

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL  
AMARILLAMIENTO Y ENANISMO DE LAS CUCURBITÁCEAS (CYSDV) EN  
ÁREAS PRODUCTORAS DEL CENTRO-NORTE Y NORESTE DE MÉXICO**

**Por**

**CÉSAR ENRIQUE GUERRERO GÁMEZ**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
con Especialidad en Producción Agrícola**

**Agosto del 2010**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL  
AMARILLAMIENTO Y ENANISMO DE LAS CUCURBITÁCEAS (CYSDV) EN  
ÁREAS PRODUCTORAS DEL CENTRO-NORTE Y NORESTE DE MÉXICO**

**Aprobación**

**Comité Particular de Tesis**

**Dr. Omar G. Alvarado Gómez**

DIRECTOR DE TESIS

---

**Dra. María Genoveva Álvarez Ojeda**

CO-DIRECTOR

---

**Dr. Alberto Morales Loredo**

CO-DIRECTOR

---

**Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón**

ASESOR

---

**Dr. Jesús Martínez de la Cerda**

ASESOR

---

**Dr. Francisco Zavala García**

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

---

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Hipótesis.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Descripción del virus.....	5
2.2. Distribución e importancia del virus.....	6
2.3. Sintomatología que provoca el virus.....	7
2.4. Métodos de detección.....	9
2.4.1. Bioensayos en plantas indicadoras.....	9
2.4.2. Detección por serología.....	10
2.4.3. Detección por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	12
2.4.4. RT-PCR tiempo real.....	14
2.4.4.1. Tipos de sondas en el RT-PCR tiempo real...	15
2.4.4.2. Detección y cuantificación del CYSDV por medio de RT-PCR tiempo real.....	16
2.5. Transmisión del virus.....	17

Capítulo	Página
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Establecimiento de la técnica RT-PCR.....</b>	<b>20</b>
3.1.1. Selección de iniciadores.....	21
3.1.2. Condiciones de reacción RT-PCR y programas térmicos.....	21
<b>3.2. Incidencia de CYSDV en cucurbitáceas y en su vector.....</b>	<b>23</b>
3.2.1. Colecta y muestreo.....	23
3.2.2. Extracción de RNA total.....	26
3.2.2.1. Método comercial Trizol Reagent <sup>MR</sup> (Invitrogen).....	27
3.2.2.2. Sistema de aislamiento de RNA total SV (Promega).....	28
3.2.3. Incidencia del CYSDV determinada por RT-PCR punto final.....	30
3.2.4. RT-PCR tiempo real.....	30
<b>3.3. Caracterización parcial del CYSDV.....</b>	<b>31</b>
3.3.1. Clonación del fragmento de la CP y transformación....	31
3.3.2. Purificación de DNA plásmido.....	32
3.3.3. Verificación de la presencia del inserto en el plásmido por PCR.....	34
3.3.4. Purificación de los insertos en geles de agarosa.....	35
3.3.5. Secuenciación con dideoxinucleotidos marcados.....	36
3.3.6. Análisis de secuencias y construcción de un dendograma.....	38
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1. Implementación de la técnica RT-PCR.....	39
4.2. Incidencia del virus CYSDV en plantas.....	40
4.3. Detección del virus CYSDV en mosquita blanca.....	44
4.3.1. Detección del CYSDV en mosquita blanca con SYBR Green.....	45
4.4. Caracterización parcial del CYSDV.....	46
4.4.1. Clonación y transformación.....	47
4.4.2. Extracción del DNA plasmídico.....	47
4.4.3. PCR a partir del DNA plasmídico y purificación de los fragmentos de interés a partir de geles de agarosa.....	48
4.4.4. Secuenciación, comparación de secuencias y construcción de un dendograma.....	49

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>
<b>8. APÉNDICE.....</b>	<b>61</b>

## DEDICATORIA

*A mi madre Enriqueta Gámez Martínez por darme el don de vivir y siempre creer en mí, por enseñarme a ser honesto y darme la educación para salir adelante en todo lo que me proponga en la vida.*

*A mi Padre Leobardo Guerrero González por apoyarme económicamente cuando he necesitado*

*También a mis hermanos Claudia Guerrero Gámez, Carlos Alberto Guerrero Gámez y José Eduardo Guerrero Gámez por escucharme y darme la felicidad que siempre he necesitado, a mis sobrinos Sahara López Guerrero y Ángel Gabriel Guerrero Gámez los quiero mucho.*

*A mi hermano Leobardo Guerrero Gámez que Dios lo tenga en su gloria por ser la luz que me guía en mi camino y que siempre me está cuidando y observando en donde quiera que este.*

*De lo dedico a la Dra. Geneviva Alvares Ojeda por creer en mí para la realización de este proyecto de investigación, así como al Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez, al Dr. Alberto Morales Loredó, Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón, Dr. Jesús Martínez de la Cerda por todo su apoyo incondicional.*

*A mis amigos y compañeros de trabajo: Brenda Frasema Maldonado Meza, Luis Gerardo Mendoza Dávila, Rosa Nelly González Ríos, M.C. Martha Silvia Tirado Velarde, Verónica Ancona, Araceli García García, por todos sus consejos y ayuda.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo el proyecto SAGARPA-CONACYT No.2003-034 por financiar el proyecto de investigación y la beca proporcionada durante el posgrado.

Al Laboratorio Central Regional de Monterrey dependiente del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León por facilitar las instalaciones para la realización de dicho trabajo.

También se agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) al proveernos de muestras para la elaboración del proyecto.

Además a la Facultad de Agronomía por aceptarme como alumno de posgrado y el apoyo que siempre me brindó durante el periodo de la Maestría.

A todos mis maestros que creyeron en este proyecto de investigación además de su apoyo incondicional durante todo el periodo.

Mis compañeros y amigos que siempre estuvieron al pendiente de la evolución del proyecto, capacitándome, aconsejándome y brindándome su ayuda en todo el proceso del Posgrado.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1.	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del CYSDV .....	21
2.	Programas térmicos utilizados en las reacciones de PCR con diferentes oligonucleótidos.....	23
3.	Cultivos y localidades de colecta en el ciclo agrícola verano-invierno de 2008.....	25
4.	Cultivos y localidades de colecta en el ciclo agrícola primavera-verano de 2009.....	26
5.	Incidencia del CYSDV en cucurbitáceas en varias localidades durante el ciclo verano-otoño 2008.....	43
6.	Incidencia del CYSDV en cucurbitáceas en varias localidades durante el ciclo primavera-verano 2009.....	43
7.	Tallas moleculares obtenidas con el primer reverso en la secuenciación de las clonas del presente trabajo y la secuencia base melón de Arizona, E.U. ....	50
8.	Alineamientos de bases nucleotídicas de un fragmento de la cubierta proteica del CYSDV de diferentes aislamientos encontrados en el presente trabajo.....	51
1A.	Preparación de soluciones químicas.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.	Sintomatología causada por CYSDV en frutos de melón.....	8
2.	Sintomatología causada por CYSDV en hojas de melón.....	8
3.	RT-PCR con los iniciadores 410U/410L y MA156/MA129.....	39
4.	RT-PCR con los iniciadores CYSDVr/CYSDVf.....	40
5.	RT-PCR con iniciadores específicos al gen HSP70, con muestras de Anáhuac, N. L.....	41
6.	RT-PCR con iniciadores específicos al gen de la p22, con muestras de Matamoros, Coahuila.....	41
7.	RT-PCR con iniciadores específicos al gen HSP70 con muestras de Viesca, Coahuila.....	42
8.	(A) RT-PCR y (B) PCR secuencial con iniciadores específicos al gen de la CP con RNA de mosquita blanca...	44
9.	RT-PCR tiempo-real.....	45
10.	Curva de disociación de PCR tiempo-real con SYBR Green.	46
11.	Colonias de <i>Escherichia coli</i> con el vector plásmido que contiene insertado el fragmento de interés.....	47
12.	Purificación del DNA plasmídico de varias clonas de <i>E. coli</i> .....	48
13.	PCR de las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con los iniciadores CYSDVf/CYSDVr.....	49
14.	Porcentaje de Identidad y Dendograma con las secuencias de ADN de la CP de CYSDV.....	53

## RESUMEN

Una de las enfermedades virales importantes en la familia *Cucurbitaceae* es la ocasionada por el Virus del Amarillamiento y Enanismo de las Cucurbitáceas (CYSDV) debido a su rápida dispersión en los cultivos por el vector mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) y por los daños que ocasiona.

En el presente proyecto de investigación se realizó la estandarización del método molecular de la RT-PCR punto final para la detección del virus CYSDV en muestras obtenidas en varias localidades y diferentes especies de plantas pertenecientes a la familia *Cucurbitaceae* con la utilización de oligonucleótidos específicos al gen que codifica para las proteínas de la cápside (CP), la proteína 22 (p22) y la proteína de choque térmico (HSP70). Los tres juegos de oligonucleótidos fueron efectivos en la amplificación de los controles positivos en las temperaturas de anillamiento probadas.

Se estandarizó la técnica RT-PCR tiempo real con tecnología SYBR Green (Applied Biosystem<sup>MR</sup>) tanto para plantas como para especímenes de mosquita blanca con los oligonucleótidos CYS<sub>cp</sub>R/CYS<sub>cp</sub>F específicos al gen de la cápside los cuales amplifican un fragmento de 205 pb. El protocolo establecido requiere el uso de 22.5 ó 225 ng de DNA y una concentración de oligonucleótidos de 0.125 pmoles/ $\mu$ l.

