



**Identificación de ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) y WMV (*Watermelon mosaic virus*)  
mediante ELISA y RT-PCR, en zonas productoras de cucurbitáceas de las provincias de  
Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas**

Mejía García, Jean Pierre

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura


Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Francisco Javier Flores Flor Ph.D.

03 de Febrero 2023

## Hoja de Resultados de la Herramienta Copyleaks



### Tesis\_Mejia\_Jean\_Pierre

**4%** Similitudes

**0%** Texto entre comillas  
0% similitudes entre comillas

**3%** Idioma no reconocido

**Nombre del documento:** Tesis\_Mejia\_Jean\_Pierre.docx

**ID del documento:** c30ace2eada6775201d97fcd6e722d760676ad49

**Tamaño del documento original:** 8,29 Mo

**Depositante:** FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR

**Fecha de depósito:** 24/2/2023


**Tipo de carga:** interface

**fecha de fin de análisis:** 24/2/2023

**Número de palabras:** 14.943

**Número de caracteres:** 97.067

Ubicación de las similitudes en el documento:



#### Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<b>repositorio.espe.edu.ec</b>   Detección e identificación de virus fitopatógenos en cultivo... <a href="http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/20793/5/T-ESPE-039656.pdf.txt">http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/20793/5/T-ESPE-039656.pdf.txt</a> 15 Fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (99 palabras)
2	<b>repositorio.espe.edu.ec</b>   Aislamiento e identificación molecular de mohos y levaduras... <a href="http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/29683/5/T-ESPE-052359.pdf.txt">http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/29683/5/T-ESPE-052359.pdf.txt</a> 15 Fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (92 palabras)
3	<b>repositorio.espe.edu.ec</b>   Análisis de expresión del gen RHNUDX1 en pétalos de vari... <a href="http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/23027/5/T-ESPE-044033.pdf.txt">http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/23027/5/T-ESPE-044033.pdf.txt</a> 15 Fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (80 palabras)
4	<b>www.semanticscholar.org</b>   [PDF] Current status and molecular characterization of ... <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/Current-status-and-molecular-characterization-of-in-Asa-d-As...">https://www.semanticscholar.org/paper/Current-status-and-molecular-characterization-of-in-Asa-d-As...</a>	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (46 palabras)
5	<b>link.springer.com</b>   Length of poly(A) tail affects transcript infectivity of three ZYMV s... <a href="https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s42161-019-00316-4.pdf">https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s42161-019-00316-4.pdf</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (39 palabras)


#### Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<b>www.semanticscholar.org</b>   Analysis of the biological and molecular variability of W... <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-the-biological-and-molecular-of-mosaic-Sharifi-Ma...">https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-the-biological-and-molecular-of-mosaic-Sharifi-Ma...</a>	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (35 palabras)
2	<b>www.scielo.org.mx</b>   Domesticación, diversidad y recursos genéticos y genómicos de... <a href="https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=51405-888X2018000421207">https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=51405-888X2018000421207</a>	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (31 palabras)
3	<b>pubmed.ncbi.nlm.nih.gov</b>   Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): vertical tr... <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23845301/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23845301/</a>	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (22 palabras)
4	<b>dx.doi.org</b>   Efficacy of the InvictDetect™ Immunostrip® to Taxonomically Identify t... <a href="https://dx.doi.org/10.3390/insects11010037">https://dx.doi.org/10.3390/insects11010037</a>	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (20 palabras)
5	<b>repositorio.utc.edu.ec</b>   Análisis del riesgo de introducción de Fusarium oxysporum ... <a href="http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/7695/3/MUTC-000923.pdf.txt">http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/7695/3/MUTC-000923.pdf.txt</a>	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (22 palabras)

#### Fuentes mencionadas (sin similitudes detectadas)

Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

- <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/arp13.pdf>
- <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17070>
- <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu183341.pdf>
- <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>
- <https://doi.org/10.1099/vir.0.064220-0>



FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR

## Certificación



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, **“Identificación de ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus) y WMV (Watermelon mosaic virus) mediante ELISA y RT-PCR, en zonas productoras de cucurbitáceas de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas”** fue realizado por el señor **Mejía García, Jean Pierre**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido, por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de febrero del 2023



**Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.**  
C.C. 1713443479

## Responsabilidad de Autoría



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Mejía García, Jean Pierre**, con cédula de ciudadanía n° 1723333918, declaro que el contenido, ideas, y criterios del trabajo de titulación: "**Identificación de ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) y WMV (*Watermelon mosaic virus*) mediante ELISA y RT-PCR, en zonas productoras de cucurbitáceas de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de febrero del 2023

**Mejía García, Jean Pierre**  
C.C: 1723333918

## Autorización de publicación



**Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Autorización de Publicación**

Yo, **Mejía García, Jean Pierre** con cédula de ciudadanía n° 1723333918, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Identificación de ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus) y WMV (Watermelon mosaic virus) mediante ELISA y RT-PCR, en zonas productoras de cucurbitáceas de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de febrero del 2023

**Mejía García, Jean Pierre**  
C.C: 1723333918

## Dedicatoria

A Dios,  
por rodearme de personas maravillosas que me han ayudado en cada momento de la vida.

A mis padres, Hólger y Marcia,  
los pilares de mi vida, mi inspiración, mi fuerza, mi mayor orgullo, y mi razón para seguir  
adelante.

A mis hermanos, Daniel y Esteban,  
por su paciencia y confianza en mí, por nunca rendirse, por creer que les podía cumplir esta  
promesa.

A mis tíos Lucho y Flor,  
porque nunca se cansaron de apoyarme durante todo este tiempo.  
En memoria de mi primo Pablo Andrés Jr., mi tía Vicenta Mejía, y mi abuelita Mamita Gloria,  
que, aunque estén tan lejos como en el cielo, los siento tan cerca como en mi corazón.

*Jean Pierre Mejía García*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi tutor de tesis, Ing. Francisco Flores, Ph.D. por su tiempo, disposición, profesionalidad y por toda su ayuda durante el desarrollo de este trabajo, porque por él comencé a amar el mundo de la Fitopatología.

Al Ing. Jairo Guevara, cuya guía me ha permitido desarrollarme profesionalmente y retomar mi amor por la ciencia. Y por su gran calidad humana que ha hecho más amena mi estancia en el laboratorio.

A la Mgtr. Patricia Garrido, por todo el apoyo prestado, la confianza, y por haberme dado la oportunidad de aprender con un gran equipo de trabajo.

Al Ing. Hernando Regalado y al Ing. Alexander Toaza, por abrirme las puertas del laboratorio de Fitopatología para llevar a cabo mis prácticas, y luego mi tesis, además de brindarme su amistad y su ayuda cuando los necesitaba.

Al Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, y a todos los docentes que conforman la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por transmitirnos sus conocimientos.

A mis padres, por todos los sacrificios que han hecho a lo largo de los años, por sus enseñanzas, por todo su amor y paciencia, por creer en mí, por darme la fuerza y el ejemplo para nunca rendirme, por ser el mejor regalo que me ha dado la vida, por ayudarme a cumplir este sueño, que no solo es mío, sino suyo. Porque sin ustedes jamás habría llegado hasta aquí. Ser su hijo es mi mayor orgullo, gracias.

A mis hermanos, mi gran regalo del cielo desde el día en que llegaron, siempre quise que se sientan orgullosos de mí, así como me siento de ustedes al verlos creciendo y madurando cada día. Su amor y confianza han sido mi combustible para cumplirles esta promesa.

A mis tíos Lucho y Flor, mis segundos papás, los que me llenan el corazón cada vez

que los veo, porque siempre han estado conmigo desde que tengo memoria, porque me han amado como a su hijo.

A mi tío Eduardo, porque siempre ha sido un apoyo y soporte, no solo para mí, sino para todos en nuestro hogar. Por ser casi un padre para nuestra gran familia, de la cual él es ahora la columna vertebral.

A toda mi familia, mi gran familia García, mis tíos, tías, primos y primas, que siempre han estado ahí, con una palabra de apoyo o un abrazo, con sus consejos y cariño. Porque, aunque no lo sepan, los momentos con ustedes, sus risas y su alegría, me han dado vida. Los amo.

A mis amigos Alexis A., Alexis E., Joss, Óscar, Alejo, Any, Alexis M., a Dani T., y a todos quienes formaron parte de este hermoso camino, porque su apoyo y amistad han sido un faro de esperanza, porque han estado conmigo en las buenas y en las malas, y llevaré esos recuerdos siempre en mi corazón.



## Contenido

Hoja de Resultados de la Herramienta Copyleaks .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Tablas.....	12
Índice de figuras.....	13
Resumen .....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción .....	17
Formulación del problema .....	17
Justificación del problema .....	18
Objetivos de la investigación .....	20
Capítulo II: Marco Referencial.....	21
Cucurbitáceas .....	21
Plagas en cucurbitáceas .....	21
Agentes virales en cucurbitáceas .....	22
Potyvirus .....	22
Patogénesis de Potyvirus .....	25
Transmisión.....	26
Estructura y características de los virus.....	27

ZYMV.....	27
WMV.....	29
PRSV.....	30
CMV.....	32
Métodos de diagnóstico de Potyvirus .....	33
<i>Ensayo inmunoenzimático ligado a Enzima (ELISA)</i> .....	34
<i>InmunoStrip</i> .....	37
<i>RT-PCR</i> .....	38
<i>Microscopía electrónica</i> .....	38
Filogenia.....	39
Métodos de construcción de árboles filogenéticos.....	39
<i>Neighbor-Joining</i> .....	39
<i>Inferencia bayesiana</i> .....	40
<i>Maximum Likelihood</i> .....	40
<i>Máxima parsimonia</i> .....	40
Hipótesis .....	40
Capítulo III: Materiales y métodos.....	41
Instituciones participantes .....	41
Colaboradores científicos .....	41
Área de Estudio.....	41
Material Biológico .....	41

ELISA.....	44
Extracción de ARN total .....	46
Síntesis de ADNc .....	47
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	48
Electroforesis.....	50
Secuenciación.....	50
Análisis bioinformático.....	50
Capítulo IV: Resultados .....	53
ELISA.....	53
Extracción de ARN total y síntesis de cDNA.....	54
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis .....	54
Secuenciación.....	56
Análisis filogenético.....	58
Capítulo V: Discusión.....	60
Conclusiones.....	64
Recomendaciones.....	65
Bibliografía .....	66

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Muestras analizadas con sus procedencias, y cultivo afectado.....</i>	42
<b>Tabla 2</b> <i>Componentes del ARN molde.....</i>	47
<b>Tabla 3</b> <i>Componentes de la master mix para la síntesis de cDNA a partir del ARN molde. ....</i>	48
<b>Tabla 4</b> <i>Secuencias de los cebadores Nlb2F y Nlb3R, y tamaño del amplicón esperado en la amplificación de un segmento del gen Nlb de Potyvirus. ....</i>	48
<b>Tabla 5</b> <i>Componentes de la master mix usada en las reacciones PCR para Potyvirus.....</i>	49
<b>Tabla 6</b> <i>Parámetro de amplificación por PCR para Potyvirus.....</i>	50
<b>Tabla 7</b> <i>Lista de 12 secuencias de homólogas con los que se analizó la filogenia.....</i>	51
<b>Tabla 8</b> <i>Resultados de los ensayos serológicos ELISA correspondiente a Potyvirus, ZMYV, WMV, PRSV y CMV.....</i>	53
<b>Tabla 9</b> <i>Homologías de las secuencias consenso en base a la búsqueda en BLASTn.....</i>	57

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	<i>Representación esquemática y microfotografía de un virión de potyvirus.....</i>	<i>23</i>
<b>Figura 2</b>	<i>Genoma típico de un Potyvirus y las proteínas resultantes de su traducción con su marco de lectura adicional. ....</i>	<i>25</i>
<b>Figura 3</b>	<i>Sintomatología causada por infección de ZYMV en plantas de calabaza. ....</i>	<i>28</i>
<b>Figura 4</b>	<i>Sintomatología moderada en hoja y fruto causado por un aislado de WMV en melón (Cucumis melo).....</i>	<i>30</i>
<b>Figura 5</b>	<i>Síntomas característicos de la infección de PRSV en plantas de papaya (Carica papaya L. ).....</i>	<i>31</i>
<b>Figura 6</b>	<i>Viriones y sintomatología causada por infecciones de CMV.....</i>	<i>32</i>
<b>Figura 7</b>	<i>Diagrama esquemático de ELISA directo.....</i>	<i>35</i>
<b>Figura 8</b>	<i>Representación esquemática de las variantes de ELISA más usadas.....</i>	<i>37</i>
<b>Figura 9</b>	<i>Diagrama esquemático del genoma del Virus de la papa Y (PVY), y las posiciones de los nucleótidos donde los cebadores Nib2F y Nib3R, y otros cebadores tradicionales se unen.....</i>	<i>38</i>
<b>Figura 10</b>	<i>Sintomatología identificada en las muestras foliares analizadas .....</i>	<i>42</i>
<b>Figura 11</b>	<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos PCR del gen Nib.....</i>	<i>55</i>
<b>Figura 12</b>	<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos PCR del gen Nib.....</i>	<i>56</i>
<b>Figura 13</b>	<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos PCR del gen Nib.....</i>	<i>56</i>
<b>Figura 14</b>	<i>Árbol filogenético de máxima verosimilitud para las 7 secuencias analizadas, 11 secuencias representativas de varias especies de Potyvirus, y un grupo externo.....</i>	<i>58</i>

### Lista de abreviaciones

<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADNc-dc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario de doble cadena
<b>ZYMV</b>	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
<b>WMV</b>	<i>Watermelon mosaic virus</i>
<b>PRSV</b>	<i>Papaya ringspot virus</i>
<b>CMV</b>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima
<b>DAS ELISA</b>	Double Antibody Sandwich ELISA
<b>TAS ELISA</b>	Triple Antibody Sandwich ELISA
<b>ACP</b>	Antigen Coated Plate
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

## Resumen

Los potyvirus son un grupo de virus fitopatógenos ampliamente conocidos por causar grandes pérdidas económicas en una gran variedad de cultivos, en especial en cucurbitáceas. Las especies más representativas de este género son *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), y *Papaya ringspot virus* (PRSV). Según la resolución No. 0122 del Ministerio de Agricultura y Ganadería emitida en 2018, tanto ZYMV como WMV constituyen plagas cuarentenarias no presentes en Ecuador, por lo es importante su diagnóstico temprano, y la identificación de cepas circulantes para preservar la seguridad alimentaria del país. Debido a esto, el objetivo de la presente investigación fue identificar la presencia de los virus ZYMV, WMV y PRSV en muestras de cucurbitáceas provenientes de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas.

