100(7), 1397–1404. doi:10.1094/pdis-11-15-1332-re
- Nolan, T., Bergkvist, A., Carvallo, C., Chereson, P., Daley, L., Heath, A., Hibbs, S., Hoge, S., Jouravlena, E., Kreader, C., Mohammed, M., Mueller, E., Richardson, G., Russell, T., Ward, B., Weber, S., Wiklander, M. (2014). *A Technical Guide: PCR Technologies*. Sigma-Aldrich.
- Orellana, A. (2012). *Catálogo de Hortalizas Nativas de Guatemala*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas [ICTA].

<https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Hortalizas%20nativas/Catalogo%20de%20hortalizas%20nativas%20de%20Guatemala,%202012.pdf>

- Orfanidou, C., Katsiani, A., Papayiannis, L., Katis, N., Maliogka, V. I. (2021). *Interplay of Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus With Cucurbit Chlorotic Yellows Virus and Transmission Dynamics by Bemisia tabaci MED*. *Plant Disease* 2021, 105:416-424. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0621-RE>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N., Sailor, C. A., Dawson, R. B., Peek, A. S. (2008). *IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers*. *Nucleic Acids Research*, 36, W163–W169. doi:10.1093/nar/gkn198
- Patel, S., Rauf, A. (2017). *Edible seeds from Cucurbitaceae family as potential functional foods: Immense promises, few concerns*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2017), 330-337, 91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.090>
- Pazdernik, N. J., Brookman-Amissah, N., Packer, H., Prediger, E., Sabel, J., Gunstream, S., Helleman, J., Lewis, L., Menezes, A., Owens, B., Rose, S., Rouw, S., Sander, R., Vandesompele, J. (2020). *Real-time qPCR guide: Part 1—assay design*. First edition. Integrated DNA Technologies [IDT].
- Pazdernik, N. J., Brookman-Amissah, N., Packer, H., Prediger, E., Sabel, J., Gunstream, S., Helleman, J., Lewis, L., Menezes, A., Owens, B., Rose, S., Rouw, S., Sander, R., Vandesompele, J. (2020). *Real-time qPCR guide: Part 2—assay validation and data analysis*. First edition. Integrated DNA Technologies [IDT].
- Promega (2018). *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR Protocol*. Quick Protocol. [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Promega (2018). *GoScript™ Reverse Transcription System*. Quick Protocol. [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Reddy, P.P. (2016). *Viral Diseases and Their Management*. In: Sustainable Crop Protection under Protected Cultivation. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-287-952-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-287-952-3_14)
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., Andrade, M. J. (2015). *Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods*. In: Basu C. (Ed) *PCR Primer*

- Design. *Methods in Molecular Biology*, vol 1275. Humana Press, New York, NY.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3)
- Rojas, E. S., Batzer, J. C., Beattie, G. A., Fleischer, S. J., Shapiro, L. R., Williams, M. A., Bessin, R., Bruton, B. D., Boucher, T. J., Jesse, L. C. H., Gleason, M. L. (2015). *Bacterial Wilt of Cucurbits: Resurrecting a Classic Pathosystem*. *Plant Disease*, 99(5), 564–574. doi:10.1094/pdis-10-14-1068-fe
- Rolnik, A., Olas, B. (2020). *Vegetables from the Cucurbitaceae family and their products: Positive effect on human health*. *Nutrition*, (2020), 110788, 78.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110788>
- Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin H-X., Falk. B. W. (2001). *Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene*. *Journal of General Virology* 82:4. 01 April 2001.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-929>
- Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P. (2013). *Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology* 4:151. 26 June 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00151>
- Salehi, B., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., Jaffer, M., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A. K., Calina, D., Docea, A. O., Kamiloglu, S., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Sen, S., Acharya, K., Selamoglu, Z., Sharifi-Rad, J., ... Capasso, R. (2019). *Cucurbits Plants: A Key Emphasis to Its Pharmacological Potential*. *Molecules*. 2019 May 14;24(10):1854. doi: 10.3390/molecules24101854. PMID: 31091784; PMCID: PMC6572650.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Capanoglu E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., Jaffer, M., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A. K., Calina, D., Oana Docea, A., Kamiloglu, S., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Sen, S., Acharya, K., Bashiry, M., ... Cho WC. *Cucurbita Plants: From Farm to Industry*. *Applied Sciences*. 2019; 9(16):3387. <https://doi.org/10.3390/app9163387>
- Schaffer, A., Paris, H. (2003). *Melons, Squashes and Gourds*. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Second Edition, (2003), 3817-3826. Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00760-4>