Durante los años 2008 y 2009, se realizaron muestreos en distintas regiones productoras de cucurbitáceas de los estados de Nuevo León, Coahuila y Durango, en forma dirigida a los ápices de plantas sintomáticas. También se colectaron especímenes de mosquita blanca. En el ciclo otoño-invierno del año 2008 se detectaron 26 muestras positivas de 71 plantas muestreadas (36.6%), en cambio no se detectó ninguna muestra positiva de las 58 plantas muestreadas en el ciclo primavera-verano del 2009. Las muestras positivas fueron de la especie de sandía colectada en Nuevo León y melón de Coahuila, Nuevo León y Durango. También se detectó el virus CYSDV en RNA de especímenes de mosquita blanca.

Productos de amplificación de muestras positivas representativas a los cultivos y localidades muestreadas fueron clonadas en el plásmido pCR TOPO-4, utilizando *E. coli* DH5 $\alpha$ . Después de purificar el ADN plasmídico fueron secuenciados los insertos con un equipo ABIPRISM 3100 de Applied Biosystem<sup>MR</sup> y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las reportadas en GenBank. En todas las muestras secuenciadas, se obtuvo de un 96-98% de similitud con alrededor de 40 secuencias de la CP conocidas en el mundo, y se construyó un dendograma de similitudes.

## SUMMARY

One of the most important viral diseases in the cucurbit family is caused by the cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), due to the rapid dispersion and damage to the cucurbit crops through its vector that is the whitefly (B.T).

For the present research the molecular method of RT-PCR was standardized to detect the CYSDV in samples obtained in several locations and different species of crops from the cucurbit family with the utilization of specific primers for the capsid protein gene (CP), protein 22 (p22) and heat shock protein 70 (HSP70). The three primers pairs were effective for the amplification of the positive controls for the alignment temperature proved in the research.

The real time RT-PCR technique was standardized through the SYBER Green Technology (Applied Biosystem <sup>MR</sup>) for the crops studied as well as the whitefly specimens with the specific primers CYScpR/CYScpF for the capsid gene that amplifies a fragment of 205 pb. The protocol established requires the use of 22.5 or 225 ng of DNA and a primer concentration of 0.125 pmoles/ $\mu$ l.

During 2008 and 2009 years, sampling was realized in different cucurbit producing regions in the states of Nuevo Leon, Coahuila and Durango. Samples were taken directly from symptomatic apex of plants. Also specimens of whitefly were collected. In the autumn-winter cycle of the year 2008, 26 positive samples were detected out of 71 symptomatic plants (36.6%). The positive samples detected were

obtained from melon and watermelons crops collected in localities from Nuevo Leon, Coahuila and Durango. The CYSDV virus was also detected in the RNA of the whiteflies species collected. During spring-summer of 2009 no positive samples were detected in the 42 plants sampled in the cycle.

Amplification products from representative positive samples to the crops and localities sampled were cloned in the PCR-TOPO4 plasmid, using *E. coli* DH5 $\alpha$ . After purifying the plasmid DNA, the inserts were sequence with the ABIPRISM 3100 of Applied Biosystems<sup>MR</sup> equipment and the sequences obtained were compared with the reported ones by the GeneBank. All sequenced samples had a similarity between 96 and 98% with around 40 sequences of the CP known in the world and a dendrogram of similarities was constructed.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las cucurbitáceas son cultivos importantes en México ya que se siembran en muchas áreas agrícolas en distintos estados de la República Mexicana, entre los cuales se encuentran Sonora, Sinaloa, Michoacán, Durango, Coahuila y Nuevo León, además estos cultivos tienen un alto valor nutrimental en la alimentación de la población humana. Entre las enfermedades relacionadas con los problemas de producción en México, se encuentra el amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) la cual ocasiona bajo rendimiento y afecta la calidad del fruto, ocasionando grandes pérdidas en la producción en el campo y una depreciación de su valor económico en el mercado nacional e internacional.

Durante el año 2006 se presentó un problema de amarillamiento en el cultivo de melón, esta clorosis intervenal presente sobre las hojas más desarrolladas y a nivel medio de la planta, fue observado en algunas regiones de Sonora, México. Las variedades de melón (*Cucumis melo* M.) miel de rocío y melón aromático; y sandía (*Citrullus lanatus* Thumb.) fueron sintomáticos en áreas de Caborca, Hermosillo, Sonora, mientras que otras plantas desarrollaron síntomas similares. Algunos cultivares exhibieron pérdidas substanciales en la calidad de un 30 al 80 %. La clorosis intervenal que se ha observado, ha sido de un 60 a un 100 % de la planta en el campo (Brown *et al.*, 2007).

El CYSDV, es un miembro del género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae*, el genoma de este virus está compuesto por una cadena simple de RNA bipartita

encapsulado en una partícula de filamento largo y flexible. El CYSDV es un virus localizado en el floema, fue identificado por primera vez en Arabia Saudita, además fue reportado en ciudades del Este Medio y Mediterráneo, reconociendo al virus como uno de los más importantes a nivel económico (Sinclair y Crosby, 2002).

La variabilidad genética del virus ha sido determinada mediante el análisis de polimorfismos y secuenciación de nucleótidos de los genes de la cubierta proteica del virus. La variación genética y la estructura de la población de cada uno de los aislados del CYSDV también se ha estimado tomando en cuenta la región del gen HSP70, que ha sido reportado con aislados anteriores y depositados en el GenBank (Moreno *et al.*, 2008).

Recientemente, el CYSDV ha sido introducido a Texas, Guatemala, Arizona y California. El primer reporte del CYSDV en México se hizo en cultivares de calabacín (*C. pepo* L.) y melón (Brown *et al.*, 2007). Los campos del desierto de Sonora y lugares vecinos fueron infestados con mosquita blanca de la cual se identificó el biotipo B con base en el análisis de secuencia del gen de la citocromo oxidasa mitocondrial. Los niveles de población de la mosquita blanca fueron variables y el rango fue de 5 a 200 por planta. La mosquita blanca es un vector de una gran cantidad de virus entre los que se encuentra el virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga (LIYV) y el virus del amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV), entre otros, los cuales tienen genomas de RNA y estos pertenecen al mismo género y familia. Estos virus (LIYV, CYSDV) son transmitidos de manera semipersistente, por el rango de hospederos que tienen pueden causar

síntomas que no son distinguibles en las plantas que están infectadas, incluyendo plantas que son de importancia económica como las cucurbitáceas (Rubio *et al.*, 1999).

Las técnicas de Reverso-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés RT-PCR, han sido de utilidad para la amplificación de los genomas virales compuestos por RNA. La RT-PCR y la utilización de oligonucleótidos específicos al CYSDV que amplifican genes de la proteína de la cápside han abierto las puertas para nuevos estudios en otras partes del mundo donde se encuentra el virus. Al utilizar oligonucleótidos específicos el tamaño del fragmento que amplifica en esta región del genoma del virus es de 753 pares de bases (pb), estos productos de amplificación pueden ser clonados en vectores plasmídicos, y secuenciados en ambas direcciones utilizando oligonucleótidos universales (Brown *et al.*, 2007).

## 1.1. OBJETIVOS

Objetivo General:

Detectar y caracterizar el virus del amarillamiento y enanismo de las Cucurbitáceas (CYSDV) en plantas de la familia Cucurbitácea y en su vector mosquita blanca (*B. tabaci* Genn), colectadas en la región del Norte-Centro y Noreste de México, mediante la utilización de las técnicas de RT-PCR punto final, PCR tiempo real y secuenciación de DNA.

Objetivos particulares:

1. Implementación de una técnica de RT-PCR para la detección del CYSDV en plantas de la familia Cucurbitácea, amplificando los genes del virus que codifican para las proteínas 22 (p22), choque térmico (HSP70) y la cápside (CP).
2. Determinación de la incidencia del virus CYSDV en cucurbitáceas y mosquita blanca por RT-PCR punto final y tiempo real en diferentes localidades de la región Norte-Centro y Noreste de México.
3. Caracterización parcial del CYSDV presente en muestras de diferentes localidades de la región Norte-Centro y Noreste de México, mediante el análisis de la secuencia de bases que codifica para la cubierta proteica del virus.

## **1.2. HIPÓTESIS**

El virus CYSDV está presente en los cultivos de cucurbitáceas y en especímenes de mosquita blanca en zonas productoras del Norte-Centro y Noreste de México. Dicho virus puede ser detectado por técnicas basadas en RT-PCR y caracterizado por secuenciación de DNA.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Descripción del Virus

El CYSDV es un virus relativamente nuevo que afecta la producción de varios cultivos de cucurbitáceas como son melón (*Cucumis melo*), pepino (*Cucumis sativus*), sandía (*Citrullus lanatus*) y calabacita (*Cucurbita pepo*). Este virus es un miembro del género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae*. La capa proteínica (CP) tiene una alta similitud con otros virus como son el *Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus* (36%) y el *Lettuce Infectious Yellow Virus* (26%). Los *Crinivirus* tienen partículas filamentosas y largas y son transmitidos naturalmente por la mosca blanca (*B. tabaci*). Además el CYSDV es un virus que está limitado a los tubos cribosos del floema de las plantas y sus partículas tienen una longitud de 825 a 900 nm, su genoma es bipartito y consiste de dos cadenas sencillas de segmentos de RNA estimadas en 9 kb (RNA1) y 8 kb (RNA2) encapsulados de manera separada, la cual consiste en una región que codifica para la proteína de choque térmico (HSP70) única de los *Closterovirus*. La información de la secuencia estima 4 regiones de genes en el CYSDV, donde la primera región corresponde a la HSP70 cuya longitud es de 1659 nucleótidos, la segunda corresponde a la p58 con un tamaño de bases de 1524 nucleótidos, el tercero es la p9 de 240 nucleótidos de longitud y por último la cuarta región que codifica la CP del virus con una longitud de 756 nucleótidos (Sinclair y Crosby, 2002; Coutts y Livieratos, 2003).