Se realizó un primer diagnóstico por Ensayo inmunoenzimático ligada a enzima (ELISA) con anticuerpos específicos, obteniendo resultados positivos en 17 de las 40 muestras para al menos uno de los virus analizados. Para confirmar la presencia de los virus se realizó RT-PCR a las muestras positivas con cebadores universales, obteniendo resultados negativos en todas las muestras, que se atribuyen a una posible degradación del ARN viral. La identificación de las especies de potyvirus se confirmó mediante BLASTn y análisis filogenéticos de las secuencias previamente obtenidas de las mismas muestras en otro ensayo, encontrando la presencia de una cepa de ZYMV y PRSV. Las secuencias fueron recortadas y ensambladas mediante el programa Geneious, y se construyó un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud utilizando el programa MEGAX.

*Palabras Clave:* Virus fitopatógenos, cucurbitáceas, ELISA, RT-PCR, filogenia.

### **Abstract**

Potviruses are a group of phytopathogenic viruses widely known for causing great economic losses in a wide variety of crops, especially cucurbits. The most representative species of this genus are Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), Watermelon mosaic virus (WMV), and Papaya ringspot virus (PRSV). According to resolution 0122 issued in 2018, both ZYMV and WMV constitute quarantine pests not present in Ecuador, so it is important their early diagnosis, and the identification of circulating strains to preserve the country's food security. Therefore, the objective of this research was to identify the presence of ZYMV, WMV and PRSV in cucurbit samples from the provinces of Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos and Guayas.

A first diagnosis was made by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific antibodies, obtaining positive results in 17 of the 40 samples for at least one of the viruses tested. To confirm the presence of the viruses, RT-PCR was performed on the positive samples with universal primers, obtaining negative results in all samples, which are attributed to a possible degradation of the viral RNA. Identification of potyvirus species was confirmed by BLASTn and phylogenetic analysis of sequences previously obtained from the same samples in another assay, finding the presence of a ZYMV and PRSV strain. The sequences were trimmed and assembled using the Geneious software, and a phylogenetic tree was constructed with maximum likelihood method using the MEGAX software.

*Keywords:* Phytopathogenic viruses, cucurbits, ELISA, RT-PCR, phylogeny



## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

La familia *Cucurbitáceae*, cuyos miembros se les denomina comúnmente como cucurbitas, son una familia de plantas de considerable importancia económica. Cuentan con una distribución global, aunque se desarrollan mejor en trópicos y subtrópicos (Rajasree et al., 2016). La alta demanda de sus frutos, debido a que forman parte de la alimentación diaria de muchas personas, las ha vuelto un objeto de fitomejoramiento, tanto tradicional como moderno, razón por la que actualmente existen secuenciados varios genomas completos de pepino, sandía, y melón (J. Wang et al., 2017).

La secuenciación de genomas completos de especies que no son de interés económico también tiene sus ventajas, pues en estas se puede encontrar un gran bagaje genético, es decir, marcadores moleculares y genes de resistencia virales, un ejemplo es la calabaza en botella (*Lagenaria siceraria*), cuyos genes de resistencia a *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) promueven su uso como portainjerto en la producción de nuevos cultivares sanos (Wu et al., 2017).

Una de las mayores dificultades que afrontan los productores de cucurbitas son las enfermedades virales, que generan millonarias pérdidas en cultivos como calabaza, pepino, melón y sandía. Dentro de los principales agentes virales que atacan a las cucurbitáceas se encuentran las especies de la familia *Potyviridae*, como *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV-1, WMV-2), PRSV-W, *Melon necrotic spot virus* (MNSV) y *Squash vein yellowing virus* (SqVYV). También son comunes las infecciones por *Squash mosaic virus* (SqMV), miembro de la familia *Comoviridae* y *Cucumber mosaic virus* (CMV), que forma parte de la familia *Bromoviridae* (Wu et al., 2017; Zeng et al., 2007).

Las condiciones ambientales pueden determinar la presencia de una especie u otra de virus, puesto que en cultivos a campo abierto se ha detallado la prevalencia de CMV, WMV-2 y

*Cucurbit aphid-borne yellow virus* (CABYV), mientras que en invernadero se ha observado *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) y CMV (Rudneva et al., 2006).

Los Potyvirus se transmiten de manera no persistente por medio de áfidos, aunque también se ha reportado la existencia de pulgones con capacidad de transmitir más de una cepa de virus al mismo tiempo. La base molecular de este tipo de transmisión ha sido ampliamente estudiada, encontrando una relación entre los componentes genómicos de los virus y piezas bucales de los áfidos, donde existen receptores virales insertados (Srinivasan et al., 2012).

Dentro de las principales especies de áfidos que pueden actuar como vectores de Potyvirus y CMV se ha reportado a *Myzus persicae*, *Aphis craccivora* y *Aphis gossypii* (CABI, 2022). A este respecto, estudios previos en Ecuador detallan que, mediante la técnica ELISA se encontró que *Aphis gossypii* actúa como vector de SqMV en cultivos como melón, y sandía, con una tasa de transmisión de aproximadamente 11%; además, se identificaron varias especies de malezas que pueden contribuir como reservorios virales, manteniendo altas cargas de CMV y PRSV (J. Paredes, 2011).

Las medidas que se suelen tomar para mitigar o controlar las infecciones por virus fitopatógenos se centran en el control de la población de vectores, además del cultivo de variedades resistentes o tolerantes, uso de semillas certificadas libres de virus, y técnicas de cultivo adecuado, sin embargo, una vez que una especie viral entra en una región es necesario conocer las cepas circulantes para tener un mayor entendimiento de la dinámica poblacional y poder ejecutar un manejo tecnificado (Mandoulakani et al., 2015).

### **Justificación del problema**

Existen aproximadamente entre 800 y 1300 especies reconocidas dentro de la familia *Cucurbitaceae*, muchas de las cuales son conocidas principalmente por su importancia en el ámbito alimenticio, por ejemplo, la sandía, que es la especie más cultivada de esta familia.

Actualmente también se ha comenzado a explotar el potencial medicinal de las cucurbitas a partir de la extracción de principios activos (G. Paredes et al., 2014; Rajasree et al., 2016).

En el Ecuador el principal uso de las cucurbitas es para el consumo de sus frutos, razón por la que tanto, sandía (*Citrullus lanatus*), como melón (*Cucumis melo*) son las plantas más cultivadas de esta familia, con una producción anual de 73198 t y 17928 t, respectivamente. Además, es frecuente en el país la siembra de calabacín (*Cucurbita pepo*), calabaza (*Cucurbita sp.*), sambo (*Cucurbita ficifolia*) y zapallo (*Cucurbita maxima*), ya que son ingredientes tradicionales en la alimentación de las familias ecuatorianas, con una producción aproximada de 8845 t en total. De acuerdo a datos proporcionados por el Instituto Nacional de estadísticas y Censos (INEC), y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los territorios con mayor índice de producción de cucurbitáceas en el país se encuentran en la región costa, específicamente en las provincias de Santa Elena, Los Ríos, El Oro, Manabí y Guayas; debido a que presentan un clima adecuado para el desarrollo de estas plantas durante la mayoría del año (FAOSTAT, 2021; INEC, 2000; Naranjo, 2014)

Considerando a entes como la Organización Mundial del Comercio, se suscribió el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, que establece que cada país miembro tiene derecho a adoptar estas normas, con el fin de preservar la diversidad de especies vegetales. Por su parte, en la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) se establecieron las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF), en las que se describe la importancia de realizar Análisis de Riesgo de Plagas (ARP) permitiendo analizar continuamente las plagas cuarentenarias no presentes en un territorio (AGROCALIDAD, 2017).

Acorde a la resolución 0122 emitida en 2018, tanto ZYMV, como WMV, son plagas cuarentenarias no presentes en el Ecuador, por lo que su diagnóstico temprano es de vital importancia para mitigar los posibles daños causados por estos virus, y preservar la seguridad

alimentaria del país (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017).

## **Objetivos de la investigación**

### **Objetivo general**

Identificar ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) y WMV (*Watermelon mosaic virus*) mediante ELISA y RT-PCR, en zonas productoras de cucurbitáceas de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas.

### **Objetivos específicos**

- Detectar las muestras positivas de Potyvirus, ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) y WMV (*Watermelon mosaic virus*) mediante DAS Elisa y TAS Elisa.
- Confirmar la presencia de ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) y WMV (*Watermelon mosaic virus*) mediante RT-PCR con cebadores genéricos para Potyvirus.
- Obtener las secuencias de las cepas identificadas para inferir su filogenia.

## Capítulo II: Marco Referencial

### Cucurbitáceas

La familia *Cucurbitaceae* se encuentra conformada por aproximadamente 118 géneros, y 825 especies según análisis morfológicos, aunque mediante el uso de herramientas moleculares más actuales y filogenética se ha determinado que serían en realidad 115 géneros, 664 especies en la familia, y hasta 2600 en el orden las Cucurbitales (Bates et al., 1990). El origen de esta familia se encuentra repartido principalmente en 3 continentes, ya que más del 40 % de las cucurbitáceas tienen su origen en América, seguido por África y Asia, con un 26 y un 28 % de endemismo, respectivamente, es por eso que se habla de un origen mesoamericano. Además, México es el país con mayor cantidad de especies de cucurbitas endémicas (CONABIO, 2006; Schaefer et al., 2009).

En general, estas plantas son de tipo rastrero o trepador, con tallo herbáceo o leñoso, hojas grandes alternas y pecioladas, flores unisexuales en forma de zarcillos simples o ramificados. En cuanto a los frutos son carnosos de tipo baya denominados “pepo” debido a su forma, y son generalmente dulces en las especies comerciales y amargos en las silvestres, su estructura se asemeja al ovario de la flor, y sus cultivos suelen ser anuales (Ajuru & Okoli, 2013; Lira, 1998). Tanto los frutos como las semillas son conocidos por contener una gran cantidad de metabolitos secundarios, un ejemplo es la cucurbitacina, un triterpenoide que tiene capacidades purgantes, eméticas y antihelmínticas (Saboo et al., 2013).

Cuentan con una distribución global, aunque su abundancia es mayor en trópicos y subtrópicos en el sureste de Asia, África occidental, Madagascar, Mesoamérica y Sudamérica (Schaefer et al., 2009).

### Plagas en cucurbitáceas

Las plagas en la familia *Cucurbitaceae* pueden ser de origen viral, bacteriana, fúngica, debida a insectos, e incluso causas no biológicas, como la alta temperatura. Además, pueden

atacar tanto a raíces, tallo, lámina de la hoja, peciolo y fruto.

En el caso de las bacterias es muy común la infección por especies del género *Rhizobium*, y por *Xanthomonas campestris*, la cual se manifiesta con manchas marrones con halos amarillos. En cuanto a los hongos, se conoce de varias especies que pueden causar problemas, como *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Ascomicetos*, *Trichosporidium*, *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Phytophthora*, que causan problemas como mancha de la hoja, moho suave, moho polvoriento, y enfermedad de la estrella negra. También existen plagas como la mosca blanca, los áfidos, pulgones, tisanópteros, nemátodos, escarabajos y ácaros que pueden causar la muerte de la planta en infecciones severas, además de actuar como vectores de transmisión de otros agentes patógenos, principalmente virales (Pu et al., 2021). Todo esto conlleva inevitablemente a una reducción en rendimiento, y por lo tanto, en productividad (Leach & Kaplan, 2022).

### **Agentes virales en cucurbitáceas**

En general, los virus suelen causar manchas amarillentas y mosaicos en las hojas, inhibición del crecimiento, deformación de flores y enrollamientos. Alrededor del mundo se han identificado aproximadamente 35 especies de virus con capacidad para atacar cucurbitáceas, debido a la sensibilidad de esta familia a los ataques virales. De estos, los principales forman parte del género Potyvirus, como ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*), PRSV (*Papaya ringspot virus*), WMV (*Watermelon mosaic virus*), y MNSV (*Melon necrotic spot virus*). Además, existen otras especies de distintas familias como CMV, SqMV, y otras especies menos conocidas como MLCV (*Melon leaf curl virus*), PMV (*Panicum mosaic virus*) y MWMV (*Moroccan watermelon mosaic virus*) (Asad et al., 2022; Pu et al., 2021).

### **Potyvirus**

**Dominio:** Virus

**Reino:** Orthornavirae

**Filo:** Pisuviricota

**Clase:** Stelpaviricetes

**Orden:** Patatavirales

**Familia:** *Potyviridae*

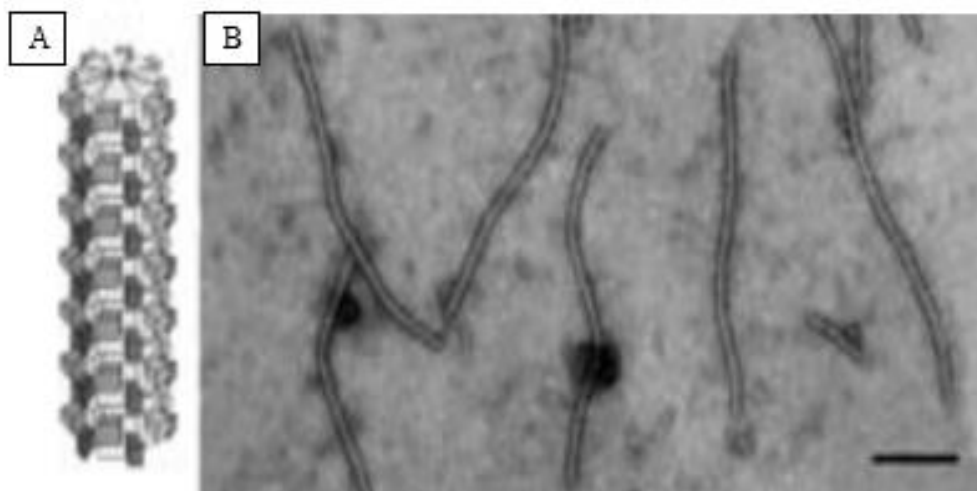
**Género:** *Potyvirus*

En el reino vegetal, *Potyviridae* es la familia de virus de ARN más numerosa, con 237 especies registradas y doce géneros: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Roymovirus*, *Ipomovirus*, *Rymovirus*, *Celavirus*, *Tritimovirus*, *Poacevirus*, y *Macluravirus*. El género más representativo es *Potyvirus* y es reconocido debido a su capacidad para afectar a una amplia gama de especies vegetales de importancia económica. Dentro del género *Potyvirus* las especies tipo son el *Potato virus Y* (PVY) y el *Potato virus A* (PVA) (Ivanov et al., 2014).

Morfológicamente los viriones de potyvirus son partículas filamentosas flexibles, con simetría helicoidal, y un tamaño que oscila entre los 650 y 900 nm de largo, y 11-20 nm de ancho, en dependencia de la especie (Figura 1) (CABI, 2017; Inoue-Nagata et al., 2022).