- Shanathi Avinash, T., Shanker Pillai, H. P. J., Biradar, M., Shinde, V. M. (2021). *A Review on Fungal Diseases of Cucurbitaceae and their Management*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2021) 10(08): 653-672. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1008.075>
- Sigma-Aldrich (2008). qPCR Technical Guide. Recuperado de: <https://www.genequantification.de/SIAL-qPCR-Technical-Guide.pdf>
- Singh, S., Bharati, L. K. (2016). *Cultivation and Bioprospecting of Perennial Cucurbits*. In: Pessarakli, M. (Ed). *Handbook of Cucurbits Growth, Cultural Practices, and Physiology* (95-111). CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Thermo Fisher Scientific (2021). *NanoDrop Micro-UV/Vis Spectrophotometer. NanoDrop One*. User Guide. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-ONE-W>
- Thermo Fisher Scientific (2011). *Assessment of Nucleic Acid Purity*. T042-Technical Bulletin. NanoDrop Spectrophotometers. Recuperado de: [https://medicine.yale.edu/keck/dna/protocols/tube/t042-nanodrop-spectrophotometers-nucleic-acid-purity-ratios\\_407666\\_284\\_7035\\_v1.pdf](https://medicine.yale.edu/keck/dna/protocols/tube/t042-nanodrop-spectrophotometers-nucleic-acid-purity-ratios_407666_284_7035_v1.pdf)
- Thornton, B., Basu, C. (2015) *Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design*. In: Basu C. (Ed) PCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology*, vol 1275. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13)
- Turcios, H. (2021). *Sector agrícola en Guatemala*. Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala. ICEX España Exportación e Inversiones. [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/ministerio-externo/america-central-caribe/2021fichaicexagricolaguatemala\\_tcm30-576578.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/ministerio-externo/america-central-caribe/2021fichaicexagricolaguatemala_tcm30-576578.pdf)
- Tuttle McGrath, M. (2004). *Diseases of Cucurbits and their Management*. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed) *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/1-4020-2606-4\\_12](https://doi.org/10.1007/1-4020-2606-4_12)
- Viljoen, G. J., Nel, L. H., Crowther, J. R. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0>
- Webster, C. G., Turechek, W. W., Li, W., Kousik, C. S., Adkins, S. (2017). *Development and Evaluation of ELISA and qRT-PCR for Identification of Squash vein yellowing*

- virus in Cucurbits*. *Plant Disease* 2017, 101:178-185.  
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0872-RE>
- Wintermantel, W. M., Gilbertson, R. L., Natwick, E. T., McCreight, J. D. (2017). *Emergence and epidemiology of Cucurbit yellow stunting disorder virus in the American Desert Southwest, and development of host plant resistance in melon*. *Virus Research*, 241, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.004>
- Wintermantel, W. M., Jenkins-Hladky, L. L., Fashing, P., Ando, K. McCreight, J. D. (2019). *First Report of Cucurbit Chlorotic Yellows Virus Infecting Melon in the New World*. *Disease Notes. Plant Disease* 103 (4), 778-778. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1390-PDN>
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2001). *Real-Time Multiplex PCR Assays*. *Methods* Volume 25, Issue 4, December 2001, Pages 430-442. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1265>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012). *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. *BMC bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhao, F., Maren, N. A., Kosentka, P. Z., Liao, Y. Y., Lu, H., Duduit, J. R., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, A. I., Ranney, T. G., Liu, W. (2021). *An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis*. *Hortic Res* 8, 179. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00616-w>