El genoma del virus que consiste de RNA de doble cadena, la terminación 5' esta constituida por la proteína HSP70 la cual está codificada para la elaboración de la proteína de choque térmico y la región final 3' está constituida por la proteína de la cápside (CP), cada una de las regiones son conservadas del virus, sin embargo, el RNA 2 del que está constituido el virus contiene otra región la cual es un complemento de la formación de la proteína de la cápside la cual es complementaria con polaridad positiva al RNA 1 (Aguilar *et al.*, 2003).

## **2.2. Distribución e Importancia del Virus**

El CYSDV infecta pepino, calabacita, sandía, melón y varias malezas como hospedantes alternos. Se conocen dos variantes o aislados de este virus, uno de los cuales proviene de Europa y otro de América (Rubio *et al.*, 2001).

La primera detección del CYSDV se hizo en 1982 en Arabia, donde permanece en proporciones epidémicas, posteriormente el virus se dispersó en la región del Mediterráneo incluyendo Egipto, Israel, Jordania, España, Turquía, Líbano, Portugal y Marruecos, en donde causó pérdidas económicas en los cultivos de cucurbitáceas. El CYSDV se ha introducido también en Norteamérica, específicamente en el Valle de Rio Grande y Sureste de Texas, además del noroeste de México (Sinclair y Crosby, 2002). Recientemente, el CYSDV ha sido reportado en Guatemala, Arizona y California.

### **2.3. Sintomatología que Provoca el Virus**

Los síntomas más frecuentes asociados con CYSDV son la clorosis que genera en las hojas de las plantas de melón debido a la destrucción de la clorofila, esto generalmente viene acompañado con una reducción en el tamaño de la planta, además de deformaciones en los frutos (Figuras 1 y 2).

La presencia de los síntomas depende, de la variedad, del carácter primario o secundario de la infección y de las condiciones ambientales. Los síntomas de infección primaria después de la contaminación natural, son generalmente clorosis y nervaduras de color verde. Los síntomas de infección secundaria consisten en enanismos más severos que aparecen en función de las condiciones climáticas.

Al ser inoculado el virus la clorosis intervenal aparece entre los 14 y 22 días después de ser introducido el virus en la planta, siendo más visibles los síntomas después de los 30 días. Las hojas pueden desarrollar prominentes sectores de amarillamientos, sin embargo algunos síntomas incluye un completo amarillamiento de la lámina de la hoja. La calidad de la fruta es severamente afectada, tanto en tamaño, rendimiento y contenido de azúcar, propiciando que su valor comercial sea inaceptable en el mercado, resultando en pérdidas económicas. Los síntomas del CYSDV pueden ser confundidos con desordenes fisiológicos, deficiencias nutricionales o por la aplicación de pesticidas (Sinclair y Crosby, 2002).



**Figura 1. Sintomatología causada por CYSDV en frutos de melón.** Deformaciones en los frutos de melón cantaloupe provocada por el CYSDV, localizadas en parcelas del municipio de Matamoros, Coahuila.



**Figura 2. Sintomatología causada por CYSDV en hojas de melón.** Clorosis en hojas de melón provocada por el virus del CYSDV, localizadas en parcelas del municipio de Matamoros, Coahuila.

## **2.4. Métodos de Detección**

Entre los métodos de detección del CYSDV se encuentran los ensayos con la utilización de plantas indicadoras, los métodos serológicos con la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales (ELISA), además de la utilización de ensayos utilizando la biología molecular como son la reverso-transcripción reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés RT-PCR.

### **2.4.1. Bioensayos en plantas indicadoras**

La detección de virus con plantas indicadoras ha sido usada extensivamente en la papa y en otros cultivos. En estos casos las muestras sin diluir o diluidas convenientemente en una solución amortiguadora, son inoculadas mecánicamente en las hojas de la planta misma o separadas de la planta. La reacción de la planta con virus consiste en lesiones locales necróticas, teniendo los resultados entre 4 y 8 días después de la inoculación. Otros virus pueden ser detectados por los síntomas locales o sistémicos que inducen en las plantas inoculadas.

Para detectar virus transmitidos por inoculación de savia, prácticamente cualquier parte de la planta de papa puede ser utilizada como fuente de inóculo, sin embargo, comúnmente se usan hojas y brotes de tubérculos. La savia de estas partes de la planta ya mencionadas puede ser extraída macerando el tejido en agua, y luego inoculando las hojas de las plantas indicadoras con este extracto o con diluciones del mismo.

Varios factores afectan la producción de lesiones locales, las cuales pueden ser la susceptibilidad entre plantas debido a la variabilidad genética y las

condiciones en las que se cultivan las plantas indicadoras tales como la cantidad de luz y la temperatura para obtener la máxima producción de lesiones locales (De Bokx, 1972).

#### **2.4.2. Detección por serología**

La inmunología ha jugado un papel muy importante en la medicina y en la investigación biológica en general. Los principios inmunológicos han tenido una importancia considerable en el desarrollo de la Virología de las plantas. La inmunodiagnosís tiene dos elementos fundamentales: el antígeno, el cual es un agente químico o biológico capaz de estimular una respuesta inmunológica específica cuando es introducida en un animal, y el anticuerpo es un producto que reacciona con los productos de esta respuesta (Aloisi, 1979).

Los virus, debido a su cubierta proteica, son generalmente buenos antígenos, aunque su inmunogenicidad varía mucho, debido a la complejidad de sus proteínas.

Las principales pruebas serológicas son: la precipitación en líquidos (precipitación y micro precipitación), en donde, el anticuerpo se une primero a una o más moléculas del antígeno; la reacción ocurre inmediatamente cuando los dos reactantes se mezclan. Otra técnica es la floculación de látex, en donde los anticuerpos o el antígeno pueden ser absorbidos a partículas de mayor tamaño

tales como el látex, bentonita o glóbulos rojos de la sangre, de tal manera, cuando se mezclan, la combinación antígeno-anticuerpo se magnifica, facilitando su observación (Fribourg y Nakashima, 1984).

Otra técnica es la difusión en gel, en la cual, los anticuerpos no tienen dificultad para difundirse en geles preformados. La difusión de los antígenos, sin embargo, dependerá de su tamaño y forma.

Las pruebas de difusión simple y doble han sido desarrolladas para la detección del virus. Esta técnica es lo suficientemente sensible para detectar virus que se presentan en una concentración media o alta en los extractos de las plantas (Shepard y Secor, 1972).

Entre la difusión de geles está la difusión simple y doble, en la difusión simple uno de los reactantes, usualmente un medio líquido, se difunde en el gel que contiene el otro reactante. Esta prueba puede ser realizada en tubos o cajas petri (Shepard y Secor, 1972).

La difusión doble, es donde, ambos reactantes están separados por un gel que constituye el área de reacción, se colocan en hoyos hechos en el gel difundiendo y formando una zona de precipitación donde ambos se encuentren en proporciones óptimas. Esta técnica es valiosa para identificar virus y determinar las relaciones serológicas entre ellos (Ávila *et al.*, 1984).

Una más de las técnicas serológicas son las inmunoenzimáticas, la cual es hoy en día una de las preferidas para la detección de virus, reemplazando así a las otras técnicas. Avrameas en 1969 citado por Voller *et al.* (1974) desarrolló el uso de anticuerpos marcados con enzimas para uso en las técnicas serológicas convencionales, sin embargo, la técnica denominada ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) fue desarrollada por Engvall y Perlmann en 1971 (Voller *et al.*, 1974). ELISA fue empleada primero para detectar anticuerpo contra enfermedades infecciosas en humanos y animales. Su uso para la detección de virus de plantas fue descrito por Voller *et al.* (1974) y Clark y Adams (1977).

La técnica ELISA se basa en la producción de un conjugado anticuerpo-enzima en el cual ambas moléculas tienen sus propiedades individuales. El anticuerpo se adhiere al antígeno mientras que la enzima detecta y amplifica tal reacción. La técnica ELISA puede ser usada para discriminar entre materiales sanos y enfermos (cualitativamente) o para determinar la concentración de virus en los materiales bajo prueba (cuantitativamente). Existe varios tipos de ELISA de los cuales el más utilizado es el de sándwich de doble anticuerpo (DAS), aunque últimamente la técnica indirecta que usa membrana de nitrocelulosa (NCM) está siendo ampliamente difundida (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1981).

#### **2.4.3. Detección por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

La técnica de PCR como método de diagnóstico basado en la detección del ácido nucleico viral, ha sido desarrollada en los últimos años. Este método está basado

en la síntesis específica de secuencias de DNA, gracias a la enzima polimerasa, las cuales están localizadas entre dos iniciadores de secuencia conocida y complementaria a una región del ácido nucleico de interés (Sambrook *et al.*, 2001).

Además los virus pueden ser identificados por sintomatología que producen en las plantas por su forma, su morfología, constitución y propiedades; sin embargo, con frecuencia algunas de estas características no se pueden determinar, otras no son tan específicas, por lo cual la tarea de identificación es larga y queda cierta incertidumbre. Afortunadamente, gracias a la biotecnología se cuentan con técnicas como la hibridación molecular y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que son extremadamente sensibles y específicas para la detección e identificación de fitopatógenos entre los cuales están los virus siendo un método *in vitro* que permite la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA o RNA (Sambrook y Russell, 2001).

Los iniciadores son sintetizados con una estructura determinada de tal manera que se orienten en el DNA a ser amplificado y que la síntesis por la polimerasa proceda a través de la región entre los iniciadores. En la aplicación de este método el DNA se calienta a alrededor de 95<sup>0</sup>C para separar las hebras en presencia de los iniciadores. Cuando la temperatura se reduce a una temperatura apropiada (generalmente entre 50 y 60<sup>0</sup>C), los iniciadores hibridizan con el DNA en la región de complementariedad. Luego, la polimerasa extiende los iniciadores

para copiar el DNA y ciclos sucesivos que comprenden la desnaturalización de DNA molde, la hibridación de los iniciadores y su extensión por la polimerasa. Esto da lugar a la acumulación exponencial de una región específica cuyos terminales están definidos por los terminales 5' de los iniciadores (Sambrook y Russell, 2001).