### Figura 1

*Representación esquemática y microfotografía de un virión de potyvirus*



*Nota.* A) Representación esquemática de una partícula de potyvirus, B) Microfotografía

electrónica de contraste negativo de un aislado de *Plum pox virus*. Tomado de *Virus Taxonomy* (p. 1070). por King et al., 2012, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

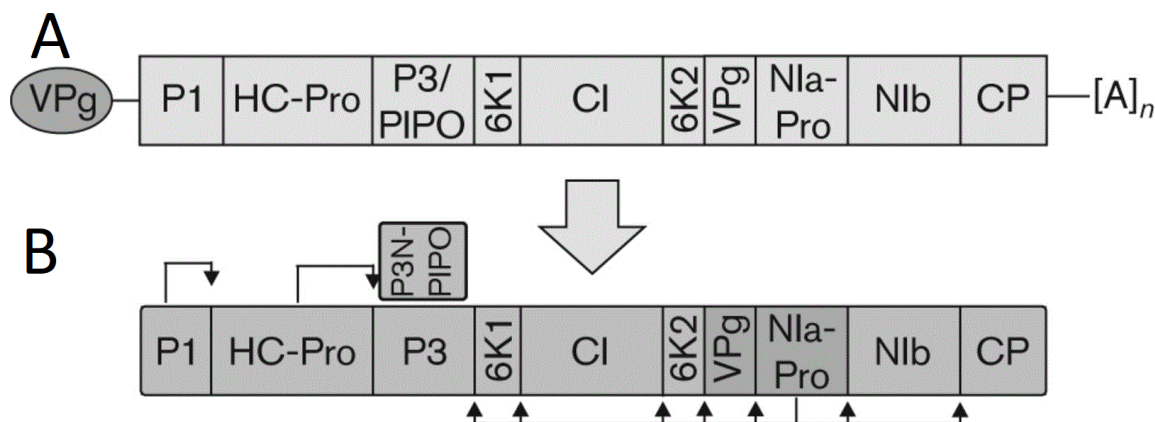
El principal criterio taxonómico para la identificación de géneros y especies en la familia *Potyviridae* es el porcentaje de identidad en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Para identificar una nueva especie, esta debe tener una identidad en la secuencia de aminoácidos menor al 80%, y de nucleótidos inferior al 76% en el gen de la proteína de cubierta (CP). Otros criterios de identificación son el hospedero específico, la morfología de los cuerpos de inclusión y las propiedades antigénicas (King et al., 2012).

Los Potyvirus se encuentran en el grupo IV de la clasificación de Baltimore, debido a que están compuestos por un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. Tienen un tamaño que varía entre 8,2 a 11,3 kb. En general, cuentan con un solo marco de lectura abierto (ORF) que genera una única poliproteína de 330 kDa que es escindida por 3 proteasas autocodificadas, generando 10 proteínas con funciones establecidas comunes en la mayoría de potyvirus. Estas incluyen a la proteína de cápside o cubierta (CP), la proteína del componente auxiliar (HC-Pro), una proteína de inclusión cilíndrica (CI) que ayudan al movimiento del virus, una proteína viral con actividad proteasa (VPg) unida covalentemente al extremo 5', una replicasa de ARN, una proteína de inclusión nuclear (NIa) con actividad proteinasa, una proteína de inclusión nuclear b (NIb) y varias proteínas más pequeñas (Figura 2). Además, poseen una cola de poliA en el extremo 3' del genoma (Asad et al., 2022; Zeng et al., 2007).



## Figura 2

Genoma típico de un Potyvirus y las proteínas resultantes de su traducción con su marco de lectura adicional.



*Nota.* A) Genoma típico de un potyvirus, B) Poliproteína resultante de la traducción normal, y proteína P3N-PIPO resultante del corrimiento en el marco de lectura en ZYMV. Las flechas negras en la poliproteína señalan los sitios proteolíticos donde actúan las proteasas virales. Tomado de *Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection*.(p. 1416), por K. Ivanoc et al., 2014, *Journal of General Virology*.

En células infectadas es muy común la observación de cuerpos de inclusión cristalinos en el citoplasma. Tienen forma cilíndrica y alargada, con una naturaleza proteica, y una estructura tridimensional similar a un molino o espiral. Esta característica se ha utilizado como un criterio de clasificación taxonómica debido a que en algunas especies estos pueden ser amorfos (Sharma et al., 2014).

### Patogénesis de Potyvirus

Una vez que un virus infecta a una planta, es difícil detener su propagación. Por esta razón, es importante tomar medidas preventivas para evitar la infección, y reducir las pérdidas económicas. La prevención es crucial para controlar las enfermedades virales en las plantas.

Experimentalmente se ha determinado que potyvirus tiene capacidad para atacar hasta 30 familias distintas (King et al., 2012). La sintomatología de las infecciones es variada, y puede depender de diversos factores como la susceptibilidad del huésped, condiciones ambientales y la naturaleza específica del virus, sin embargo, hay varios síntomas comunes en todas las infecciones causadas por potyvirus, como son los mosaicos, moteados, arrugas en hojas apicales, bandeado de venas foliares, amarillamientos o lesiones cloróticas, necrosis, enanismos en infecciones precoces, ampollas, retraso en el crecimiento, pérdida de rendimiento, y en general malformaciones en follaje y fruto (Sharma et al., 2014). Las plantas jóvenes y en etapas tempranas de desarrollo son más propensas a contraer enfermedades virales, especialmente en climas fríos, ya que las bajas temperaturas en algunos casos pueden contribuir a las infecciones y afectar al desarrollo vegetativo (Díaz et al., 2010).

### **Transmisión**

La principal forma de propagación de enfermedades virales en plantas es por medio de insectos vectores, como áfidos y pulgones. La transmisión es de tipo no persistente y no circulativa. Esto que significa que los viriones se adhieren a las piezas bucales de los insectos debido a interacciones entre ciertos motivos de las proteínas de cubierta (CP) y del componente auxiliar (HC-Pro) con el estilete del vector, y no entran a su sistema digestivo (Carr et al., 2020; H Simmons et al., 2013).

Los insectos se nutren mediante pequeñas y veloces perforaciones en las hojas con su estilete, lo que dificulta su control, y favorece la expansión de la plaga (Díaz et al., 2010). Se han reportado más de 26 especies de áfidos que pueden actuar como vectores, sin embargo, se menciona que *Aphis gossypii* tiene la mayor capacidad de transmisión, seguido de *Mizus persicae*, y *Aphis craccivora* (Pandawani et al., 2020; Sevik, 2018). Adicionalmente, es importante destacar que el aumento de la temperatura debido al calentamiento global ha sido relacionado con el incremento en la población de insectos vectores, lo que puede desencadenar en

una mayor incidencia de estas enfermedades y el surgimiento de nuevas plagas en los cultivos (Kim et al., 2019).

Existen también otras formas de transmisión no vectorial que pueden darse debido a la falta de medidas de bioseguridad, como el uso de herramientas contaminadas o ropa que pudo haber estado expuesta al patógeno en otra plantación, y el no aislamiento de plantas con síntomas, que permite el contacto entre hojas de plantas infectadas y no infectadas (Díaz et al., 2010). La transmisión por medio de semillas es un mecanismo de disseminación de la enfermedad, y se da cuando el virus invade el embrión a través de las células maternas del micrópilo (H Simmons et al., 2013).

### **Estructura y características de los virus**

#### **ZYMV**

ZYMV es un potyvirus que fue inicialmente identificado a principios de la década de 1970 en Italia, y desde entonces se ha vuelto uno de los mayores retos para los cultivos de cucurbitáceas en el mundo, debido a su capacidad para propagarse rápidamente y causar graves pérdidas económicas. Se ha informado que las epidemias de ZYMV pueden reducir hasta en un 90 % la producción de los cultivos (Kim et al., 2019; Pandawani et al., 2020). La rápida transmisión de este virus puede deberse a varios factores, uno de ellos serían los mecanismos de transmisión, incluyendo la transmisión horizontal a través áfidos y pulgones, y la transmisión vertical a través de semilla y, en algunos casos, incluso por medio de polen (Harth et al., 2017). También es interesante destacar que las transmisiones verticales de ZYMV suelen generar infecciones asintomáticas, lo que convierte a las semillas infectadas en un importante reservorio viral que luego se propagará de manera vectorial y no vectorial (H. Simmons et al., 2011).

La sintomatología en las infecciones es variada en dependencia de las cepas, aunque generalmente induce la presencia de mosaicos severos y un moteado amarillo en las hojas

(Figura 3), de ahí su nombre, además produce malformaciones en hojas y frutos, atrofia en el crecimiento, y pérdida de rendimiento en el cultivo.

### Figura 3

*Sintomatología causada por infección de ZYMV en plantas de calabaza.*



*Nota.* Tomado de *Current status and molecular characterization of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infecting ridge gourd (luffa acutangula L.) in different regions of Punjab, Pakistan* (p.470). Por Asad et al., 2022, Pakistan Journal of Botany.

ZYMV posee un genoma de 9,6 kb, y un ORF que codifica a la clásica poliproteína gigante de los potyvirus, aunque tiene la particularidad de tener un ORF adicional denominado PIPO (Pretty interesting Potato ORF) que se puede expresar como resultado de un corrimiento (+2) en el marco de lectura de la región P3, generando la proteína P3N-PIPO (Figura 2B).

Nuevas investigaciones sugieren que la infectividad de ZYMV y el tiempo de aparición de los síntomas puede estar relacionado con la longitud del segmento de poli (A) del aislado específico. Los estudios han encontrado que con una longitud de 55 nt en el segmento de poli (A) se producen infecciones ineficientes, mientras que los aislados con una longitud de 60 nt causan enfermedad más grave (Kim et al., 2019).

La identificación de este virus puede realizarse mediante técnicas moleculares como

PCR con cebadores específicos o universales. Mientras que, haciendo uso de microscopía electrónica, el virión puede ser visto como una partícula filamentosa y flexible con un diámetro de aproximadamente 750 nm (H Simmons et al., 2013).

### **WMV**

WMV es un miembro del género *Potyvirus*, y es conocido por ser el segundo virus más importante en el cultivo de cucurbitáceas a nivel mundial, y el más común en Europa. A diferencia de otros virus pertenecientes a este género, WMV tiene una enorme variedad de huéspedes, lo que lo hace capaz de infectar muchos cultivos comerciales, e incluso malezas que pueden actuar como reservorio viral. En ensayos controlados se ha determinado que puede infectar hasta 170 especies de plantas de 27 familias. Estructuralmente tiene forma de partícula filamentosa de 760 nm de largo. Posee un genoma de ARN monocatenario de aproximadamente 10035 nucleótidos, y un solo ORF que se traduce en una gran poliproteína de 3217 aminoácidos (Elbeshehy et al., 2015; Sharifi et al., 2008).

Hace algunos años WMV era considerado como una cepa de *Soybean mosaic virus* (SMV) debido a su alta similitud en sus secuencias genéticas, que llega hasta un 90%, aunque sus propiedades serológicas sean distintas. Estudios moleculares revelaron que WMV pudo haber surgido a partir de recombinación interespecífica entre dos virus, el ya mencionado SMV, y *Bean common mosaic virus* (BCMV) con el que comparte una identidad del 85 % en la secuencia del gen que codifica la proteína P1 (Desbiez & Lecoq, 2004; Lecoq & Desbiez, 2008).

Mediante ensayos serológicos y análisis de la secuencia de la cápside viral se han identificado tres cepas: WMV-1, WMV-2, y WMV-3. Estos mismos estudios reportaron una gran similitud entre WMV-1 y PRSV-W, e incluso se los ha llegado a considerar la misma cepa. Por otro lado, se encuentra WMV-2, que es considerada la cepa principal, y por último se halló a WMV-3 o también llamado *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV).

La gravedad de la sintomatología causada por la infección de WMV depende tanto de la cepa, como del huésped infectado. Los síntomas pueden variar desde los típicos mosaicos, deformaciones y amarillamientos en hojas y frutos, hasta daños únicamente en las hojas sin afectar la calidad del fruto (Figura 4) (Lecoq & Desbiez, 2008).

#### **Figura 4**

*Sintomatología moderada en hoja y fruto causado por un aislado de WMV en melón (Cucumis melo)*



*Nota.* Tomado de *Watermelon Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus* (p. 435), por H. Lecoq & C. Desbiez, 2008, *Encyclopedia of Virology*.

#### **PRSV**

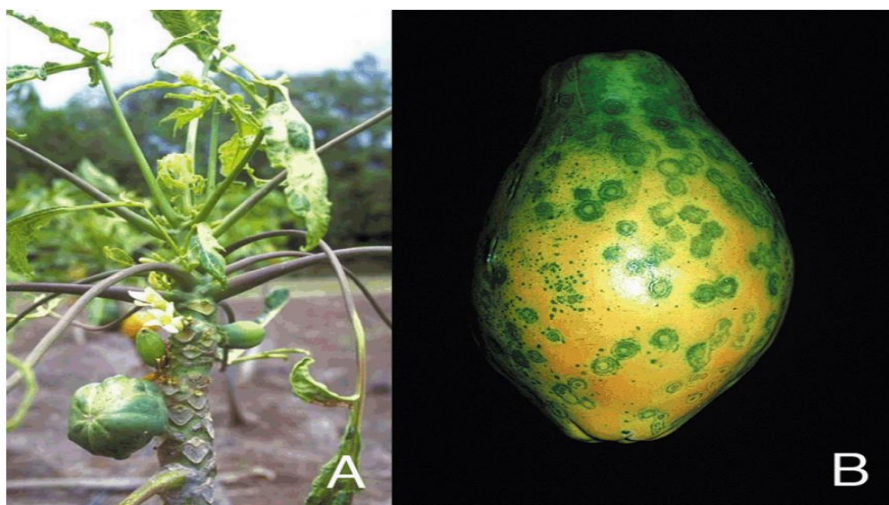
PRSV fue identificado inicialmente en 1949 en Hawái. Es conocido principalmente por infectar plantas de papaya (*Carica papaya* L. ) y por su característico halo o anillo que deja en los frutos que infecta, razón a la cual debe su nombre (Figura 5). En dependencia del hospedero, existen dos cepas principales, PRSV-P (Papaya), que ataca a plantas de la familia *Caricaceae*, *Cucubitáceae* y *Chenopodiaceae* y PRSV-W (Watermelon) a la familia *Chenopodiaceae* y principalmente a *Cucurbitáceae*, y tienen como particularidad que serológicamente no se pueden diferenciar uno del otro, sino únicamente a través de métodos

moleculares (Bermúdez-Guzmán et al., 2018; Tripathi et al., 2008).

Los viriones de PRSV son similares a la mayoría de potyvirus, es decir, son partículas filamentosas y flexibles de 800 nm de largo y 12 nm de diámetro. Su genoma consta de aproximadamente 10326 nucleótidos, y un único ORF que se traduce en la poliproteína gigante de los potyvirus, que en este caso tiene 3344 aminoácidos. Sin embargo, existe una variante en la proteína autoescindida P1, que es más grande que en la mayoría de los virus del género. La sintomatología generada por la infección de PRSV puede variar dependiendo del cultivo afectado, ya sean cucurbitas o papayas. Sin embargo, algunos síntomas comunes incluyen la presencia de mosaicos, reducción en la producción, los típicos anillos concéntricos y deformaciones en los frutos. (Gonsalves et al., 2010).