## XI. ANEXOS

### Anexo 1. Códigos de acceso a las secuencias de la proteína de la cápside de CYSDV

MF960767.1	AY584048.1	AF312822.1
MF960766.1	AY584047.1	AF312821.1
MF960768.1	AY584046.1	AF312820.1
MF960769.1	AY584045.1	AF312819.1
MF960770.1	AY584044.1	AF312818.1
EU596528.1	AY584043.1	AF312817.1
EU596529.1	AY584042.1	AF312816.1
MN807937.1	AY584041.1	AF312815.1
MN807938.1	AY584040.1	AF312814.1
MN807939.1	AY584039.1	AF312813.1
AY730779.1	AY584038.1	AF312812.1
KX768875.1	AY584037.1	AF312811.1
AY584064.1	AY584036.1	AF312810.1
AY584063.1	AY584035.1	AF312809.1
AY584062.1	AY584034.1	AF312808.1
AY584061.1	AY584033.1	AF312807.1
AY584060.1	AY204220.1	AF312806.1
AY584059.1	EF210559.1	AF312805.1
AY584058.1	EF210558.1	AF312804.1
AY584057.1	DQ903111.1	AF312803.1
AY584056.1	DQ903110.1	AF312802.1
AY584055.1	DQ903109.1	AF312801.1
AY584054.1	DQ903108.1	AF312800.1
AY584053.1	DQ903107.1	AF312799.1
AY584052.1	DQ903106.1	AF312798.1
AY584051.1	DQ903105.1	AF312797.1
AY584050.1	AF312824.1	AF312796.1
AY584049.1	AF312823.1	AF312795.1

KC470000.1	KC469994.1	JF340435.1
KC469999.1	KC469993.1	AJ243000.1
KC469998.1	KC469992.1	LT992905.1
KC469997.1	KC469991.1	LT992904.1
KC469996.1	KC469990.1	
KC469995.1	EF538681.1	

**Anexo 2.** Protocolo de extracción de ARN de Locali y asociados (2003) con modificaciones propias de LPV-CEAA de la UVG Campus Central

## **1. Materiales, Reactivos y Equipos**

### **1.1. Materiales**

- 1.1.1. Palillos de madera
- 1.1.2. Tubos de 1.5 ml
- 1.1.3. Gradillas plásticas
- 1.1.4. Puntas con filtro de 10, 100, 200 y 1000 µl
- 1.1.5. Micropipetas p10, p100 y p1000

### **1.2. Reactivos**

- 1.2.1. Buffer de lavado
- 1.2.2. Buffer de extracción
- 1.2.3. Agua Ultrapura
- 1.2.4. Fenol
- 1.2.5. Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
- 1.2.6. Isopropanol
- 1.2.7. Acetato de amonio (7.5M)
- 1.2.8. Etanol (70%)
- 1.2.9. Cloro (10%)
- 1.2.10. Solución de RNAsa

### **1.3. Equipos**

- 1.3.1. Incubadora *Shake N' Bake Hybridization Oven Model 136400 Boekel Scientific*
- 1.3.2. Centrifuga *Legend Micro 21 Thermo Scientific*

### 1.3.3. Congelador

## 2. Procedimiento

- 2.1.1. Se desinfecta el área de trabajo con cloro y etanol, y se aplica la solución de RNAsa a los materiales y sitio de trabajo.
- 2.1.2. Se programa la incubadora a 55°C mientras se incuban los tubos de 1.5ml con la porción de fruto muestreada a -20°C durante 20 minutos.
- 2.1.3. Los tubos se colocan en hielo y se macera el tejido vegetal con palillos de madera.
- 2.1.4. Se agregan 500 µl de buffer de lavado y se centrifuga la muestra a 13,000 rpm por 5 minutos.
- 2.1.5. El sobrenadante obtenido se decanta y se adicionan 600 µl de buffer de extracción; la mezcla se incuba por 30 minutos a 55°C con agitación constante.
- 2.1.6. Tras la incubación, se enfrían los tubos por 5 minutos a temperatura ambiente, y se les agregan 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- 2.1.7. Los tubos se mezclan y centrifugan a 13,000 rpm por 8 minutos, para luego realizar la separación de fases, donde la fase acuosa resultante se transfiere a un tubo de 1.5ml nuevo.
- 2.1.8. En los tubos nuevos, se les adiciona una solución de isopropanol frío, equivalente a 1 volumen de la fase transferida, además, se adiciona una solución de acetato de amonio 7.5M equivalente a 1/10 de volumen de la fase transferida.
- 2.1.9. La mezcla se incuba en frío a -20°C durante al menos 20 minutos. Este paso puede durar hasta 1 semana.
- 2.1.10. Las muestras se centrifugan a 13,000 rpm por 12 minutos y se decanta el sobrenadante.
- 2.1.11. Se realiza un lavado con 100 µl de etanol al 70% con centrifugación a 13,000 rpm durante 8 minutos.
- 2.1.12. El precipitado obtenido se seca al aire por al menos 30 minutos, y se re suspende en 20 µl de agua ultrapura.