El uso de una enzima termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq*) en vez de una enzima termolábil (fragmento Klenow de la polimerasa I de DNA) ha simplificado mucho el proceso (Sambrook y Russell, 2001).

La técnica PCR es muy sensible, nos permite amplificar más de un millón de veces un DNA obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1985 por Kary B. Mullis.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de DNA la cual está actualmente catalizada por la enzima llamada polimerasa (Sambrook y Russell, 2001).

#### **2.4.4. RT-PCR tiempo real**

El PCR en tiempo real es la habilidad de monitorear el progreso de cómo ocurre la PCR. Los datos colectados a partir de la PCR se presentan hasta el término del proceso. En la PCR en tiempo real, las reacciones son caracterizadas por el

tiempo durante los ciclos cuando la amplificación es primeramente detectada por la cantidad del amplicón acumulado después de varios ciclos, su optimización genera una especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad importante, realizando pruebas de concentración del iniciador, condiciones de los ciclos térmicos y composición de los buffers (Edwards *et al.*, 2004).

Acerca de la RT-PCR en dos pasos, está formada por dos reacciones separadas, ya que detecta múltiples transcritos desde un DNA de cadena sencilla (cDNA). Una característica del ensayo es la medición de la cantidad del producto de PCR acumulado en unidades de fluorescencia al final del proceso de la PCR. El dato obtenido es la intensidad normal del marcador o  $R_n$  (Edwards *et al.*, 2004).

Actualmente se han desarrollado dos tipos de pruebas, entre otras que pueden ser usadas para detectar productos de PCR utilizando instrumentos de PCR tiempo real. De las más importantes o destacadas para la detección y cuantificación del CYSDV son:

- a) Pruebas basadas en sondas TaqMan
- b) SYBR Green

**2.4.4.1. Tipos de sondas en el RT-PCR tiempo real.** Las pruebas basadas en sondas TaqMan, son pruebas en donde se utiliza un fluoróforo para la detección de productos de PCR específicos acumulados durante los ciclos, en donde el marcador reportero (el que emite la fluorescencia) está en la posición 5' y el quencher (apagador) se encuentra en la posición 3'. Esta prueba puede ser

utilizada para cuantificación de DNA y RNA y discriminación alélica (Edwards *et al.*, 2004).

La utilización del SYBER Green es una prueba en donde este tipo de marcador se intercala en la doble cadena de DNA y nos permite detectar los productos de PCR acumulados durante los ciclos de la PCR. Una importante diferencia de esta prueba con las sondas TaqMan son los productos inespecíficos que se producen en la reacción, por lo tanto es necesario una buena optimización de la técnica para obtener buenos resultados. El SYBR Green solamente puede ser utilizado para ensayos de cuantificación y detección de RNA y DNA (Edwards *et al.*, 2004).

La utilización del SYBR Green para detectar productos de PCR es la unión de pequeñas moléculas (intercaladores) que se unen a la doble cadena de DNA los cuales emiten una fluorescencia, así al aumentar la cantidad de productos de PCR durante el proceso de replicación, progresivamente estas moléculas seguirán uniéndose a la doble cadena aumentando así la intensidad de la fluorescencia que es producida durante la reacción siendo esta directamente proporcional (Edwards *et al.*, 2004).

**2.4.4.2. Detección y cuantificación del CYSDV por medio de RT-PCR tiempo-real.** La cuantificación del CYSDV mediante RT-PCR tiempo-real es el método mas sensitivo y tiene un mejor rango de detección lineal comparado con los métodos serológicos e hibridación de ácidos nucleicos. Las primeras pruebas para

la detección y cuantificación del virus se realizaron mediante el uso del SYBR Green utilizando una cantidad de cDNA de 100µg con un límite de número de copias de 110 copias del CYSDV (Abou-Jawdah *et al.*, 2008).

Así también la RT-PCR en tiempo-real a sufrido varias modificaciones ofreciendo una mayor sensibilidad de la técnica comparándolos inclusive con el PCR convencional eliminando además el uso de la electroforesis en geles de agarosa reduciendo considerablemente la contaminación post-PCR, obteniendo grandes ventajas con propósitos ideales de diagnóstico, con el uso de otros sistemas de detección y cuantificación como por el ejemplo la utilización de las sondas TaqMan como un método que nos puede proveer de la información de las interacciones virus-vector (Gil-Salas *et al.*, 2007).

## **2.5. Transmisión del Virus**

La mosquita blanca es transmisora de 2 familias de virus: *Geminiviridae* y *Closteroviridae*. Estas dos familias están constituidas por un gran número de géneros, los cuales son la causa de muchas enfermedades en las plantas cultivadas. Entre los géneros más importantes de la familia *Closteroviridae* en México se encuentra el *Crinivirus*, en la década de los 90's en Europa se descubrió un nuevo virus, el cual causó grandes problemas en el cultivo de melón, este virus es el CYSDV, y es transmitido por la mosquita blanca que es un insecto que pertenece al orden Homoptera de la familia *Aleroydae* (Celix *et al.*, 1996).

El vector del virus, tiene una distribución amplia, y se extiende desde Europa, Asia y América. La mosquita blanca a logrado a través del tiempo adaptarse a distintos climas que van desde el clima húmedo, cálido húmedo y semiárido. Debido a la capacidad que tiene el insecto a sobrevivir en distintos climas presenta distintos biotipos (especies adaptadas).

Dependiendo del tipo de clima la mosquita blanca se ha adaptado a diferentes biotipos al cual pertenece, siendo el biotipo A de climas cálidos húmedo y el biotipo B que pertenece al clima semiárido. En los últimos años del siglo XXI se ha descubierto otro biotipo de la mosquita blanca, al que han denominado biotipo Q perteneciente a las regiones de Arabia.

El CYSDV es transmitido de manera semipersistente, no circulativa por la mosquita blanca. Las partículas del virus son transmitidas de una manera tan eficiente en varias partes del mundo por el biotipo B de *Bemisia tabaci*, además del biotipo Q en España. Otro biotipo que se conoce de la mosquita blanca es el "A" pero la transmisión por medio de éste es ineficiente. Cabe mencionar que el nombre común de la mosquita blanca abarca a dos especies de la cual una de ellas es *Trialeurodes vaporariorum* el cual trasmite otro tipo de virus como son el BPYV entre otros. El CYSDV puede permanecer en el estilete del vector hasta por 9 días y teniendo un ciclo de vida de 72 horas (Eid *et al.*, 2006).

La mosquita blanca es una plaga que causa serios deterioros en muchos cultivos agrícolas. Se conoce actualmente que este insecto actúa como vector de

más de 100 especies de virus de plantas. Esta especie de plaga comprende varios biotipos y ha sido distinguido por medio de pruebas bioquímicas y diagnóstico molecular. Los dos biotipos más estudiados son los biotipos B y Q en el sureste y medio este de Europa. La dispersión geográfica en los campos de los dos biotipos tiene una gran importancia ya que estos difieren mucho en el rango de hospederos y en su capacidad de dispersar las enfermedades virales, además de la susceptibilidad a varios insecticidas. La taxonomía convencional e identificación de *B. tabaci* está basado en los criterios morfológicos que no ayudan a distinguir entre ambos biotipos; es así que los marcadores moleculares de DNA pueden ser usados para definir a cada uno de los biotipos del insecto (Khasdan *et al.*, 2005).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en ocho localidades en tres estados de la República Mexicana: Nuevo León, Coahuila y Durango. Se colectaron 113 muestras de diferentes especies vegetales de la familia Cucurbitácea, las cuales fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio Central Regional de Monterrey, A.C., que depende de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, durante el periodo de enero del 2008 a diciembre del 2009.

El material vegetal utilizado fueron hojas de cada una de las plantas muestreadas en distintas fechas y etapas fenológicas del cultivo. Las especies colectadas fueron de melón (*Cucumis melo* L.), sandía (*Citrullus lanatus* L.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.), además se colectaron especímenes de mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn.).

#### 3.1. Establecimiento de la Técnica RT-PCR

Se utilizaron testigos positivos proporcionados por el laboratorio de diagnóstico fitosanitario Biociencia, los cuales consistieron en RNA total positivo a CYSDV. La reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con reactivos de las marcas Promega y Roche, y los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial Alpha DNA. Para la realización de los gradientes de temperatura se utilizó un juego de Reverso Transcripción de la marca Invitrogen<sup>MR</sup>.

### 3.1.1. Selección de iniciadores.

Para la amplificación del genoma del CYSDV se utilizaron oligonucleótidos específicos que son compatibles con la región de la proteína 22 (p22), proteína de la cápside (CP) y la proteína de choque térmico 70 (HSP70) cuyas características se observan en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del CYSDV.

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Blanco que amplifica	Talla esperada del fragmento amplificado (pb)	Referencia
410 U 410 L	TTG GGC ATG TGA CAT AGA GAC GGT AAG TAT	HSP70	456	Rubio <i>et al.</i> (1999)
MA156 MA129	GAA GAA TTC CAG GCA AGG TCA CAT CAT CAA TCC AAA AG	p22	567	Rubio <i>et al.</i> (1999)
CYSDVf CYSDVr	ATG GCG AGT TCG AGT GAG AAT AA ATT ACC ACA GCC ACC TGG TGC TA	CP	756	Marco y Aranda (2005)
CysCPr CysCPf	TTC ATC AAC AGA TTG GCT GC TTT GGA AAA GAA CCT GAC GAG	CP	397	Kuo <i>et al.</i> (2007); Polston <i>et al.</i> (2008)

### 3.1.2. Condiciones de reacción RT-PCR y programas térmicos.

Se realizó una Reverso Transcripción del RNA total obtenido de la extracción del control positivo lo cual consistió en copiar el RNA a DNA complementario mediante la utilización de una enzima con actividad reverso transcriptasa obteniendo así una cadena simple de DNA para posteriormente realizar la PCR.