### Figura 5

*Síntomas característicos de la infección de PRSV en plantas de papaya (Carica papaya L. ).*



*Nota.* A) Síntomas de PRSV en las yemas apicales de un árbol de papaya, B) manchas anulares formadas en la superficie de los frutos de papaya causados por una infección de PRSV. Tomado de *Papaya ringspot virus* (p. 2), por Gonsalves et al., 2010. The Plant Health Instructor.

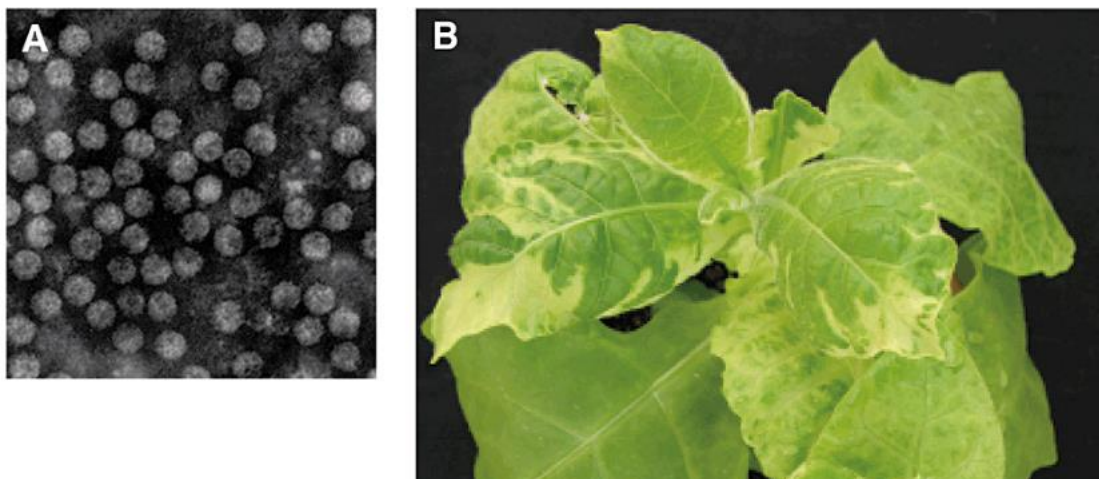


## CMV

CMV forma parte de la familia *Bromoviridae*, género *Cucumovirus*, y su nombre se debe a que fue identificado por primera vez en 1916 infectando plantas de pepino (*Cucumis sativus*) en EEUU. Es uno de los virus fitopatógenos con mayor cantidad de hospederos y síntomas conocidos, pues se sabe que puede infectar a más de 1200 especies vegetales de al menos 100 familias distintas, lo que lo convierte en un patógeno de amplia distribución, que causa grandes pérdidas económicas en una extensa variedad de cultivos. La sintomatología puede ser variada en relación a la cepa y huésped específico infectado, sin embargo, los síntomas típicos suelen incluir la presencia de mosaicos, clorosis, necrosis, enanismo, deformaciones e invaginaciones en hojas y frutos (Figura 6B) (Mochizuki & Ohki, 2012; Zeng et al., 2007).

### Figura 6

*Viriones y sintomatología causada por infecciones de CMV*



*Nota.* A) Viriones de CMV icosaédricos observados en microscopio electrónico de transmisión, B) Mosaicos producidos debido a infección por CMV en plantas indicadoras de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Tomado de *Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants* (p. 218), por Mochizuki & Ohki, 2012. *Molecular Plant Pathology*.

Morfológicamente los viriones de CMV se observan como partículas icosaédricas de 29



nm de diámetro (Figura 6A). En cuanto al genoma, CMV está compuesto por tres ARN monocatenarios de polaridad positiva con un tamaño de 3,4 kb, 3,0 kb y 2,2 kb respectivamente, con 5 ORF en total. El RNA1 es monocistrónico y codifica para la proteína 1a, el ARN2 codifica la proteína 2a y 2b, y el ARN3 que es bicistrónico codifica la proteína 3a y la proteína de cubierta (CP) (Jacquemond, 2012).

Por medio de análisis serológicos y moleculares inicialmente se logró identificar dos grupos, llamados CMV-I y CMV-II, cuyo porcentaje de identidad de secuencias está entre el 69 y 77%. Más adelante, por medio del estudio de regiones no codificantes del ARN3, se encontró que CMV-1 tiene dos subgrupos adicionales denominados CMV-IA y CMV-IB. Actualmente se puede distinguir entre CMV-I y CMV-II mediante análisis serológicos con anticuerpos monoclonales específicos, sin embargo, para reconocer la presencia de los subgrupos de CMV-IA y CMV-IB es necesario hacer uso de herramientas moleculares como RT-PCR. (Van Regenmortel & Mahy, 2009)

La transmisión de CMV se da principalmente de manera no persistente mediante áfidos y pulgones, aunque también que existe transmisión de manera persistente y semipersistente. Los principales vectores son *A. gossypii* y *M. persicae*, además de otras especies como *Aphis fabae*, muy común en cultivos de cucurbitas, y *Hyalopterus pruni* (Khaled-Gasmi et al., 2023).

### **Métodos de diagnóstico de Potyvirus**

La detección por serología mediante el uso de kits comerciales es la más común, debido a su eficiencia, confiabilidad y accesibilidad. También se suelen usar métodos moleculares, como LAMP, Real Time – PCR o PCR con retrotranscripción, en este caso, la mayoría de cebadores utilizados están diseñados en base a secuencias conservadas en el gen que codifica para la proteína de inclusión nuclear b (Nib) y la proteína de la cubierta (CP) (Asad et al., 2022; Zheng et al., 2010). Por otro lado, el uso de técnicas de microscopía electrónica es más común con fines de investigación, debido a que es posible identificar partículas similares a

potyvirus, mas no discernir entre las especies virales (Lee et al., 2022).

### ***Ensayo inmunoenzimático ligado a Enzima (ELISA)***

El ensayo inmunoenzimático o inmunoabsorbente ligado a enzima o simplemente llamado ELISA es una técnica que ha sido ampliamente usada en diagnóstico e investigación, debido a su sensibilidad, y límite de detección que se encuentra en la escala de nanogramos o picogramos de un antígeno en una muestra (Konstantinou, 2017). La técnica se fundamenta en la especificidad de un anticuerpo (Ab) por un antígeno (Ag), cuya unión es detectada mediante una reacción cromogénica producida por una enzima. Usualmente se suele usar fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa o peroxidasa de rábano picante (Lequin, 2005). Según el diseño y tipo de ELISA, el analito a detectar puede ser tanto un antígeno, como un anticuerpo (Ma & Shieh, 2006).

En función de cómo el antígeno es inmovilizado y detectado, existen dos categorías de ELISA, directo e indirecto. Sin embargo, existen más variaciones muy utilizadas como el tipo sandwich o competitivo (Shah & Maghsoudlou, 2016).

#### ***ELISA directo***

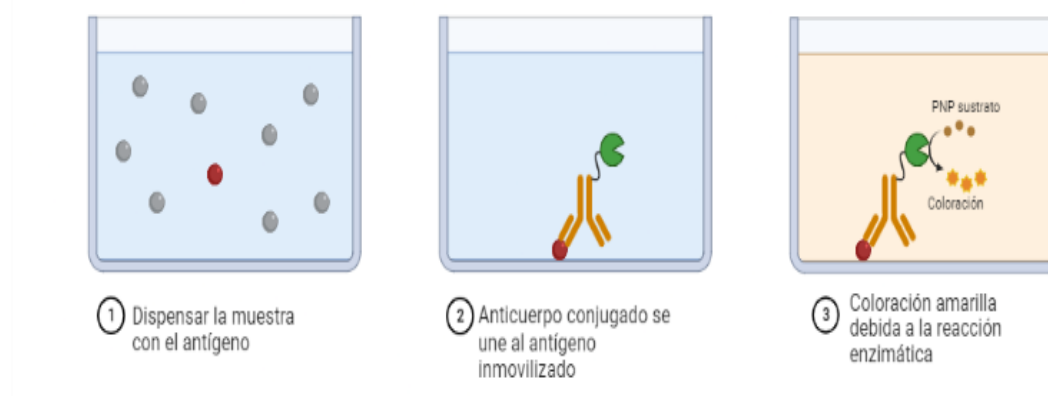
La variante más sencilla es el ELISA directo, en esta se diluye el antígeno en un tampón específico, como el buffer carbonato, bicarbonato o fosfato salino (PBS). El buffer ayuda a la adsorción pasiva del antígeno debido a su pH alto, que mantiene la solubilidad y permite que el antígeno tenga una carga neta negativa. Los pocillos tienen una carga positiva, lo que facilita que el antígeno se una a sus paredes. En este paso se dispensan tanto los controles positivos y negativos, como la muestra a analizar (Shah & Maghsoudlou, 2016). Una consideración fundamental es evitar la presencia de proteínas que puedan competir con el antígeno en la unión a la fase sólida plástica. El exceso de antígeno es eliminado posteriormente en un proceso de lavado mediante inundación y vaciado de los pocillos con un tampón neutro, como PBST. En una segunda etapa, se agrega el conjugado enzimático con tiene afinidad por los

antígenos pegados a la fase sólida, y que está compuesto por un anticuerpo específico unido a una enzima. Para evitar una unión inespecífica de anticuerpos, se utiliza un buffer que contiene sustancias que compiten con el anticuerpo para llenar los espacios libres en la fase sólida, y suelen llamarse agentes de bloqueo.

Durante la incubación el antígeno se une al conjugado, y luego se eliminan los anticuerpos no unidos mediante un lavado. En tercera etapa se añade el sustrato que permite la reacción cromogénica y se lleva a cabo un periodo de incubación. Finalmente se puede detener la reacción alterando el pH o añadiendo un inhibidor, y se procede a la lectura por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda específica (Figura 7) (Crowther, 2009). En ciertos casos, se puede realizar una cuantificación indirecta del antígeno al comparar la densidad óptica medida en la muestra con un parámetro estándar (Konstantinou, 2017).

### Figura 7

*Diagrama esquemático de ELISA directo*



### **ELISA indirecto**

La diferencia en el ELISA indirecto es que, en este caso antes de la unión del conjugado enzimático, se da un paso adicional, que es añadir un anticuerpo de detección (Figura 8A). Se debe considerar que el anticuerpo del conjugado enzimático debe ser producido contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se produce el anticuerpo de detección, generando un

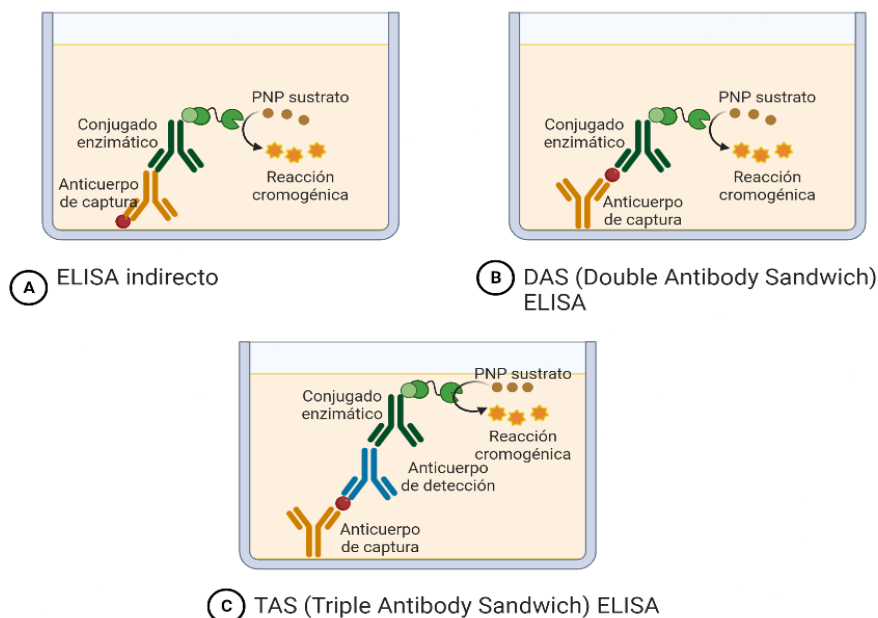
anticuerpo anti-especie. Los anticuerpos usados pueden ser de tipo monoclonal, es decir, que reconocen únicamente un epítipo o sitio antigénico, o policlonales, que pueden reconocer una serie de epítipos en una muestra (Konstantinou, 2017).

### ***ELISA sandwich***

En las variantes DAS (Double Antibody Sandwich) y TAS (Triple Antibody Sandwich) el primer paso es la unión pasiva de los anticuerpos de captura a la fase sólida, en vez de los antígenos, como ocurría en ELISA directo e indirecto. Luego del lavado se unen los antígenos diluidos en un buffer que contenga un agente de bloqueo. La solución de bloqueo no puede contener ningún tipo de proteína antigénica que pueda competir por los anticuerpos de captura. Posteriormente, durante el periodo de incubación se forma el complejo antígeno anticuerpo (Ag – Ab) pegado a la fase sólida. A partir de este punto, DAS y TAS ELISA varían. En el caso de DAS – ELISA se añade el anticuerpo unido a una enzima, y se genera una unión directa entre el complejo Ag-Ab y el conjugado enzimático, razón por la que también se le denomina “Sandwich directo” (Figura 8B). Posteriormente se procede con los pasos de incubación y lavado, y se añade el cromógeno para continuar con la lectura. La diferencia con la variante TAS – ELISA o también llamada “indirecta”, es que posterior a la formación del complejo Ag-Ab se da la adición de un tercer anticuerpo, denominado de “detección”, que no está unido con la enzima, y que permite aumentar la especificidad de la prueba (Figura 8C). Después de la incubación/lavado se añade el conjugado enzimático, y el ensayo procede con su rumbo normal hasta la lectura. La ventaja de los ensayos tipo sandwich es que los anticuerpos de captura y detección pueden dirigirse a diferentes epítipos en el antígeno, lo que aumenta la especificidad a la prueba. Sin embargo, esto constituye también en una limitación en ciertos casos, pues el antígeno debe tener al menos dos epítipos, por lo que el complejo antigénico debe ser relativamente grande (Crowther, 2009).

## Figura 8

Representación esquemática de las variantes de ELISA más usadas.



### **ImmunoStrip**

Los ImmunoStrip® (Agdia, USA) o inmunoensayos de flujo lateral son pruebas inmunológicas de rápida aplicación, comúnmente utilizadas en campo, o como primera vía de identificación tanto en virus, bacterias, hongos o incluso insectos. Han sido utilizadas con éxito para reconocimiento de especies de hormigas, sin embargo, se ha demostrado que en ciertas condiciones como, por ejemplo, al utilizar una muestra menor a la recomendada, la tasa de falsas negativos puede elevarse considerablemente (Valles et al., 2020).

Existe gran evidencia de que un correcto uso de estas pruebas puede constituir un valioso recurso para la detección rápida de virus fitopatógenos como ZYMV, WMV, CMV, y otros, debido a su facilidad de aplicación (Yoon et al., 2018).