2.1.13. El ARN obtenido se mantiene en frío para realizar la prueba de RT-PCR convencional, o bien para su uso en la prueba de RT-qPCR; caso contrario, se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Anexo 3.** Protocolo de cuantificación de ARN para el espectrofotómetro UV/Vis *NanoDrop One* de *Thermo Fisher Scientific* (2021).

## **1. Materiales, Reactivos y Equipos**

### **1.1. Materiales**

1.1.1. Hielera

1.1.2. Puntas de  $10\mu\text{l}$

1.1.3. Micropipeta p10

### **1.2. Reactivos**

1.2.1. Agua destilada

### **1.3. Equipos**

1.3.1. Espectrofotómetro UV/Vis *NanoDrop One* de *Thermo Fisher Scientific*

## **2. Procedimiento**

2.1.1. Se conecta y enciende el espectrofotómetro, se limpia con cuidado el detector del pedestal y brazo, y se selecciona el ácido nucleico a cuantificar en la pantalla de inicio.

2.1.2. Con una micropipeta, se toman  $2\mu\text{l}$  de agua destilada, y se colocan en el lector del pedestal para que sea registrado como el blanco; se baja el brazo a manera que cubra la gota agregada, y se espera mientras el equipo realiza la lectura.

2.1.3. Una vez se cuenta con el registro del blanco, se levanta el brazo, y se limpian las partes que entraron en contacto con la muestra.

2.1.4. Se cargan  $2\mu\text{l}$  de la muestra de ARN extraído, la cual se debe de mantener en frío en una hielera, y se repite el proceso de lectura y limpieza del equipo hasta finalizar la cuantificación de las muestras.

2.1.5. Al finalizar las lecturas, se selecciona la opción de finalizar experimento, se limpia nuevamente el equipo, y se apaga.

**Anexo 4.** Protocolo de transcripción reversa para el kit *GoScript™ Reverse Transcription System* de Promega (2018)

## **1. Materiales, Reactivos y Equipos**

### **1.1. Materiales**

- 1.1.1. Gradillas plásticas
- 1.1.2. Tubos de 1.5 y 0.5 ml
- 1.1.3. Hielera
- 1.1.4. Puntas con filtro de 10, 200 y 1000 µl
- 1.1.5. Puntas de 10, 200 y 1000 µl
- 1.1.6. Micropipetas p10, p100 y p1000

### **1.2. Reactivos**

- 1.2.1. *Master Mix GoScript™ Reverse Transcription System*
- 1.2.2. Buffer *GoTaq Green 5x*
- 1.2.3. *GoTaq Polimerase™*
- 1.2.4. Cebadores forward y reverse específicos de CYSDV
- 1.2.5. Cebador *random (Oligo-dT)*
- 1.2.6. Etanol (70%)
- 1.2.7. Cloro (10%)
- 1.2.8. Solución de RNAsa

### **1.3. Equipos**

- 1.3.1. Campana de extracción con luz UV
- 1.3.2. Campana de flujo laminar
- 1.3.3. Centrifuga *Galaxy Mini VWR International*
- 1.3.4. Termociclador *Programmable Thermal Controller PTC-100 MJ Research Inc.*

## **2. Procedimiento**

- 2.1.1. Se trabaja en un espacio previamente desinfectado con cloro 10%, etanol 70%, solución de RNAsa, e irradiado con luz UV.
- 2.1.2. En la campana de extracción, se prepara una mezcla de 4µl de ARN de extracción, junto con 1µl del cebador *random (Oligo-dT)*, la cual se centrifuga por 10 segundos.