Se montó un protocolo de RT-PCR en la modalidad de un solo paso, en donde primeramente se convirtió el RNA de virus en cDNA; para esto se agregó el oligonucleótido complementario, desoxinucleotidos trifosfatados (dNTP's), RNA total (virus y planta), la mezcla se incubó a 65<sup>0</sup>C durante 5 min y se colocó 15 min en hielo, después se le agregó buffer 5X, DTT 0.1M y la enzima M-MLV reverso transcriptasa, por último se incubó a 25<sup>0</sup>C por 10 min, 37<sup>0</sup>C durante 50 min y se inactivó a 70<sup>0</sup>C por 15 min. El cDNA se almacenó a -20<sup>0</sup>C hasta su uso.

Se realizó un gradiente de temperaturas de acuerdo con la temperatura media de los oligonucleótidos en el anillamiento (unión) con el genoma del virus, el gradiente para el juego de oligonucleótidos 410L y 410U fue de 4 temperaturas distintas como son: 40<sup>0</sup>C, 42<sup>0</sup>C, 44<sup>0</sup>C y 46<sup>0</sup>C; para MA156/MA129 las temperaturas fueron: 52<sup>0</sup>C, 54<sup>0</sup>C, 56<sup>0</sup>C y 58<sup>0</sup>C, para CYS DVf/CYS DVr las temperaturas del gradiente fueron: 60<sup>0</sup>C, 62<sup>0</sup>C, 66<sup>0</sup>C, 70<sup>0</sup>C. Para el CysCPr/CysCPf el gradiente de temperatura corresponde como sigue: 56<sup>0</sup>C, 57<sup>0</sup>C, 58<sup>0</sup>C y 60<sup>0</sup>C. El producto de RT-PCR se visualizó en geles de agarosa o poliacrilamida, de acuerdo con el tamaño de los productos obtenidos en la amplificación.

Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador y al término del programa se revisó la presencia del fragmento esperado por separación del producto obtenido en un gel de agarosa al 1%, se tiñó en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml), en buffer TBE 1X (cuadro 1 del apéndice) para la preparación

del gel y para su corrimiento. Las muestras se cargaron en el gel mezclándolas previamente con azul de bromofenol (cuadro 1 del apéndice), en una proporción de 1 µl del colorante con 5 µl del producto de PCR, y se colocaron en los pozos del gel. Cuando el azul de bromofenol se encontraba a tres cuartas partes del gel, se apagó la fuente de poder y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografió.

Los programas térmicos utilizados con cada juego de oligonucleótidos se describen en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Programas térmicos utilizados en las reacciones de PCR con diferentes oligonucleótidos.

Pasos	410U/410L	MA156/MA129	CYSDVf/r	CysCPf/r	No. de ciclos
Paso 1	92 <sup>0</sup> C 5 min	92 <sup>0</sup> C 5 min	92 <sup>0</sup> C 4 min	92 <sup>0</sup> C 2 min	1
Paso 2	92 <sup>0</sup> C 30 seg temperatura variable 72 <sup>0</sup> C 30 min	92 <sup>0</sup> C 30 seg temperatura variable 72 <sup>0</sup> C 30 seg	92 <sup>0</sup> C 30 seg temperatura variable 72 <sup>0</sup> C 1 min	92 <sup>0</sup> C 45 seg temperatura variable 72 <sup>0</sup> C 45 seg	35
Paso 3	72 <sup>0</sup> C 10 min	72 <sup>0</sup> C 10 min	72 <sup>0</sup> C 5 min	72 <sup>0</sup> C 5 min	1

### 3.2. Incidencia de CYDSV en Cucurbitáceas y en su Vector

#### 3.2.1. Colecta y muestreo

Para llevar a cabo la colecta se seleccionaron distintos estados de la República Mexicana que se dedican a la producción de cucurbitáceas localizados en la zona

centro-norte y noreste, de estos estados se seleccionaron diferentes municipios, y dentro de los municipios las localidades o predios en donde se encontraban dichos cultivos. Para la colecta de las muestras se tomaron distintos criterios como son la presencia de síntomas en la planta así como la presencia de mosquita blanca. Al seleccionar la muestra se utilizaron guantes de látex y se desinfectaban las tijeras y los guantes con etanol al 70% entre planta y planta. Cada muestra se colocó dentro de una bolsa de papel identificándola con un número, el predio al que pertenece y la fecha; cada una de estas fueron puestas en una hielera con refrigerante para retardar el proceso de descomposición durante el trayecto al laboratorio para posteriormente ser analizadas. El número de muestras por predio fue variable.

Durante el ciclo agrícola verano-invierno del año 2008, se realizó una colecta en los municipios de Cadereyta Jiménez, Salinas Victoria y Anáhuac, Nuevo León; siendo los principales cultivos: calabacita, melón y sandía; y también se muestrearon las principales zonas productoras de melón en los municipios de Matamoros y Viesca en Coahuila; y en el municipio de Mapimi, Durango (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Cultivos y localidades de colecta en el ciclo agrícola verano-invierno de 2008.

<b>Estado</b>	<b>Municipio</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Fecha de colecta</b>
Nuevo León	Cadereyta Jiménez	calabacita	1 de septiembre de 2008
	Salinas Victoria	melón Cantaloupe	26 de septiembre d 2008
	Anáhuac	melón Cantaloupe	3 de octubre de 2008
		sandía	3 de octubre de 2008
Coahuila	Matamoros	melón Cantaloupe	10 de octubre de 2008
	Viesca	melón Cantaloupe	10 de octubre de 2008
Durango	Mapimi	melón Gota de Miel	6 de diciembre de 2008

En cada uno de los municipios se tomaron muestras de mosquita blanca y fueron conservadas en alcohol al 70 %. Las muestras se tomaron en distintas etapas de desarrollo de la planta (plántula, crecimiento, floración y madurez fisiológica), el muestreo fue dirigido a plantas que presentaron los síntomas característicos de la enfermedad, tales como: malformaciones, amarillamientos, enanismos, deformaciones en frutos, etc., la colecta del vector (mosquita blanca) se realizó utilizando una micropipeta con malla y depositados en los recipientes que contenían alcohol.

Para el ciclo agrícola primavera-verano de 2009 se realizó un muestreo de melón y pepino en el municipio de Cadereyta Jiménez, Nuevo León. En este mismo año se visitaron dos localidades del estado de Coahuila, en los municipios de Matamoros y Benito Juárez, y una colecta en el municipio de Marín, Nuevo

León. También se colectaron especímenes de mosca blanca en cada una de las localidades de los distintos municipios visitados (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Cultivos y localidades de colecta en el ciclo agrícola primavera-verano de 2009.

Estado	Municipio	Cultivo	Fecha de colecta
Nuevo León	Cadereyta Jiménez	calabacita	21 de marzo de 2009
		melón Cantaloupe	21 de marzo de 2009
			6 de abril de 2009
		13 de mayo de 2009	
	Pepino	6 de abril de 2009	
		13 de mayo de 2009	
Marín	melón Cantaloupe	8 de junio de 2009	
	Sandía	11 de junio de 2009	
Coahuila	Matamoros	melón Cantaloupe	29 de abril de 2009
	Benito Juárez		

Todas las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de acuerdo con los métodos descritos a continuación.

### 3.2.2. Extracción de RNA total

Para llevar a cabo este paso se utilizaron dos diferentes kits de extracción, los cuales pertenecen a las casas comerciales de Invitrogen utilizado para vegetales y Promega para extracción de RNA de insectos.

El tipo de tejido que se utilizó en la extracción de RNA fueron los ápices de las plantas muestreadas los cuales contenían parte del tallo, hojas y sarcillos.

**3.2.2.1. Método comercial Trizol Reagent (Invitrogen<sup>MR</sup>).** Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones, el cual se resume a continuación:

Se pesaron de 100-200 mg de muestra congelada y se adicionó 1 ml del reactivo Trizol Reagent<sup>MR</sup> en un mortero y se trituró con el pistilo; ya homogenizada la muestra se transfirió a un tubo de centrifuga de 1.5 ml dejándola incubando 5 min a temperatura ambiente; después se centrifugó a 12,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.

Posteriormente se le agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló en vortex 15 seg y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente; luego se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 15 min y se transfirió la fase acuosa a otro tubo nuevo.

Se precipitaron los ácidos nucleicos con 500 µl de isopropanol frío y se incubó por 10 min a -20<sup>0</sup>C, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se decantó y se agregó 1 ml de etanol frío al 70% para lavar el ácido nucleico mezclándolo por vortex y centrifugándolo posteriormente a 7,500 rpm durante 5 min. Se eliminó la fase acuosa.

Se dejó secar la pastilla por inversión y se resuspendió el ácido nucleico en 20-30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) incubando después a 55-60°C durante 10 min. Cuando el RNA no fue utilizado inmediatamente, se almacenó a -70°C hasta su uso.

**3.2.2.2. Sistema de aislamiento de RNA total SV (Promega<sup>MR</sup>).** Se trituró el insecto en un tubo de 1.5 ml utilizando nitrógeno líquido. Se añadieron 175 µl de buffer de lisis (RLA + BME) y se mezcló por inversión.

Se agregaron 350 µl de buffer de dilución (RDA) y se mezcló por inversión de 3 a 4 veces, centrifugando posteriormente durante 10 min a 12,000 x g, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

Se adicionaron 200 µl de etanol al 95%, mezclando por pipeteo para posteriormente tomar la mezcla y agregarla al tubo con la membrana ensamblada con el tubo colector. Se centrifugó durante 1 min a 12,000 x g.

Posteriormente se agregaron 600 µl de solución de lavado (RWA + etanol) y se centrifugó durante 1 min a 12,000 x g y se descartó el líquido que atravesó la membrana.