Para su aplicación primero se deben cortar pedazos de aproximadamente 2,5 cm<sup>2</sup>, que se ubican dentro de un sobre con buffer. La muestra debe ser molida con la bolsa cerrada, con

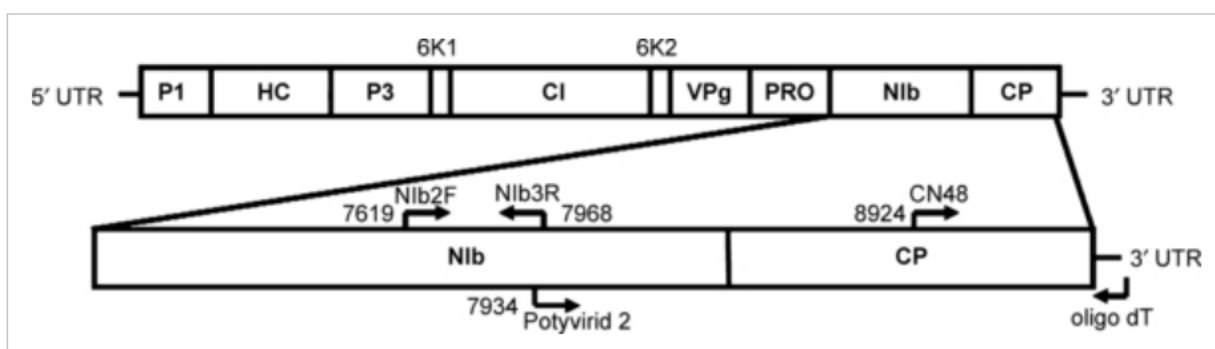
ayuda de un pistilo, hasta que se libere la cantidad requerida de savia vegetal. Se inserta el InmunoStrip hasta el punto señalado en la bolsa, y se deja incubar por 10-20 minutos. Si la prueba se realizó correctamente aparecerá una línea de control, y si el resultado es positivo se observará una banda de color rosado en la línea de prueba (Lamichhaney et al., 2021).

### **RT-PCR**

Uno de los ensayos más utilizados para la detección de potyvirus y sus diferentes especies es la PCR convencional con retrotranscripción, debido a que existen cebadores universales que tienen como diana sitios altamente conservados dentro de la región que codifica para la proteína de inclusión nuclear b (Nlb) y que se encuentran muy cerca el uno del otro (Figura 9). Las reacciones con el par de primers universales Nlb2F y Nlb3R producen amplicones de 350 pb (Zheng et al., 2010).

### **Figura 9**

*Diagrama esquemático del genoma del Virus de la papa Y (PVY), y las posiciones de los nucleótidos donde los cebadores Nlb2F y Nlb3R, y otros cebadores tradicionales se unen*



*Nota.* Los cebadores Nlb2F y Nlb3R se unen respectivamente en las posiciones 7619-7641 y 7945-7968 del genoma de PVY en la región Nlb. Tomado de *A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses* (p. 212), por Zheng et al., 2010, Plant Pathology.

### **Microscopía electrónica**

Mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión (TEM) es posible la

identificación de partículas similares a potyvirus, observando la forma típica de partículas filamentosas con un largo de entre 680 a 730 nm, y diámetro de 11 a 12 nm (Figura 1). Por esto, se suele emplear esta técnica para discernir entre muestras, especialmente al momento de generar los primeros reportes del apareamiento de un virus en una región o país, sin embargo, no se puede utilizar para diagnóstico. En general, este es uno de los primeros pasos previo a la identificación por métodos serológicos o moleculares (Lee et al., 2022).

## **Filogenia**

Los análisis filogenéticos permiten recrear la historia evolutiva de un taxón, es decir, permiten identificar las relaciones que existen entre ancestros comunes y descendientes, por medio de caracteres morfológicos o moleculares. Se hace uso de herramientas de biología molecular, estadística y bioinformática para la construcción de árboles filogenéticos que representen la historia evolutiva de un organismo. Los métodos más comunes para la creación de árboles filogenéticos son: Neighbor-Joining, Inferencia bayesiana, Maximum Likelihood, y Máxima parsimonia (Peña, 2011).

## **Métodos de construcción de árboles filogenéticos**

### ***Neighbor-Joining***

Es el método más común en estudios de códigos de barras de DNA, y consiste en la creación de una matriz de distancias genéticas entre todas las secuencias a analizar. Posteriormente se junta las dos secuencias o ramas más cercanas, y se las nombra como un nuevo individuo, y se van añadiendo en orden una a una el resto de secuencias con la menor distancia genética, considerando a cada paso como una nueva entidad. La distancia genética se mide como el número de sustituciones en el DNA entre cada secuencia. El árbol filogenético obtenido no es útil para identificar relaciones evolutivas, sino similitud entre las especies, por lo que por lo general a las agrupaciones no se las suele considerar clados, ni grupos monofiléticos (Peña, 2011).

### ***Inferencia bayesiana***

Los métodos de inferencia bayesiana y *maximum likelihood* tienen similitudes, considerando que ambos se basan en modelos de evolución molecular. En este caso se busca estimar la probabilidad de qué tan bien el árbol es explicado por los datos. Este método hace uso del algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) un modelo estocástico que permite realizar el cálculo de probabilidades posteriores de cada árbol posible, es decir, de cada hipótesis. Además, requiere de un menor poder computacional que el método de máxima verosimilitud (Peña, 2011).

### ***Maximum Likelihood***

En este caso el método busca generar el árbol con mayor probabilidad (máxima verosimilitud) de explicar los datos observados, específicamente, las secuencias de DNA, por lo que se genera cada árbol posible según los parámetros seleccionados en el modelo de cambio evolutivo (Contreras Ramos, 2007).

### ***Máxima parsimonia***

Este método se basa en la solución más simple, minimizando el número de cambios evolutivos necesarios para explicar las diferencias observadas entre las secuencias de los organismos, por lo que todos los caracteres aportan con la misma influencia en la inferencia (Contreras Ramos, 2007).

### **Hipótesis**

Existen diferentes genotipos de ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) y WMV (*Watermelon mosaic virus*) infectando cucurbitáceas en las zonas productoras de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas.



### **Capítulo III: Materiales y métodos**

#### **Instituciones participantes**

El presente proyecto de investigación se desarrolló desde el 24 de octubre del 2022 hasta el 17 de febrero de 2023, por medio del convenio existente entre la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, AGROCALIDAD y la Universidad de las Fuerzas Armadas, con los fondos del Programa de Vigilancia Fitosanitaria de AGROCALIDAD.

#### **Colaboradores científicos**

Francisco J. Flores Flor, PhD.

Tutor de tesis

Ing. Jairo L. Guevara Andrade

Analista del laboratorio de Fitopatología,  
AGROCALIDAD

#### **Área de Estudio**

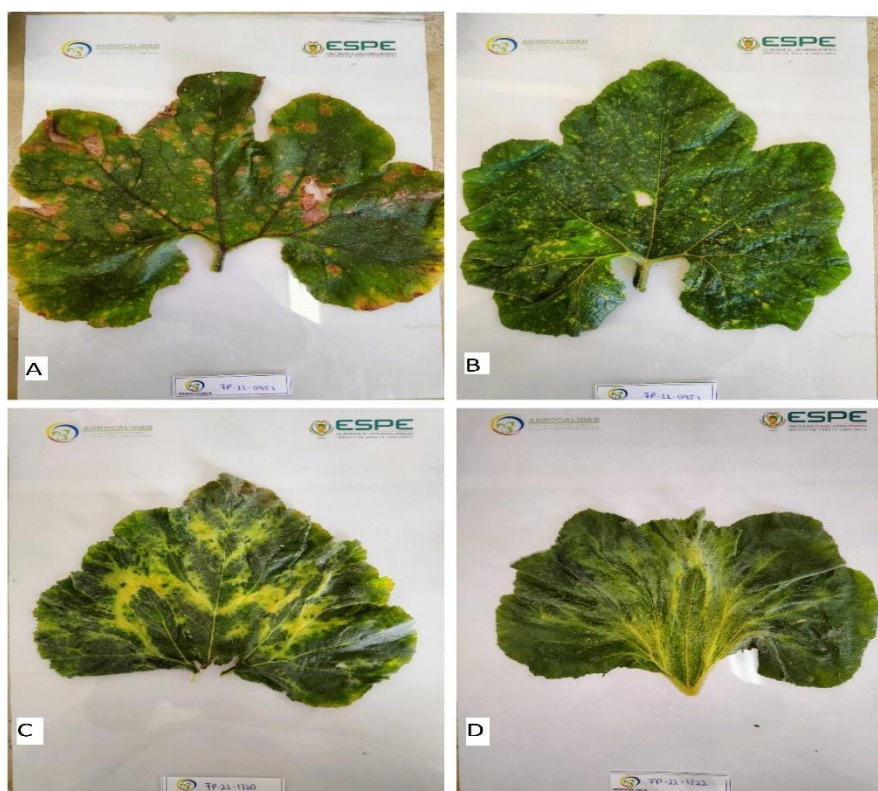
La investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, Sede Tumbaco, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, en la dirección: Eloy Alfaro y Federico González Suarez. Av. Interoceánica Km. 14 1/2, Sector La Granja, coordenadas: longitud 78.41142593090561 y latitud -0.2145009767230452.

#### **Material Biológico**

Se analizaron 40 muestras vegetales proveniente de las dependencias de AGROCALIDAD en las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas, por medio del Programa de Vigilancia Fitosanitaria (Tabla 1). El material vegetal se transportó en recipientes adecuados con refrigeración para preservar su integridad. Al llegar al laboratorio se procedió a separar las muestras con mayor sintomatología, buscando la presencia de mosaicos, coloración amarillenta, arrugamientos y otras posibles señales de infección (Figura 10). Las hojas se cortaron en pedazos de 1 cm<sup>2</sup> con tijeras desinfectadas y se almacenaron en tubos falcon a -20°C para su posterior uso.

## Figura 10

*Sintomatología identificada en las muestras foliares analizadas*



*Nota.* Se pueden identificar A) necrosis, B) Mosaicos, C) amarillamientos y bandeos, D) invaginaciones y arrugamientos en las muestras. Fotos tomadas por Jean Pierre Mejía (2022).

**Tabla 1**

*Muestras analizadas con sus procedencias, y cultivo afectado.*

<b>Muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Cultivo</b>
FP-22-0507	Guayas	Guayaquil	Tarqui	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-0508	Guayas	Guayaquil	Tarqui	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-0509	Guayas	Guayaquil	Tarqui	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-0530	Santa Elena	Santa elena	Santa Elena	<i>Cucumis sativus</i>

<b>Muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Cultivo</b>
FP-22-0531	Santa Elena	Santa elena	Santa Elena	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-0532	Santa Elena	Santa elena	Santa Elena	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-0534	Santa Elena	Santa elena	Santa Elena	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-0535	Santa Elena	Santa elena	Santa Elena	<i>Cucumis sativus</i>
FP-21-0340	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-21-0342	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-21-0344	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-21-0345	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-21-0346	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-21-0347	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-21-0348	Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-0957	Cotopaxi	Latacunga	Guaytacama	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-22-0958	Cotopaxi	Latacunga	Guaytacama	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-22-0959	Cotopaxi	Latacunga	San Buenaventura	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-22-0960	Cotopaxi	Latacunga	Juan Montalvo	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-22-0911	Los Ríos	Vinces	Antonio Sotomayor	<i>Citrullus lanatus</i>
FP-22-0912	Los Ríos	Baba	Baba	<i>Citrullus lanatus</i>
FP-22-0913	Los Ríos	Baba	Baba	<i>Citrullus lanatus</i>
FP-22-0914	Los Ríos	Vinces	Vinces	<i>Citrullus lanatus</i>
FP-22-0915	Los Ríos	Montalvo	Montalvo	<i>Citrullus lanatus</i>
FP-22-1037	Santa Elena	Santa elena	Chanduy	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-1038	Santa Elena	Santa elena	Chanduy	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-1039	Santa Elena	Santa elena	Colonche	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-1040	Santa Elena	Santa elena	Colonche	<i>Cucurbita maxima</i>

<b>Muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Cultivo</b>
FP-22-1041	Santa Elena	Santa elena	Colonche	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-1042	Santa Elena	Santa elena	Colonche	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-1230	Guayas	Naranjal	Taura	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-1319	Manabí	Rocafuerte	Rocafuerte	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-1320	Manabí	Rocafuerte	Rocafuerte	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-1321	Manabí	Tosagua	Bachillero	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-1322	Manabí	Tosagua	Bachillero	<i>Cucurbita maxima</i>
FP-22-1323	Manabí	Tosagua	Tosagua	<i>Cucumis sativus</i>
FP-22-1324	Manabí	Tosagua	Tosagua	<i>Cucumis melo</i>
FP-22-1325	Cotopaxi	Salcedo	Cusubamba	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-22-1326	Cotopaxi	Salcedo	Cusubamba	<i>Cucurbita ficifolia</i>
FP-22-1327	Cotopaxi	Salcedo	Cusubamba	<i>Cucurbita ficifolia</i>

## **ELISA**

La detección preliminar se realizó utilizando los kits de diagnóstico ACP- ELISA Potyvirus (Cat. No. SRA 27200, Agdia Inc., EE. UU.), DAS-ELISA ZYMV (Cat. No. SRA 77700, Agdia Inc., EE. UU.), DAS-ELISA WMV (Cat. No. SRA 54001, Agdia Inc., EE. UU.), DAS-ELISA PRSV (Cat. No. SRA 53500, Agdia Inc., EE. UU.) y TAS-ELISA CMV (Cat. No. SRA 44501, Agdia Inc., EE. UU.), siguiendo los protocolos descritos por el fabricante. Para la detección de ZYMV, WMV y PRSV se utilizó ELISA Double Antibody Sandwich (DAS) con anticuerpos policlonales específicos, para CMV se usó ELISA Triple Antibody Sandwich (TAS) con anticuerpo de captura policlonal, y anticuerpo de detección monoclonal, y finalmente para Potyvirus se usó ELISA indirecto con anticuerpo de detección monoclonal PTY1.

En los ELISA tipo sandwich, el primer paso fue la fijación del anticuerpo de captura en

los pocillos de las placas de poliestireno. Se diluyó cada anticuerpo en buffer carbonato 1X según la dilución sugerida en la etiqueta. Después de mezclar adecuadamente, se dispensó 100 µL en cada pocillo, y se incubó por 1 hora a 37°C dentro de una cámara húmeda.

Transcurrido ese tiempo se realizaron 4 lavados con Buffer PBST.

Los ensayos DAS y TAS ELISA sugieren una relación de 1:10 entre la muestra y el buffer, mientras que el ELISA directo se necesita de 1:100, por lo que se pesó entre 0,05 y 0,5 g de muestra, según lo requerido, y se maceró en 5 mL de buffer general de extracción (GEB) con la ayuda de un mortero y pistilo, procurando no tener una disolución muy espesa.