- 2.1.3. La muestra se incuba a 70°C por 5 minutos en el termociclador, y se almacena en hielo hasta su uso.
- 2.1.4. Se prepara la mezcla de reacción acorde al número de reacciones (Cuadro 5).
- 2.1.5. De la mezcla de reacción se agregan 15µl a cada tubo en el hielo con la reacción preparada.
- 2.1.6. Los tubos de reacción se incuban en el termociclador siguiendo los tiempos y temperaturas que se indican en el Cuadro 6. Las muestras de ADNc obtenidas se almacenan en frío hasta su uso.

**Anexo 5.** Protocolo de inoculación mecánica de virus en plantas indicadoras (LPV, 2021).

## **1. Materiales, Reactivos y Equipos**

### **1.1. Materiales**

- 1.1.1. Muestra positiva de virus
- 1.1.2. Batería de plantas indicadoras
- 1.1.3. Mortero y pistilo
- 1.1.4. Hielera
- 1.1.5. Carborundum
- 1.1.6. Recipientes plásticos
- 1.1.7. Pissetas de agua
- 1.1.8. Guantes de látex

### **1.2. Reactivos**

- 1.2.1. Buffer de fosfatos 0.02M pH 7.0
- 1.2.2. Agua ultrapura

### **1.3. Equipos**

- 1.3.1. N/A

## **2. Procedimiento**

- 2.1.1. De las muestras que sean positivas para el virus de interés, se toma 1g de tejido infectado, al cual se le adiciona 5 ml de buffer de fosfatos dentro del mortero.

- 2.1.2. La muestra en solución permanece en reposo durante 10 minutos, para luego ser macerada con el pistilo. Al terminar de macerar, se coloca el mortero en una hielera hasta su uso.
- 2.1.3. Al ingresar al invernadero destinado para la inoculación, se coloca carborundum en la superficie de las hojas a inocular.
- 2.1.4. Con el pistilo sumergido en la solución, se realizan frotos firmes en la hoja para generar una lesión superficial del tejido. Al finalizar, la planta se deja reposar por 5 minutos.
- 2.1.5. El proceso se replica para las plantas utilizadas como control negativo, pero en lugar de la solución macerada, se realiza el daño tisular con un pistilo sumergido únicamente en buffer de fosfatos.
- 2.1.6. Luego del reposo, se lava las hojas de la planta usando una piseta con agua, y se coloca cada planta inoculada y cada planta control a una distancia mínima de 15 cm para evitar la contaminación.

**Anexo 6.** Protocolo de RT-qPCR para el kit *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR* de Promega (2018)

## **1. Materiales, Reactivos y Equipos**

### **1.1. Materiales**

- 1.1.1. Tubos estériles
- 1.1.2. Bloque frío
- 1.1.3. Gradillas estériles
- 1.1.4. Micropipetas p10, p100 y p1000
- 1.1.5. Puntas de 10, 200 y 1000  $\mu$ l
- 1.1.6. Puntas con filtro de 10, 200 y 1000  $\mu$ l

### **1.2. Reactivos**

- 1.2.1. *GoTaq® Probe qPCR Master Mix*
- 1.2.2. *GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR*
- 1.2.3. Cebador *forward* y *reverse* CYSDV
- 1.2.4. Sonda CYSDV
- 1.2.5. Agua libre de nucleasas

- 1.2.6. Cloro (10%)
- 1.2.7. Etanol (70%)
- 1.2.8. Solución de RNAsa

### **1.3. Equipos**

- 1.3.1. Termociclador *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems*
- 1.3.2. Equipo de cómputo para colecta de datos
- 1.3.3. Campana de extracción con luz UV
- 1.3.4. Campana de flujo laminar
- 1.3.5. Centrifuga *Galaxy Mini VWR International*