Se preparó una mezcla de incubación de DNasa, la cual lleva lo siguiente: 40 µl de buffer nuclear, 5 µl de MnCl<sub>2</sub> al 0.09 M y 5 µl de DNasa I se mezcló suave con una micropipeta y se agregó la mezcla (50 µl) al tubo con la membrana

ensamblada con el tubo colector y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 200  $\mu$ l de solución (DSA adicionado de etanol) para detener la reacción, y se centrifugó durante 1 min a 12,000 x g.

Después se adicionaron 600  $\mu$ l de solución de lavado (RWA) y se centrifugó 1 min descartando el líquido del tubo colector.

Luego se agregaron otros 250  $\mu$ l de solución de lavado (RWA) y se centrifugó durante 2 min a 12,000 x g, se descartó el tubo colector y se colocó la columna en el tubo de elusión.

Por último se adicionaron 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas a la membrana para eluir el RNA; se centrifugó durante 1 min a 12,000 x g y se almacenó el RNA a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

De las extracciones de cada uno de los tejidos utilizados (ápices e insectos), se cargaron 10  $\mu$ l en un gel de agarosa al 2%, se mezcló con un 1  $\mu$ l de azul de bromofenol y se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el gel en un transiluminador con luz ultravioleta.

### **3.2.3. Incidencia del CYSDV determinada por RT-PCR punto final**

Para cuantificar la incidencia del virus CYSDV en las muestras recolectadas, se escogieron las condiciones que dieron los mejores resultados en la primera etapa del trabajo. La extracción de RNA en plantas se hizo por el método del Trizol, y en el caso de insectos se usó un kit de extracción de Promega. Las reacciones de RT-PCR se hicieron con los oligonucleótidos 410U/410L que amplifican los genes HSP70 utilizando el programa 92°C-46°C-72°C durante 30-30-30 segundos para cada una de las temperaturas anteriores, 35 ciclos; y MA129/MA156 que amplifican la proteína 22 con el programa 92°C-58°C-72°C durante 30-30-30 segundos durante 35 ciclos y una extensión final a 72°C 10 minutos.

### **3.2.4. RT-PCR tiempo-real**

Para la detección del CYSDV mediante RT-PCR tiempo-real en mosquita blanca se utilizaron iniciadores internos específicos al gen de la cápside los cuales amplifican un fragmento de 205 pb, y la tecnología utilizada para este tipo de ensayos utiliza SYBR Green (Applied Biosystem<sup>MR</sup>) el protocolo se siguió de acuerdo con las especificaciones del fabricante realizando solamente unas adecuaciones a la temperatura media de los iniciadores.

Para la RT-PCR en tiempo-real se utilizaron los oligonucleótidos CYScpR/CYScpF, para los cuales el programa térmico que se utilizó fue 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C 1 min, 63°C 1 min y se adicionó una curva de disociación con las temperaturas siguientes: 95°C 15 seg, 60°C 30 seg y 95°C 15 seg, la cantidad final de cDNA utilizada fue de 247 ng y 22.5 ng, también se

utilizaron distintas concentraciones del oligonucleótido como son: 0.5, 0.25 y 0.125 pmoles respectivamente.

### **3.3. Caracterización parcial del CYSDV**

Para la secuenciación de los productos obtenidos por RT-PCR, se utilizaron únicamente los fragmentos que codifican para el gen de la proteína de la cápside del CYSDV con los oligonucleótidos CYSDVf/CYSDVr. Se clonaron los fragmentos en un vector y se introdujo en *E. coli*. Se purificó el DNA plasmídico con un kit de Miniprep de la marca Invitrogen<sup>MR</sup>. Se determinó la secuencia de bases del fragmento clonado mediante un kit de secuenciación 3.1 Big Dye de Applied Biosystem<sup>MR</sup>. Se secuenciaron 5 clonas, dos de ellas procedentes de muestras de melón de Anahuac, N.L., una de melón de Matamoros Coahuila; otra de melón de Viezca Coahuila y una más de melón de Mapimi Durango. Esta selección de muestras se hizo para tener representatividad en las localidades en donde se encontró al virus.

#### **3.3.1. Clonación del fragmento de la CP y transformación**

Para la clonación del fragmento amplificado de la CP se utilizó el kit de clonación TOPO 4 de la compañía Invitrogen<sup>MR</sup>.

Se realizó una RT-PCR para amplificar el fragmento deseado y se visualizaron los productos en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB 1 X (Cuadro 1 A). Con el producto de la RT-PCR se llevó a cabo la ligación del

fragmento en el vector plásmido pCR TOPO-4 de la siguiente manera: En un tubo de 0.2 ml se adicionaron 4 µl del producto de RT-PCR, 1 µl de solución salina y 1 µl de vector TOPO 4. Se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente y se colocó en hielo.

Después de la ligación se llevó a cabo la transformación en células de *E. coli* DH5α calcio competentes, para lo cual se realizó lo siguiente:

1. Se utilizaron 2 µl del producto de ligación.
2. Se incubó en hielo 15 min.
3. Se aplicó un shock térmico a 42 °C 1 min.
4. Se colocó en hielo 2 min.
5. Se adicionaron 800 µl de medio SOC y se incubó 1 h 30 min a 37 °C en agitación.
6. Posteriormente, este cultivo fue resembrado en superficie en agar LB, adicionado de 50 µg/ml de ampicilina ó kanamicina y se dejó incubando a 37 °C durante 18 horas.
7. Después de la incubación se observaron las colonias.

### **3.3.2. Purificación de DNA plásmido**

Para la purificación del DNA plásmido se utilizó un kit de Pure Link Quick Plasmid Miniprep de la marca Invitrogen<sup>MR</sup> y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Después de observar crecimiento de colonias de la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$ , se subcultivó en caldo LB adicionado de kanamicina a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se dejó incubando 16-18 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Después de este tiempo, los 3 ml del cultivo se separaron alícuotas de 250  $\mu\text{l}$  en tubos criogénicos con 75  $\mu\text{l}$  de glicerol al 40 % quedando una concentración final de 9.2 % y fueron almacenados a -70  $^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El resto del cultivo se colocó en tubos de 1.5 ml y se centrifugó a una velocidad de 12 000 x g durante 1 min formando una pastilla de color blanco, esto se realizó dos veces.

A la pastilla se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de buffer de resuspensión mezclando con pipeta, y agregando 250  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis mezclando por inversión 5 veces e incubando 5 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 350  $\mu\text{l}$  de buffer de precipitación mezclando por inversión y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a una columna ensamblada al tubo colector de 2 ml y se volvió a centrifugar a 12 000 x g durante 1 min descartando lo que se encuentre en el tubo colector.

Luego se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lavado a la columna y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 x g por 1 min

descartando lo que se encontraba en el tubo colector. Se adicionaron 700  $\mu$ l de buffer de lavado y se centrifugó a 12 000 x g por 1 min para después descartar lo que se encuentre en el tubo colector.

Se volvió a centrifugar a 12 000 x g durante 1 min y se eliminó el buffer que quedó en la membrana de la columna.

Se colocó la columna en el tubo de elusión y se agregaron 75  $\mu$ l de TE 1 X precalentado a 65 °C, incubando 1 min a temperatura ambiente y centrifugando a 12 000 x g por 2 min.

Se verificó el producto de purificación realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 1 X, tiñendo el gel en bromuro de etidio y observando en un transiluminador de luz ultravioleta. Por último se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **3.3.3. Verificación de la presencia del inserto en el plásmido por PCR**

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para verificar que el inserto se haya ligado al plásmido. La PCR se llevó a cabo haciendo una mezcla de reacción con un volumen final de 25  $\mu$ l el cual lleva: 16.35  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 2.5  $\mu$ l de buffer de reacción 5 X, 2  $\mu$ l de desoxinucleótidos trifosfatados de 2.5 mM, 1  $\mu$ l (25 pmoles) de cada oligonucleótido, 0.15  $\mu$ l de Taq polimerasa de 5U/ $\mu$ l y 2  $\mu$ l de DNA plásmido purificado.

### **3.3.4. Purificación de los insertos en geles de agarosa**

Para la purificación del fragmento de interés se realizó una PCR, y posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE al 1X (Cuadro 1 A), y fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta, observándose la banda esperada, ésta se cortó con una navaja esterilizada y se introdujo en un tubo eppendorf para llevar a cabo la purificación con el kit de Purificación de DNA en Geles (Invitrogene<sup>MR</sup>) como se describe a continuación:

Nota: la cantidad de buffer de solubilización de gel depende del peso de la agarosa.

1. Se agregó un volumen de buffer de solubilización al tubo eppendorf que contenía el gel.
2. Se incubó a 50 °C por 15 minutos para que se fundiera el gel.
3. Se adicionó el sobrenadante a la columna y esta se colocó en el tubo de lavado.
4. Se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min y se desechó el sobrenadante que se encuentra en el tubo de lavado.
5. Se agregaron 500 µl de buffer de solubilización a la columna, incubando 1 min y centrifugando a 12,000 x g durante 1 min.
6. Se descartó lo que se encontró en el tubo de lavado, adicionando 700 µl de buffer de lavado a la columna e incubando 5 min a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó durante 1 min a 12,000 x g y se descartó el sobrenadante.
8. Nuevamente se centrifugó 1 min a 12,000 x g para remover el exceso de buffer de lavado que se encontraba en la columna.

9. Para disolver el DNA, se colocó la columna en el tubo de recuperación y se adicionaron 50  $\mu$ l de buffer TE precalentado a 65  $^{\circ}$ C.
10. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 12,000 x g por 2 min.
11. El DNA se almacenó a -20  $^{\circ}$ C hasta su uso.

### **3.3.5. Secuenciación con dideoxinucleotidos marcados**

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados por medio de la PCR, se utilizó un kit de Big Dye Terminator v3.1 para secuenciación de la marca Applied Biosystem<sup>MR</sup>, además de un equipo termociclador y secuenciador de la misma compañía.