En DAS ELISA el siguiente paso fue dispensar 100 µL de la muestra macerada por duplicado, y los controles positivos y negativos suministrados en el kit, y se incubó de nuevo por 1 hora a 37 °C. Posteriormente se preparó el conjugado enzimático, es decir, el anticuerpo de detección y la enzima alcalina fosfatasa, diluyendo en ECI buffer acorde a las recomendaciones en la etiqueta. En el caso de TAS ELISA se prepara una solución de detección, que contiene un tercer anticuerpo y el conjugado enzimático, generando el triple sandwich. Se realizaron 8 lavados con PBST, y se dispensó 100 µL de solución de detección o conjugado enzimático dependiendo el caso, y se incubó por 1 hora a 37°C.

Finalmente se preparó el sustrato enzimático paranitrofenilfosfato (PNP) que permite la reacción cromogénica si la muestra contiene el antígeno. Se diluyó una pastilla del cromógeno en buffer PNP acorde a la recomendación de dilución del fabricante, y se almacenó en un recipiente ámbar en la oscuridad, debido a que la exposición a la luz puede causar falsos positivos. Se realizaron los 8 últimos lavados con PBST, se eliminó el exceso y se dispensaron 100 µL del sustrato, y se incubó a 37 °C por 1 hora.

Los resultados se analizaron por medio del espectrofotómetro BioTek ELX800 en el programa GEN5, a una longitud de onda de 405 nm, y se determinó el punto de corte (cut off) considerando el doble del control negativo ( $cut\ off = 2 * CN$ ). Las muestras con valores de

absorbancias por encima del cut off son consideradas como positivas, y las demás como negativas. Un valor de absorbancia superior a 0.5 en el control positivo es un indicador de que el ensayo está correctamente realizado.

### **Extracción de ARN total**

La extracción de ARN se realizó a las 17 muestras que resultaron positivas para al menos uno de los virus analizados. La técnica se llevó a cabo usando el *Kit GeneJET Plant RNA Purification*, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Se tomaron 100 mg del tejido sintomático almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se maceró en nitrógeno líquido. La muestra pulverizada se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL con 500  $\mu\text{L}$  de *Plant RNA Lysis Solution*, suplementada con 10  $\mu\text{L}$  de solución 2M de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se agitó en brevemente en Vortex, se incubó por 3 minutos en baño maría a  $56^{\circ}\text{C}$ , y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm.

El sobrenadante (entre 450-550  $\mu\text{L}$ ) se trasladó a un nuevo tubo de 1,5 mL con 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%, y se mezcló por pipeteo. La solución se llevó a una columna de purificación armada en un tubo colector, se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm, y se descartó la solución que quedó en el tubo colector.

En el siguiente paso se realizaron los lavados, por lo que se reensambló la columna, se añadió 700  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer 1 (suplementado con etanol) y se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm, y se eliminó el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se realizó un segundo lavado con 500  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer 2 (suplementado con etanol). Se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm, y se descartó la solución de flujo. Se repitió el segundo lavado, pero esta vez se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. De nuevo se descartó la solución de flujo, y se reensambló con un nuevo colector.

Finalmente, para el paso de elución del RNA se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm. Debido a que se esperaban altos rendimientos se repitió

este paso y se descartó la columna. El ARN purificado se transfirió a tubos PCR de 200  $\mu\text{L}$  y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se cuantificó y midió la pureza del ARN utilizando una alícuota de 2  $\mu\text{L}$  que se analizó en un espectrofotómetro NanoDrop a una longitud de onda de 260 nm.

### Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó con el ARN previamente extraído. Se utilizó el kit *SuperScript IV First Strand Synthesis System*, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se consideró un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . Primero se mezcló los componentes enlistados en la tabla 2 en un tubo PCR de 200  $\mu\text{L}$ , se incubó en baño maría por 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ , y se dejó en hielo por 1 minuto.

**Tabla 2**

*Componentes del ARN molde.*

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Oligo d(T) <sub>20</sub>	50 $\mu\text{M}$	1
dNTP mix	10 $\mu\text{M}$	1
ARN molde	-	9
Agua DEPC	-	2

En otro tubo PCR de 200  $\mu\text{L}$  se generó un master mix con los componentes de la tabla 3, se mezcló por pipeteo y se centrifugó rápidamente.

**Tabla 3**

*Componentes de la master mix para la síntesis de cDNA a partir del ARN molde.*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
SuperScript IV Buffer	5x	4
DTT	100 mM	1
Inhibidor de Ribonucleasas	-	1
SuperScript IV	-	1
Transcriptasa inversa		

Se dispensaron 7  $\mu$ L del master mix de retrotranscripción en el ARN molde del primer tubo, y se incubó a 55°C por 10 minutos, seguido de una inactivación de la reacción a 80 °C por 10 minutos. Finalmente se almacenó a -20°C para su posterior uso en PCR.

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se realizó PCR convencional con cebadores universales para la familia Potyvirus, que permiten la amplificación de una región de 350 pb del gen que codifica para la proteína de inclusión nuclear b (Nib). Las secuencias de los primers Nib2F y Nib3R se indican en la tabla 4.

**Tabla 4**

*Secuencias de los cebadores Nib2F y Nib3R, y tamaño del amplicón esperado en la amplificación de un segmento del gen Nib de Potyvirus.*

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del fragmento amplificado</b>
Nib2F	5 -GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA-3	350 pb
Nib3R	5- TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC-3	350 pb



La reacción de PCR se realizó mediante el kit *Invitrogen Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase*, con un volumen de reacción final de 50  $\mu\text{L}$ , como si detalla en la tabla 5.

**Tabla 5**

*Componentes de la master mix usada en las reacciones PCR para Potyvirus.*

Reactivo	Concentración		1 Rx ( $\mu\text{L}$ )
	Inicial	final	
H2O	-	-	20,2
PCR buffer	5X	1X	10
Enhancer	-	10 $\mu\text{L}$	10
dNTP's	10mM	0,08mM	0,4
Primer forward	10 pmol	0,4 mM	2,0
Primer reverse	10pmol	0,4 mM	2,0
Taq polymerase Platinum	-	0,040 $\mu\text{L}$	0,4
cDNA	-	-	5,0
<b>Volumen total</b>			<b>50</b>

La amplificación se realizó usando el termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, con las condiciones descritas en la tabla 6.

**Tabla 6**

*Parámetro de amplificación por PCR para Potyvirus.*

<b>Ciclos PCR</b>	<b>Condiciones</b>
Desnaturalización inicial	94 °C por 5 min
Desnaturalización	94 °C por 45seg
Hibridación	50 °C por 1 min
Extensión	72 °C por 1 min
Extensión final	72 °C por 10 min
Número de ciclos	38

### **Electroforesis**

Para visualizar los resultados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Ultrapure™ Agarose) con 4 µL de la tinción GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain. Se dispensaron 4 µL del marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder y 4 µL de los productos PCR, con 2 µL de 10X BlueJuice™. Se realizó una corrida a 90 Voltios por 40 minutos con la fuente de poder PowerPac™ BIO-RAD, y finalmente las bandas obtenidas se observaron en un transiluminador UV.

### **Secuenciación**

Se tomó 20 µL de los productos PCR obtenidos, y se enviaron a secuenciar en la compañía ©Macrogen en Corea del Sur, que trabaja con el método de Sanger y utiliza secuenciadores por electroforesis capilar ABI 3730xl.

### **Análisis bioinformático**

Las secuencias forward y reverse en formato FASTA se recortaron y ensamblaron mediante el programa Genious para obtener una secuencia consenso. Luego se realizó un alineamiento local en BLASTn para identificar las especies virales. Haciendo uso del programa

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11 v11.0.11) se generó un alineamiento múltiple por nucleótidos con el método MUSCLE manteniendo los ajustes predeterminados. El alineamiento se realizó con 12 secuencias con alto porcentaje de identidad obtenidas de GenBank (Tabla 7). Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV). Se seleccionó el mejor método de evolución (T92+G: Tamura 3-parameter con distribución discreta Gamma) y finalmente por el algoritmo de Maximum Likelihood se generó un árbol filogenético con las especies analizadas. Se utilizó un valor de Bootstrap de 500 réplicas.

### Tabla 7

Lista de 12 secuencias de homólogas con las que se analizó la filogenia

Aislado	Especie	Familia	País	Huesped	N° de accesión
75NT	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	Australia	Rockmelon	KY225547
DSMZ PV-1261	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	Reino Unido	<i>Cucurbita pepo</i>	OM471983
leaf17	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	USA	<i>Cucurbita pepo</i>	KJ923768
SG5	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	USA	<i>Cucurbita pepo</i> ssp. texana	KC665635
FG4	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	USA	<i>Cucurbita pepo</i> ssp. texana	KC665628
ZYMV-California	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	USA	-	L31350.1
7th	ZYMV	<i>Potyviridae</i>	USA	<i>Cucurbita pepo</i> ssp. texana	JN192422

<b>Aislado</b>	<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>País</b>	<b>Huesped</b>	<b>N° de accesión</b>
PRSV strain P / mutant HA 5-1	PRSV	<i>Potyviridae</i>	USA	<i>Carica papaya</i>	MT470188
DSMZ PV-0244	PRSV	<i>Potyviridae</i>	Italia	-	OP947576
PRSV-Z43	PRSV	<i>Potyviridae</i>	España	-	DQ645730
Pune (Aundh) VC	PRSV	<i>Potyviridae</i>	India	<i>Vasconcellea cauliflora</i>	MF405299
TVBMV-SDZC1	TVBMV	<i>Potyviridae</i>	China	<i>Tobacco</i>	HQ396793

## Capítulo IV: Resultados

### ELISA

Se aplicaron en total 200 ensayos ELISA entre las 40 muestras sintomáticas provenientes de las provincias de Santa Elena, Manabí, Cotopaxi, Los Ríos y Guayas. Los ensayos se dividieron en 40 para cada virus. Todas las muestras analizadas mostraban sintomatología que podría corresponder a virosis, sin embargo, el ensayo serológico reveló que solo 17 de las 40 muestras analizadas dieron positivo a al menos uno de los virus, de los cuales 13 fueron por el género Potyvirus, 6 fueron ZYMV, 1 fue WMV, 10 fueron PRSV y 3 fueron CMV. Además, se confirmó la presencia de infecciones múltiples, encontrando una doble infección con ZYMV y PRSV (FP- 21-0340), una con PRSV y CMV (FP-22-1320), y una triple de WMV, PRSV, y CMV (FP-22-1230) (Tabla 7).

### Tabla 8

*Resultados de los ensayos serológicos ELISA correspondiente a Potyvirus, ZMYV, WMV, PRSV y CMV*

#	Muestra	Provincia	Cultivo	Potyvirus	ZYMV	WMV	PRSV	CMV
1	FP-21-0340	Cotopaxi	Sambo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
2	FP-21-0342	Cotopaxi	Zapallo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
3	FP-21-0344	Cotopaxi	Zapallo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
4	FP-21-0345	Cotopaxi	Zapallo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
5	FP-21-0346	Cotopaxi	Sambo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	FP-21-0347	Cotopaxi	Zapallo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
7	FP-22-0507	Guayas	Zapallo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
8	FP-22-0508	Guayas	Zapallo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
9	FP-22-0509	Guayas	Zapallo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

#	Muestra	Provincia	Cultivo	Potyvirus	ZYMV	WMV	PRSV	CMV
10	FP-22-0913	Los Ríos	Sandia	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
11	FP-22-0915	Los Ríos	Sandia	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
12	FP-22-0959	Cotopaxi	Sambo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
13	FP-22-0960	Cotopaxi	Sambo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
14	FP-22-1230	Guayas	Zapallo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
15	FP-22-1322	Manabí	Zapallo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
16	FP-22-1320	Manabí	Pepino	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
17	FP-22-1325	Cotopaxi	Sambo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

Una de las irregularidades más importantes encontradas fue que 4 muestras dieron resultados negativos al género Potyvirus, sin embargo, reaccionaron positivamente con el antisuero de PRSV, una especie de Potyvirus.

#### **Extracción de ARN total y síntesis de cDNA**

Se realizó la extracción de ARN total a las 17 muestras que obtuvieron resultados positivos en los ensayos serológicos por medio del Kit *GeneJET Plant RNA Purification*, obteniendo concentraciones entre 18,3 y 1218 ng/μL. La relación de absorbancia 260/280 se encontró entre los rangos de 1,84 y 2,12, y la relación 260/230 estuvo entre 1,66 y 2,23.

Posteriormente se continuó con la retrotranscripción para obtener cDNA, haciendo uso del kit *SuperScript IV First Strand Synthesis System*, lo que permitió obtener concentraciones de entre 1229,3 y 2273,3 ng/μL, y relaciones de absorbancia 260/280 entre 1,73 y 1,84, y la relación 260/230 entre 1,44 y 2,09.

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis**

La amplificación del cDNA se realizó mediante PCR convencional considerando los

parámetros previamente descritos (Tabla 6). Se obtuvieron resultados negativos en todas las muestras, pues no se pudo observar la presencia de amplicones en ninguno de los carriles. Por su parte, el control positivo presenta amplificación, y el control negativo no, por lo que se evidencia que el ensayo se realizó correctamente, y que el protocolo es el adecuado. Adicionalmente en varias de las muestras es posible observar la presencia de un barrido en el gel.

### Figura 11

*Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos PCR del gen Nlb*



*Nota.* Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: FP-21-0340, Carril 3: FP-21-0342, Carril 4: FP-21-0344, Carril 5: FP-21-0345, Carril 6: FP-22-0508, Carril 7: FP-22-0960, Carril 8: FP-22-1230, Carril 9: FP-21-0346, Carril 10: Control negativo, Carril 11: Control positivo de potyvirus.

**Figura 12**

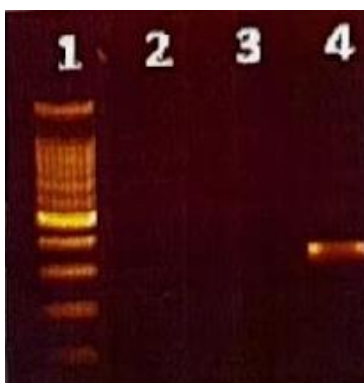
*Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos PCR del gen Nlb*



*Nota.* Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: FP-21-0347, Carril 3: FP-22-0507, Carril 4: FP-22-0509, Carril 5: FP-22-0913, Carril 6: FP-22-0915, Carril 7: FP-22-0959, Carril 8: FP-22-1320, Carril 9: FP-22-1322, Carril 10: Control negativo, Carril 11: Control positivo de potyvirus.

**Figura 13**

*Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos PCR del gen Nlb*



*Nota.* Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: FP-22-1325, Carril 3: Control negativo, Carril 4: Control positivo de Potyvirus.

**Secuenciación**

Debido a que se obtuvieron resultados negativos en la PCR, se utilizaron secuencias previamente obtenidas en el Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD,



correspondiente a las muestras FP-21-0340, FP-21-0342, FP-21-0344, FP-21-0345, FP-21-0346 y FP-21-0347.