## **2. Procedimiento**

- 2.1.1. Se trabaja en campanas de flujo laminar y de extracción previamente desinfectadas con cloro 10%, etanol 70%, solución de RNAsa, e irradiadas con luz UV.
- 2.1.2. Se preparan los cebadores y las sondas a usar, para obtener una concentración de 0.1µM para los cebadores y las sonda.
- 2.1.3. En tubos estériles se prepara la mezcla de reacción indicada en el (Cuadro 8), manteniendo en frío los reactivos y centrifugando cada uno previo a su uso.
- 2.1.4. Se preparan diluciones del ARN en un factor 1:10 en la campana de extracción.
- 2.1.5. Se combinan los componentes de la reacción con el ARN extraído en tubos estériles en el bloque frío, centrifugando los tubos al finalizar.
- 2.1.6. Se configura el programa de corrida para el termociclador de tiempo real indicado en el Cuadro 9.
- 2.1.7. La placa con las muestras es transferida en otro bloque frío hacia el termociclador para realizar la corrida, donde se colecta y visualiza los resultados al finalizar la amplificación.

**Anexo 7.** Cuantificación de ARN y lecturas de pureza para las muestras vegetales trabajadas

Muestra	Concentración (ng/ul)	A260/280	A260/230	Resultado
2017-1	539.1	1.93	1.79	Positivo
2017-2	239.4	1.83	1.63	Positivo
2017-3	490.3	2.03	1.77	Positivo
2017-4	656.7	2.06	2.05	Positivo
2017-5	517.8	1.93	1.87	Positivo
2017-6	826.5	1.72	1.05	Positivo
2017-7	353.9	1.98	1.90	Positivo
2017-8	537.9	1.95	1.70	Positivo
2017-9	1008.5	2.05	1.90	Positivo
2018-1	491.0	1.81	1.62	Negativo
2018-2	513.7	1.72	1.41	Positivo
2018-3	605.1	1.73	1.48	Positivo
2018-4	1379.4	1.76	1.39	Positivo
2018-5	689.7	1.69	1.45	Positivo
2018-6	861.9	1.75	1.43	Positivo
2018-7	682.9	1.86	1.69	Positivo
2018-8	351.5	1.98	1.84	Positivo
2018-9	635.1	1.80	1.27	Positivo
2018-10	563.4	1.71	1.63	Positivo
2019-1	1081.9	1.67	1.14	Positivo
2019-2	478.9	1.93	1.60	Positivo
2019-3	1665.3	1.39	0.84	Positivo
2019-4	475.9	1.70	1.19	Positivo
2019-5	7927.3	1.85	1.63	Positivo
2019-6	10656.2	0.99	0.51	Negativo
2019-7	245.5	1.76	1.40	Positivo
2019-8	920.0	1.93	1.77	Positivo
2019-9	372.6	1.92	1.67	Positivo
2019-10	593.5	1.94	1.80	Positivo
2019-11	1067.7	2.12	2.16	Positivo
2019-12	1511.3	1.74	1.16	Positivo
2019-13	1112.1	1.84	1.48	Positivo
2020-1	1770.6	1.62	1.01	Positivo
2020-2	6380.3	1.81	1.72	Positivo
2020-3	789.0	1.74	1.21	Negativo
2020-4	558.6	1.97	1.53	Positivo
2020-5	577.0	2.01	1.71	Positivo
2020-6	677.6	1.94	1.49	Positivo
2020-7	4203.1	1.27	0.70	Positivo
2020-8	690.8	1.75	0.82	Positivo
2021-1	696.5	1.98	1.74	Positivo
2021-2	1747.2	2.02	1.97	Negativo
2021-3	600.7	1.99	1.82	Positivo
2021-4	643.3	2.08	1.59	Positivo
2021-5	671.7	1.97	1.73	Positivo
2021-6	1314.1	1.71	1.02	Positivo
2021-7	1453.3	1.77	1.65	Positivo
2022-1	427.7	2.05	1.83	Positivo
2022-2	25.6	1.57	1.27	Positivo
2022-3	1773.6	2.11	2.11	Positivo
2022-4	2220.2	2.13	1.94	Positivo