El kit de secuenciación utiliza los siguientes reactivos: Big Dye v3.1 y buffer de reacción. Los oligonucleótidos que se utilizan son los mismos que se usan para la PCR, además de agua libre de nucleasas. Para la preparación del proceso de secuenciación se debe de conocer la concentración del producto de PCR y de los oligonucleótidos; las reacciones se hicieron por separado tanto para el oligonucleótido derecho, como para el izquierdo.

El proceso de secuenciación se realizó de la siguiente manera: 6  $\mu$ l del buffer Big Dye, 2  $\mu$ l de buffer de reacción, 2  $\mu$ l del oligonucleótido a una concentración de 3.2 pmolar, de 0.5 a 1  $\mu$ l del producto de PCR a una concentración de 50 a 70 ng/ $\mu$ l (la concentración del producto dependió del tamaño del fragmento que se secuenció tomando como referencia el marcador de

peso molecular, así se supo la cantidad de nuestro producto que se utilizará para la secuenciación), después se agregó un volumen de agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ l.

La mezcla de reacción de secuenciación se llevó a cabo con luz indirecta ya que el Big Dye es un fluoróforo sensible a la luz directa, posteriormente se llevó la mezcla de reacción al termociclador.

Después que terminó el programa térmico, se purificó cada una de las reacciones de la siguiente manera:

1. Al tubo de reacción se agregaron 2  $\mu$ l de EDTA a una concentración de 125 mM, 2  $\mu$ l de acetato de sodio al 3 M y 50  $\mu$ l de etanol absoluto grado biología molecular.
2. Se incubó 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 4 °C a una velocidad de 4 000 x g, con un tiempo de 45 min.
3. Se decantó y se agregaron 70  $\mu$ l de etanol al 70 % y se centrifugó a 3 000 x g 30 min.
4. Luego se decantó y se dejó secar 10 min a 60 °C ó por 2 horas a temperatura ambiente. No debe de quedar nada de etanol ya que cualquier residuo interfiere con el proceso de secuenciación.
5. Ya seco el tubo se adicionaron 12  $\mu$ l de formamida, se desnaturalizó a 95 °C 5 min y se colocó en hielo.

6. Por último se adicionaron los 12  $\mu$ l a la placa del equipo y se programó el equipo.

### **3.3.6. Análisis de secuencias y construcción de un dendograma**

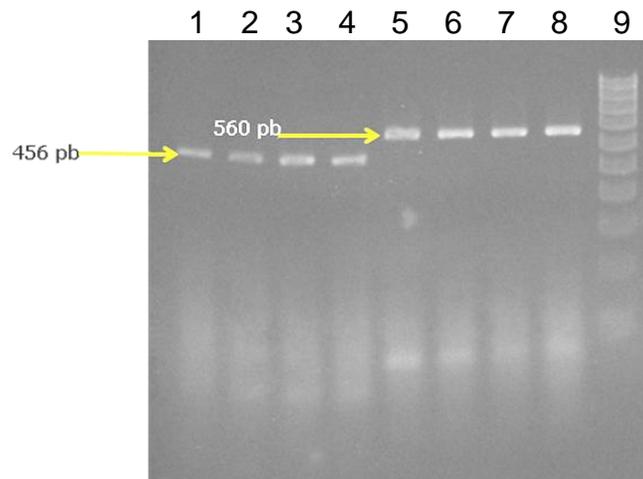
Con el Programa ABI 3.1 de secuenciación se observó el electroferograma que resultó de la secuencia y se analizaron las amplificaciones que se presentaron en forma de picos para verificar que el procedimiento se realizó adecuadamente.

Las secuencias de los fragmentos originales obtenidos fueron observadas con el programa FinchTV con el cual se exportó la secuencia al programa Blast del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) obteniéndose la primera modificación. Esta secuencia modificada fue comparada con la secuencia de mayor homología disponible en GenBank y se dio una segunda edición para obtener la secuencia final con la que se trabajó en alineamientos y comparación de homologías. Las secuencias finales fueron editadas con el programa Editseq y alineadas con el programa Megalign, ambos del paquete Winstar (DNASTAR Inc., Madison, WI) para la obtención de los porcentajes de similitud y la construcción del Dendograma.

## 4. RESULTADOS

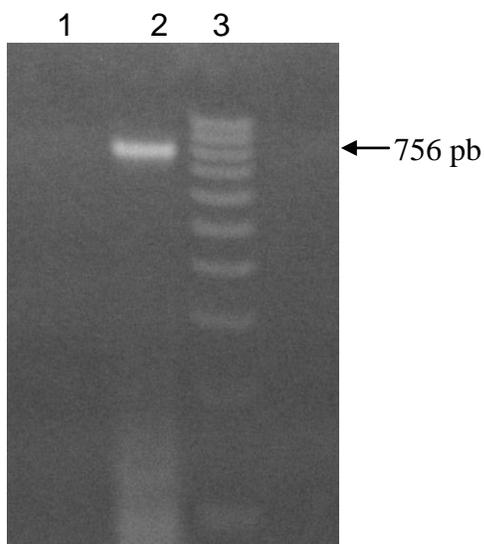
### 4.1. Implementación de la Técnica RT-PCR

Los tres juegos de iniciadores evaluados mostraron ser efectivos para la amplificación del cDNA del virus CYSDV. Los productos obtenidos fueron nítidos y con buena intensidad, consistentes y reproducibles. Con los iniciadores 410 U / 410 L se obtuvieron fragmentos de 465 pb. Con los iniciadores MA 129 / MA 156 se obtuvo un producto de 565 pb (Figura 3).



**Fig. 3 RT-PCR con los iniciadores 410U/410L y MA156/MA129.** Carriles 1-4 iniciadores 410 U / 410 L con temperaturas de anillamiento de 40, 42, 44 y 46 °C; carriles 5-8 iniciadores MA129 / MA156 con temperaturas de anillamiento de 52, 54, 56 y 58 °C respectivamente; carril 9 marcador de peso molecular escalera de 100 pb.

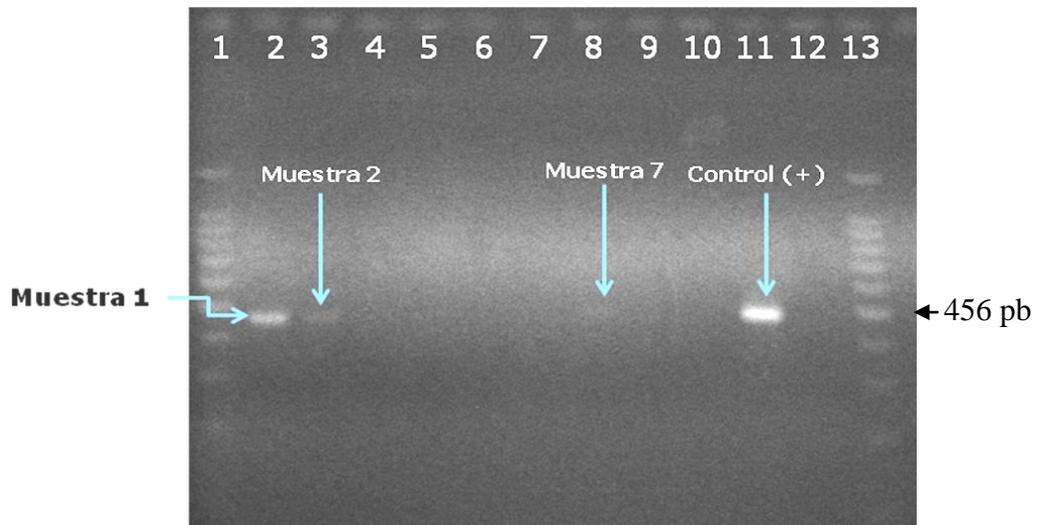
Con los iniciadores CYSDVr / CYSDVf, se obtuvo un fragmento de 756 pb con el programa térmico 92-66-72 °C por 60-30-30 seg durante 30 ciclos. La figura 4 muestra el producto amplificado.



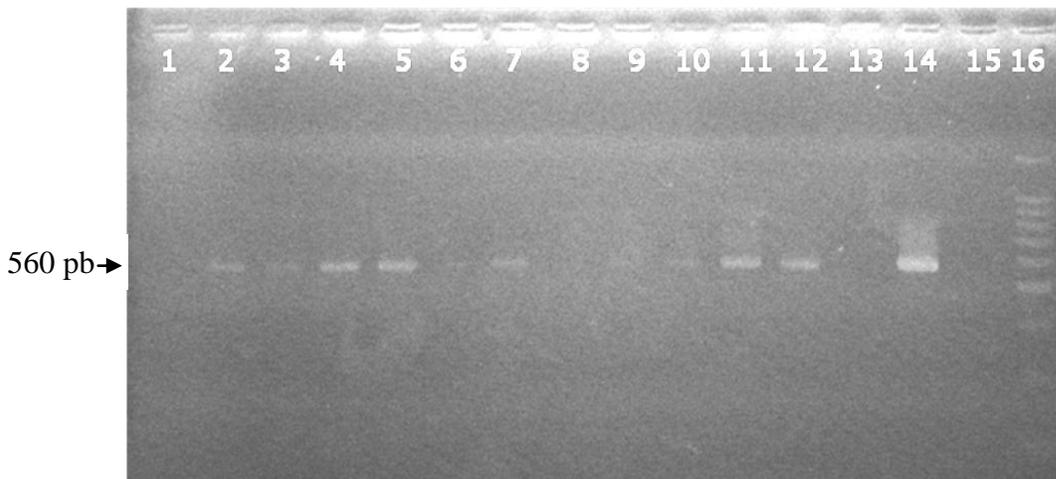
**Fig. 4. RT-PCR con los iniciadores CYSDVr/CYSDVf.** Carril 1 control negativo, carril 2 muestra positiva al CYSDV, carril 3 marcador de peso molecular escalera de 100 pb.