Al realizar una búsqueda en BLASTn por alineamiento local con las secuencias consenso se encontró una homología del 89.42% con PRSV, y de entre 91.67 y 99.35% con ZYMV en 6 casos.

### Tabla 9

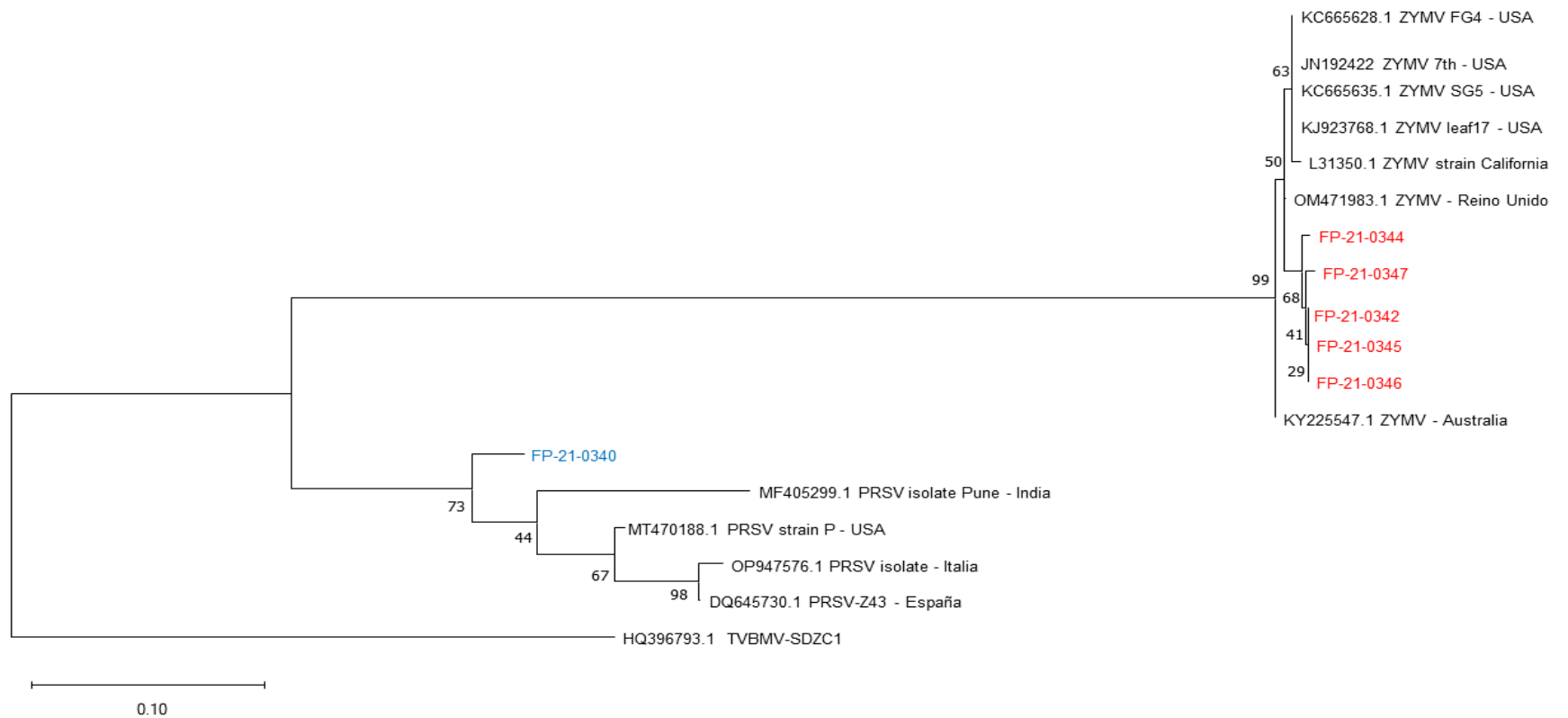
*Homologías de las secuencias consenso en base a la búsqueda en BLASTn*

<b>Código de muestra</b>	<b>Virus identificado</b>	<b>Query cover</b>	<b>E-value</b>	<b>% de identidad</b>
FP-21-0340	PRSV-P	100%	1e-100	89.42%
FP-21-0342	ZYMV	99%	2e-153	99.35%
FP-21-0344	ZYMV	99%	4e-151	99.02%
FP-21-0345	ZYMV	100%	2e-153	99.35%
FP-21-0346	ZYMV	100%	3e-147	99.32%
FP-21-0347	ZYMV	100%	3e-157	96.50%

## Análisis filogenético

### Figura 14

Árbol filogenético de máxima verosimilitud para las 7 secuencias analizadas, 11 secuencias representativas de varias especies de *Potyvirus*, y un grupo externo.



*Nota.* Se utilizó la secuencia de *Tobacco vein banding mosaic virus* (No. HQ396793) como grupo externo. Las secuencias consenso correspondientes a las muestras analizadas se indican en color rojo para las cepas de ZYMV y azul para WMV. En cada rama se indican los números de accesoión y el origen de cada secuencia. El valor de bootstrap se indica en cada nodo.

La muestra FP-21-0340 mediante ELISA fue identificada con una infección mixta por ZYMV y PRSV, mientras que el análisis de su secuencia en BLAST presentó una homología del 89.42% con PRSV, y el análisis filogenético revela que forman un clado aislado con las secuencias de PRSV (No. MT470188, No. OP947576, No. DQ645730, No. MF405299) correspondientes a la cepa PRSV-P.

El resto de secuencias formaron un clado aislado, con un valor de Bootstrap de 99 con las secuencias de referencia de ZYMV. La muestra FP-21-0347 por ELISA dio negativo a ZYMV y positivo a PRSV, mientras que su secuencia por medio de BLASTn mostró una homología del 96.5% con ZYMV, y analizando la filogenia se observa una relación más cercana con el aislado ZYMV de Reino Unido (No. OM471983). Las muestras FP-21-0344, FP-21-0342, FP-21-0345 por ELISA dieron resultados positivos a ZYMV, lo que se respaldó mediante BLASTn con porcentajes de homología de entre 99.02 y 99.35%, y en el árbol se observa que se encuentran en el mismo clado que la cepa de Reino Unido de ZYMV. Finalmente, la muestra FP-21-036 por ELISA únicamente se mostró positiva para el género potyvirus, aunque mostró homología por ZYMV mediante búsqueda en BLASTn , y el análisis filogenético la agrupó de igual manera.

## Capítulo V: Discusión

De las 17 muestras que resultaron positivas con al menos uno de los antisueros se encontraron 3 infecciones mixtas, siendo dos de ellas dobles (ZYMV y PRSV, PRSV y CMV) y una triple (WMV, PRSV y CMV). El factor común en estas infecciones es la presencia de PRSV, y esto puede deberse a un posible sinergismo, ya que en infecciones múltiples el orden de la infección es determinante en algunos casos, pues cuando PRSV ataca primero, no existe un aumento significativo en la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) como método de defensa de la planta (Chávez-Calvillo et al., 2016).

Por otro lado, en campo existe una alta frecuencia de infecciones mixtas entre potyvirus y CMV en el cultivo de cucurbitáceas, y aunque es un evento que ya ha sido estudiado, falta por identificar los mecanismos moleculares por los cuales actúa el fenómeno de sinergismo, y en algunos casos de antagonismo. Se ha demostrado que una infección mixta de CMV–IA o CMV–II con ZYMV o WMV, conduce a una mayor acumulación de ARN de CMV, aunque no existe variación en potyvirus. El cambio en CMV se debe, tanto al aumento en el número de partículas virales, como a un mayor número de células infectadas. Además, en este caso, el sinergismo ocurre independientemente del orden de infección (Y. Wang et al., 2002).

Las diferentes respuestas de sinergia y antagonismo con respecto al orden de inoculación, pueden deberse a que cada virus posee genes para suprimir las defensas del huésped, y el orden en que atacan puede afectar la supresión del silenciamiento génico postranscripcional mediado por los genes virales. En cuanto a las interacciones ZYMV/WMV, se conoce que sus infecciones no generan protección cruzada, es decir, antagonismo, sino que la previa inoculación por WMV puede reducir la capacidad de la planta para resistir a ZYMV (Xu et al., 2004).

En general, las infecciones mixtas pueden conducir a una mayor virulencia y acumulación viral en casos de sinergismo, además de propiciar oportunidades de

recombinación genética. Esto sumado a que una de las particularidades más importantes de los virus de ARN es su alta tasa de mutación, debido a sus ARN polimerasas sin actividad correctora, puede desencadenar en que una sola molécula de ARN puede generar una población de variantes o haplotipos. Esta alta variabilidad genética puede afectar a los protocolos de detección establecidos, ya que en distintas áreas geográficas pueden generarse variantes divergentes que no sean reconocidas por cebadores específicos en una PCR convencional (Rubio et al., 2020).

A pesar de que las técnicas moleculares sean más sensibles que las serológicas, existen problemas que pueden causar falsos negativos. La sensibilidad de RT-PCR para la detección de virus vegetales puede verse afectada por la presencia de inhibidores enzimáticos, una concentración viral por debajo del límite de detección o degradación del material genético (Moreno et al., 2009). En el caso de las técnicas serológicas, como ELISA, la variabilidad genética de cada virus, y las relaciones genéticas entre especies pueden afectar a los resultados, ya que los antígenos pueden presentar reacciones cruzadas, especialmente cuando se usa antisueros policlonales. Aunque el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a un único epítipo podría solucionar parcialmente este inconveniente, la dificultad de producción de los mismos para las distintas especies virales se vuelve un desafío (Sharma et al., 2014). Dentro de las ventajas del uso de ELISA se encuentra que las proteínas de los antígenos se encuentran ampliamente conservadas, y no sufren de mutaciones tan rápidas como el ARN (Boonham et al., 2014).

Los cebadores N1b2F y N1b3R utilizados en el ensayo PCR fueron diseñados en 2005 usando todas las secuencias completas de potyvirus disponibles para la época (Zheng et al., 2010). Sin embargo, se conoce que el diseño de cebadores dirigidos a regiones conservadas en unidades taxonómicas superiores a especies, es complicado, debido a creciente diversidad de nucleótidos (Rubio et al., 2020). El ARN es una molécula muy inestable, por lo que se debe

tener se debe tener mucho cuidado con el almacenamiento y manipulación del material vegetal, así como durante el proceso de extracción del ácido nucleico, pues estos son pasos claves para obtener buenos resultados en un ensayo RT-PCR (Díaz et al., 2010). Se recomienda congelar inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  las muestras o hacer uso de nitrógeno líquido para congelamiento instantáneo para preservar el material genético. Es importante destacar que se puede observar la presencia de barridos en varias de las muestras en el gel de electroforesis, lo que podría explicarse por una posible degradación del ARN viral, o de dímeros de primers, sin embargo, el control positivo presenta una banda definida, por lo que esta última hipótesis se descarta (Bolívar et al., 2014). Adicionalmente se realizó una segunda extracción de ARN, obteniendo los mismos resultados, es decir, no hubo amplificación en las muestras, y existió la presencia de barridos. También se debe mencionar que, aunque en la mayoría de muestras existía una concentración adecuada de ADN, los valores de la relación de absorbancia 260/230 presentan valores cercanos a 1.6, lo que puede indicar contaminación por proteínas o sales, aunque usualmente no se considera a este como un indicador confiable (Lucena-Aguilar et al., 2016).

En este caso, a pesar de que 17 de las 40 muestras dieron positivo por serología, no existió amplificación por PCR, lo que se puede explicar debido a que los antígenos por lo general, son más estables ante condiciones adversas, y pueden mantenerse por más tiempo que el material genético viral (Celedon et al., 2021).

En cuanto al análisis filogenético, las muestras FP-21-0344, FP-21-0347, FP-21-0342, FP-21-0345 y FP-21-0346 forman un conglomerado independiente junto a las demás secuencias de referencia de ZYMV, con un valor de Bootstrap de 99, lo que demuestra la robustez del nodo. Además, las distancias evolutivas, observadas por medio de la longitud horizontal de las ramas, demuestra que las cepas en cuestión tienen un gran porcentaje de homología en sus secuencias. Existe también una gran similitud con el aislado de Reino Unido de ZYMV (No.

OM471983), debido a variaciones menores en sus secuencias y una gran cercanía evolutiva (Moreno et al., 2009).

Los porcentajes o valores de Bootstrap que aparecen en cada nodo, indican la confiabilidad del cluster, y cuanto mayor es el número, más confiable es la estimación de los taxones que descienden de él, ya que representa la proporción de filogenias que replican un clado en particular (Russo & Selvatti, 2018). Por lo general, valores mayores al 70% se consideran confiables (Hall, 2013).

Las infecciones múltiples pueden generar resultados inespecíficos por medio de PCR al usar un cebador universal, pues uno de los dos virus podría no ser amplificado, lo que se evidencia al momento de analizar las secuencias, y observar su homología y ubicación en el árbol de máxima verosimilitud, como se observa en la muestra FP-21-0340 y FP-21-0347 que fueron reportadas como infecciones mixtas por serología, pero sus secuencias demostraron ser homólogas únicamente para una especie. Si se encuentra una infección múltiple mediante ELISA, es necesario usar primers específicos o que amplifiquen otra zona del genoma en PCR (Valouzi et al., 2019).

### Conclusiones

1. Tras analizar las 40 muestras vegetales por medio de ELISA se logró identificar 17 casos positivos para al menos uno de los virus, encontrando la presencia de ZYMV, PRSV, CMV, WMV, y Potyvirus. Además, se encontraron 2 infecciones dobles, y una triple.
2. No se obtuvieron productos de amplificación mediante PCR en ninguna de las muestras positivas por ELISA, sin embargo, fue muy común la presencia de barridos en el gel de electroforesis, lo que puede indicar una posible degradación del ARN viral debido a problemas en el almacenamiento de las muestras.
3. Por medio de análisis filogenéticos se identificó que las cepas circulantes de ZYMV se agrupan en un solo conglomerado independiente junto a las secuencias de referencias del mismo virus, en especial por el aislado británico (No. OM471983), lo que demuestra una mayor cercanía evolutiva.
4. Fue posible la identificación de 1 caso de WMV en muestras provenientes de la provincia del Guayas mediante ELISA, sin embargo, no se pudo verificar el resultado del análisis por PCR debido los inconvenientes antes mencionados. Este constituye el primer caso reportado WMV en cucurbitáceas en el país.



### Recomendaciones

1. Las muestras vegetales analizadas deben ser inmediatamente almacenadas a una temperatura adecuada (-20°C) para evitar en la medida de lo posible la degradación del material genético viral, pues en el proceso de transporte no siempre se mantiene una cadena de frío.
2. En el caso de trabajar con muestras vegetales en ELISA y PCR, es útil separarlas en tubos falcon al momento de muestrear, y que una de las muestras no se retire nunca del congelamiento hasta su procesamiento en PCR.
3. Al momento de realizar un ensayo ELISA es necesario utilizar controles positivos frescos con el fin de evaluar si la prueba se realizó correctamente.
4. Es necesario utilizar un control interno si se va a trabajar con RNA, y por ende con retrotranscripción, con el fin de evaluar la calidad del cDNA obtenido.
5. Es conveniente secuenciar en ambas direcciones para obtener una secuencia consenso de buena calidad, sin embargo, secuenciar genes más grandes permite obtener más información para ubicar las secuencias de mejor manera dentro del árbol.

## Bibliografía

- AGROCALIDAD. (2017). *Guía de trabajo para la elaboración de Análisis de Riesgo de Plagas*. Resolución 0062 Retrieved from <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/arp13.pdf>
- Ajuru, M. G., & Okoli, B. E. J. I. J. o. M. B. (2013). The morphological characterization of the melon species in the family Cucurbitaceae Juss., and their utilization in Nigeria. *3*(2), 15-19.
- Asad, Z., Ashfaq, M., Inam-Ul-Haq, M., Irshad, G., & Khan, M. A. J. P. J. B. (2022). Current status and molecular characterization of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infecting ridge gourd (*Luffa acutangula* L.) in different regions of Punjab, Pakistan *54*(2), 467-474.
- Bates, D. M., Robinson, R. W., & Jeffrey, C. (1990). *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*: Cornell University Press.
- Bermúdez-Guzmán, M. d. J., Guzmán-González, S., Lara-Reyna, J., Palmeros-Suárez, P. A., López-Muraira, I. G., & Gómez-Leyva, J. F. J. R. m. d. f. (2018). Presencia de Papaya ringspot virus (PRSV) en arvenses asociadas a *Carica papaya* en Colima, México. *36*(1), 1-15.
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Lugo, P. G. J. A. e. b. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *3*(1), 25-33.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. J. V. r. (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *186*, 20-31.
- CABI. (2017). Potyvirus bean common mosaic virus. *Cabi Compendium*.
- CABI. (2022). Invasive Species Compendium. *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. Retrieved from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17070>
- Carr, J. P., Tungadi, T., Donnelly, R., Bravo-Cazar, A., Rhee, S.-J., Watt, L. G., . . . Arinaitwe,

- W. J. V. R. (2020). Modelling and manipulation of aphid-mediated spread of non-persistently transmitted viruses. *277*, 197845.
- Celedon, P. A. F., Leony, L. M., Oliveira, U. D., Freitas, N. E. M., Silva, Â. A. O., Daltro, R. T., . . . Santos, F. L. N. J. B. (2021). Stability assessment of four chimeric proteins for human Chagas disease immunodiagnosis. *11(8)*, 289.
- Chávez-Calvillo, G., Contreras-Paredes, C. A., Mora-Macias, J., Noa-Carrazana, J. C., Serrano-Rubio, A. A., Dinkova, T. D., . . . Silva-Rosales, L. J. V. (2016). Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *489*, 179-191.
- CONABIO. (2006). Capital Natural y Bienestar Social. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*.
- Contreras Ramos, A. (2007). *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad*: UAEH.
- Crowther, J. R. (2009). *The ELISA guidebook* (Vol. 566): Springer.
- Desbiez, C., & Lecoq, H. J. A. o. V. (2004). The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *149(8)*, 1619-1632.
- Díaz, A., Quiñones, M., Hernández, A., & Barrio, G. d. J. R. d. P. V. (2010). Evaluation of analytical parameters for the molecular detection of potyviruses affecting pepper crops in Cuba. *25(2)*, 80-87.
- Elbeshehy, E. K., Metwali, E. M., & Almaghrabi, O. A. J. S. j. o. b. s. (2015). Antiviral activity of Thuja orientalis extracts against watermelon mosaic virus (WMV) on *Citrullus lanatus*. *22(2)*, 211-219.
- FAOSTAT. (2021). Crops and livestock products. Retrieved from Crops and livestock products
- Ganadería, M. d. A. y. (2017). *Resolución 0122*. Registro Oficial N° 101 Retrieved from <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu183341.pdf>

- Gonsalves, D., Tripathi, S., Carr, J. B., & Suzuki, J. Y. J. T. P. H. I. (2010). Papaya ringspot virus. *10*, 1094.
- Hall, B. G. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(5), 1229-1235. doi:10.1093/molbev/mst012 %J Molecular Biology and Evolution
- Harth, J., Simmons, H., & Stephenson, A. J. E. J. o. P. P. (2017). Vertical infection of Zucchini yellow mosaic virus via pollen transmission occurs at a lower frequency than ovule transmission. *147*(3), 717-720.
- INEC. (2000). Bases de datos - Censo Nacional Agropecuario 2000. Retrieved from <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>
- Inoue-Nagata, A. K., Jordan, R., Kreuze, J., Li, F., López-Moya, J. J., Mäkinen, K., . . . Wylie, S. J. J. J. o. G. V. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae 2022. *103*(5), 001738.
- Ivanov, K. I., Eskelin, K., Lõhmus, A., & Mäkinen, K. (2014). Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *95*(7), 1415-1429.  
doi:<https://doi.org/10.1099/vir.0.064220-0>
- Jacquemond, M. J. A. i. v. r. (2012). Cucumber mosaic virus. *84*, 439-504.
- Khaled-Gasmi, W., Souissi, R., & Boukhris-Bouhachem, S. (2023). Cucumber mosaic virus epidemiology in pepper: Aphid dispersal, transmission efficiency and vector pressure. *182*(1), 101-111. doi:<https://doi.org/10.1111/aab.12798>
- Kim, B., Cho, I.-S., Kim, I.-H., Choi, G.-W., Ju, H.-K., Hu, W.-X., . . . Domier, L. L. J. J. o. P. P. (2019). Length of poly (A) tail affects transcript infectivity of three ZYMV symptom variants differing at only five amino acid positions. *101*(4), 1187-1193.
- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. J. N. r. o. t. I. C. o. T. o. V. (2012). Virus taxonomy. *9*, 1069-1072.
- Konstantinou, G. (2017). *Food Allergens: Methods and Protocols* (Vol. 1592). Methods in

Molecular Biology: Springer Protocols.

- Lamichhaney, D., Pant, B., Baidya, S., & Sah, L. (2021). Prevalence of Viral Diseases in Vegetable Crops in Kathmandu Valley and their Detection by ELISA and Immunostrip Tests.
- Leach, A., & Kaplan, I. (2022). Prioritizing pollinators over pests: wild bees are more important than beetle damage for watermelon yield. *289*(1986), 20221279.  
doi:doi:10.1098/rspb.2022.1279
- Lecoq, H., & Desbiez, C. (2008). Watermelon mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus. In: Academic Press.
- Lee, H.-J., Cho, I.-S., & Jeong, R.-D. (2022). First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus Infecting Bitter Melon (*Momordica charantia*) in South Korea. *106*(11), 3003.  
doi:10.1094/pdis-11-21-2500-pdn
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, *51*(12), 2415-2418. doi:10.1373/clinchem.2005.051532 %J  
Clinical Chemistry
- Lira, R. R. J., Concepción, Alvarado, José; Rodríguez, Isela; Castrejón, JAvier. (1998). Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botanica Mexicana*, *42*, 43-77.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, J. A., López-Guerrero, J. A., Aguilar-Quesada, R. J. B., & Biobanking. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *14*(4), 264-270.
- Ma, H., & Shieh, K.-J. J. N. S. (2006). ELISA technique. *4*(2), 36-37.
- Mandoulakani, B. A., Rahmanpour, S., Shaaf, S., Khoei, S. G., Rastgou, M., & Rafezi, R. J. S. A. J. o. B. (2015). Towards the identification of retrotransposon-based and ISSR molecular markers associated with populations resistant to ZYMV in melon. *100*, 141-

147.

Mochizuki, T., & Ohki, S. (2012). Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants.

13(3), 217-225. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x>

Moreno, S., Alvarado, M. V., Bermúdez, A., & Gutiérrez, M. F. J. B. (2009). Análisis filogenético de las cepas de rotavirus y virus de la hepatitis A encontradas en agua de consumo en el municipio de Quibdó, Chocó. 29(2), 209-217.

Naranjo, J. (2014). *Evaluación de la Tolerancia a la Salinidad de Cucurbitáceas Silvestres del Ecuador y sus Potenciales Usos como Patrones en Injertos de Cucurbitáceas*

*Comerciales*. Escuela Politécnica del Litoral, Retrieved from

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25205/1/TESIS%20JAIME%20NARANJO.pdf>

Pandawani, N. P., Widnyana, I. K., & Ariati, P. E. P. (2020). *Aphids Identification and Ability*

*Test in Transmitting Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV)*. Paper presented at the

Proceeding 1st International Conference of Innovation on Science and Technology for Sustainable development (ICISTSD) 2020.

Paredes, G., Idrogo, C. R., Tarazona, A. S., & Núñez, L. V. J. R. F. M. (2014). Caracterización de frutos y semillas de algunas cucurbitáceas en el norte del Perú. 37, 7-20.

Paredes, J. (2011). *Capacidad de dos especies de áfidos (homóptera: aphididae) para transmitir Squash Mosaic Virus- SqMV en melón bajo condiciones de invernadero e identificación de enemigos naturales*. Escuela Politécnica del Litoral, Retrieved from

<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/14458>

Peña, C. J. R. p. d. B. (2011). Métodos de inferencia filogenética. 18(2), 265-267.

Pu, Y.-T., Luo, Q., Wen, L.-H., Li, Y.-R., Meng, P.-H., Wang, X.-J., & Tan, G.-F. (2021). Origin, Evolution, Breeding, and Omics of Chayote, an Important Cucurbitaceae Vegetable

Crop. 12. doi:10.3389/fpls.2021.739091

- Rajasree, Francis, F., & William, H. B. (2016). *Phytochemicals of Cucurbitaceae Family – A Review*.
- Rubio, L., Galipienso, L., & Ferriol, I. J. F. i. p. S. (2020). Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. *11*, 1092.
- Rudneva, T., Shevchenko, T., Budzanivska, I., Shevchenko, O., & Polischuk, V. J. R. d. N. (2006). Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. *43*(6), 508-510.
- Russo, C. A. d. M., & Selvatti, A. P. (2018). Bootstrap and Rogue Identification Tests for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(9), 2327-2333.  
doi:10.1093/molbev/msy118 %J Molecular Biology and Evolution
- Saboo, S. S., Thorat, P. K., Tapadiya, G. G., & Khadabadi, S. J. I. J. o. T. A. (2013). Ancient and recent medicinal uses of cucurbitaceae family. *9*, 11-19.
- Schaefer, H., Heibl, C., & Renner, S. S. (2009). Gourds afloat: a dated phylogeny reveals an Asian origin of the gourd family (Cucurbitaceae) and numerous oversea dispersal events. *276*(1658), 843-851. doi:doi:10.1098/rspb.2008.1447
- Sevik, M. A. J. A. (2018). Características biológicas y serológicas del Virus mosaico amarillo del calabacín aislado de calabacín (*Cucurbita pepo*), calaba de invierno (*C. Maxima*) y calabaza (*C. Moschata*). *52*(7), 1005-1011.
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *77*(7), C98-C101. doi:10.12968/hmed.2016.77.7.C98
- Sharifi, M., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., Shaabani, M., & Rahimian, H. J. V. G. (2008). Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran. *37*(3), 304-313.
- Sharma, P., Sahu, A. K., Verma, R. K., Mishra, R., Choudhary, D., Gaur, R. J. A. o. P., & Protection, P. (2014). Current status of Potyvirus in India. *47*(8), 906-918.

- Simmons, H., Dunham, J., Zinn, K., Munkvold, G., Holmes, E., & Stephenson, A. J. V. R. (2013). Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *176*(1-2), 259-264.
- Simmons, H., Holmes, E. C., Gildow, F. E., Bothe-Goralczyk, M. A., & Stephenson, A. G. (2011). Experimental Verification of Seed Transmission of Zucchini yellow mosaic virus. *95*(6), 751-754. doi:10.1094/pdis-11-10-0843
- Srinivasan, R., Hall, D. G., Cervantes, F. A., Alvarez, J. M., & Whitworth, J. L. (2012). Strain Specificity and Simultaneous Transmission of Closely Related Strains of a Potyvirus by *Myzus persicae*. *Journal of Economic Entomology*, *105*(3), 783-791. doi:10.1603/EC11310 %J Journal of Economic Entomology
- Tripathi, S., Suzuki, J. y., Ferreira, S. a., & Gonsalves, D. (2008). Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *9*(3), 269-280. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00467.x>
- Valles, S. M., Strong, C. A., Emmitt, R. S., Culkin, C. T., & Weeks, R. D. (2020). Efficacy of the InvictDetect™ ImmunoStrip® to Taxonomically Identify the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta*, Using A Single Worker Ant. *11*(1), 37.
- Valouzi, H., Golnaraghi, A., Hashemi, S.-S., Abedini-Aminabad, L., & Yazdani-Khameneh, S. J. C. J. o. P. P. (2019). Detection of potyviruses infecting Iranian common beans using broad-spectrum antibodies and universal primer pairs. *41*(4), 535-543.
- Van Regenmortel, M., & Mahy, B. (2009). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Academic Press.
- Wang, J., Sun, P., Li, Y., Liu, Y., Yang, N., Yu, J., . . . Wang, X. (2017). An Overlooked Paleotetraploidization in Cucurbitaceae. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(1), 16-26. doi:10.1093/molbev/msx242 %J Molecular Biology and Evolution
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., & Gal-On, A. (2002). Characterization of Synergy



Between Cucumber mosaic virus and Potyviruses in Cucurbit Hosts. *92*(1), 51-58.

doi:[10.1094/phyto.2002.92.1.51](https://doi.org/10.1094/phyto.2002.92.1.51)

Wu, S., Shamimuzzaman, M., Sun, H., Salse, J., Sui, X., Wilder, A., & Fei, Z. (2017). The bottle gourd genome provides insights into Cucurbitaceae evolution and facilitates mapping of a Papaya ring-spot virus resistance locus. *92*(5), 963-975.

doi:<https://doi.org/10.1111/tpj.13722>

Xu, Y., Kang, D., Shi, Z., Shen, H., & Wehner, T. (2004). Inheritance of Resistance to Zucchini Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus in Watermelon. *Journal of Heredity*, *95*(6), 498-502. doi:[10.1093/jhered/esh076](https://doi.org/10.1093/jhered/esh076)

Yoon, J., Choi, I., Jang, S., Park, S., & Choi, S. (2018). First report of zucchini yellow mosaic virus in chayote (*Sechium edule*) in Korea. *102*(6), 1179.

Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D., & Chen, J. (2007). Synergy between Cucumber Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Cucurbitaceae Hosts Tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *39*(6), 431-437.

doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00292.x>

Zheng, L., Rodoni, B. C., Gibbs, M. J., & Gibbs, A. J. (2010). A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *59*(2), 211-220. doi:[https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x)

[3059.2009.02201.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x)