#### **4.2. Incidencia del Virus CYSDV en Plantas**

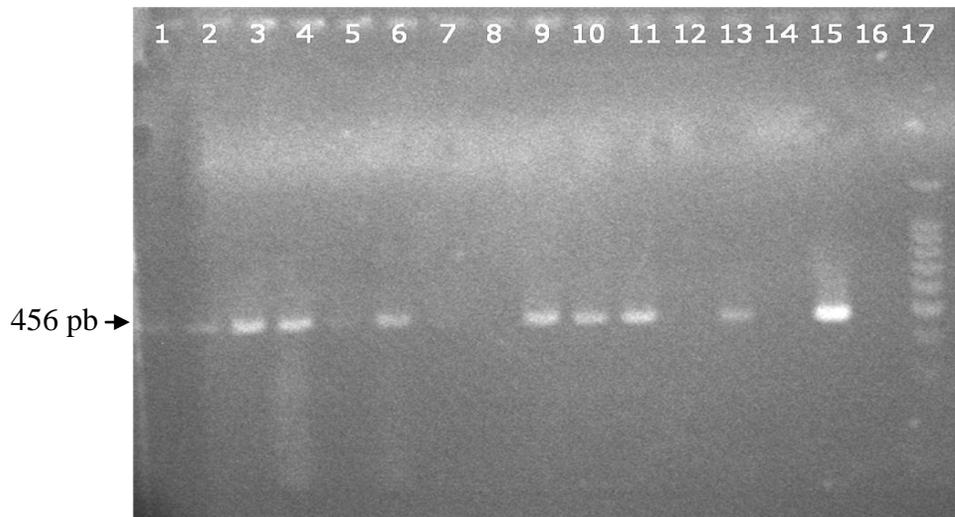
Con respecto a la detección del CYSDV en los cultivos de cucurbitáceas muestreados, únicamente se encontraron muestras positivas en el año 2008 con una alta incidencia en plantas de sandía cultivadas en Anáhuac, N.L. (Figura 5), en plantas de melón de Matamoros, Coahuila (Figura 6) y de Viesca, Coahuila (Figura 7).



**Fig. 5. RT-PCR con iniciadores específicos al gen HSP70, con muestras de Anáhuac, N. L.** Carriles del 2-9 muestras de sandía; carril 11 control positivo; carriles 10 y 12 controles negativos; carriles 1 y 13 marcador de peso molecular de 100 pb.



**Fig. 6. RT-PCR con iniciadores específicos al gen de la p22, con muestras de Matamoros, Coahuila.** Carriles 1 al 12 muestras de melón cantaloupe; carril 14 control positivo; carriles 13 y 15 controles negativos; carril 16 marcador de peso molecular 100 pb.



**Fig. 7. RT-PCR con iniciadores específicos al gen HSP70 con muestras de Viesca, Coahuila.** Carriles 1-13 muestras de melón; carril 15 control positivo; carriles 14 y 16 controles negativos; carril 17 marcador de peso molecular 100 pb.

Comparando localidades, en general, se observó una incidencia desde un 0 a 100 % de muestras positivas en las plantas muestreadas, en los lotes con síntomas reportados del virus en los muestreos del año 2008, lo cual se observa en el cuadro 5.

En primavera del 2009 se muestrearon cultivos de cucurbitáceas en las localidades de Matamoros y Benito Juárez, Coahuila, además se realizaron varios muestreos en el municipio de Cadereyta Jiménez, Nuevo León. En ningún caso se encontraron muestras positivas al virus (cuadro 6).

**Cuadro 5.** Incidencia del CYSDV en cucurbitáceas en varias localidades durante el ciclo verano-otoño 2008.

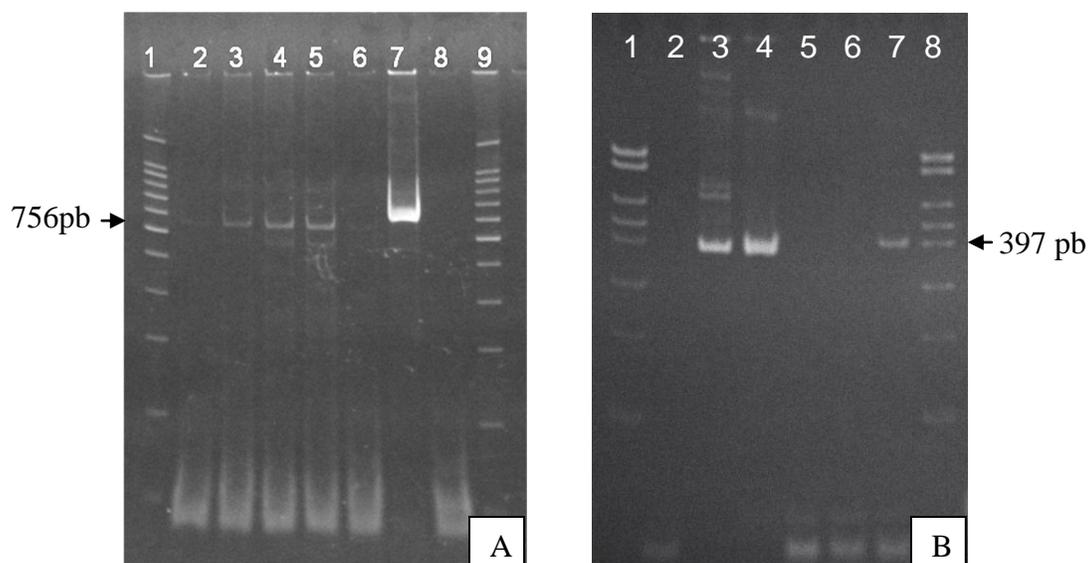
Estado	Municipio	Cultivo	Muestras + / Total	Muestras + (%)
Nuevo León	Cadereyta Jiménez	Calabacita	0/8	0
	Salinas Victoria	melón Cantaloupe	0/15	0
	Anáhuac	melón Cantaloupe	3/12	25
		sandía	2/9	22
Coahuila	Matamoros	melón Cantaloupe	9/12	75
	Viesca	melón Cantaloupe	10/13	76.9
Durango	Mapimi	melón Gota de Miel	2/2	100
<b>Total</b>			26/71	36.6

**Cuadro 6.** Incidencia del CYSDV en cucurbitáceas en varias localidades durante el ciclo primavera-verano 2009.

Estado	Municipio	Cultivo	Muestras + / Total	Muestras + (%)
Nuevo León	Cadereyta Jiménez	calabacita	0/6	0
		melón Cantaloupe	0/15	
		pepino	0/8	
	Marín	melón Cantaloupe	0/9	0
		sandía	0/7	
Coahuila	Matamoros	melón Cantaloupe	0/6	0
	Benito Juárez	melón Cantaloupe	0/7	0
<b>Total</b>			0/58	0

### 4.3. Detección del CYSDV en Mosquita Blanca

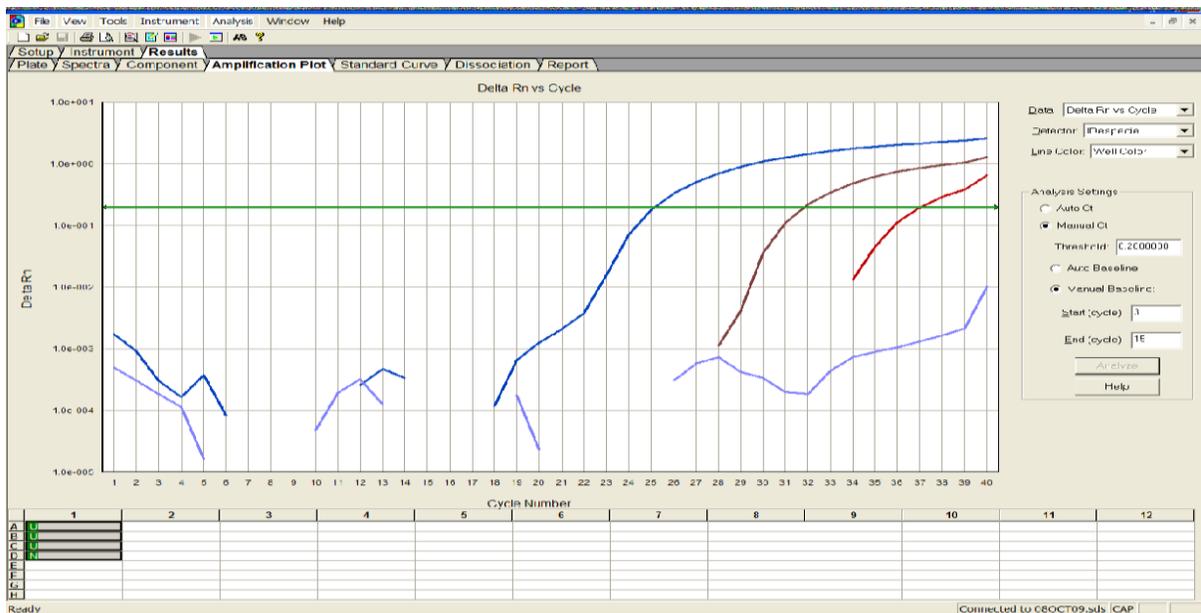
La detección del virus CYSDV en especímenes de mosquita blanca colectados en el verano de 2008 con la técnica de RT-PCR fue satisfactoria utilizando los oligonucleótidos que amplifican el gen de la cápside (756 pb), en donde se obtuvieron muestras positivas en especímenes colectados en Matamoros Coahuila, y Mapimi, Durango. Después de la RT-PCR se realizó el PCR secuencial (nested) con los iniciadores CysCPr/CysCPf en donde se obtuvieron las amplificaciones esperadas de 397 pb utilizando como ADN una dilución 1:10 del primer producto (Figura 8).



**Figura 8. (A) RT-PCR y (B) PCR secuencial con iniciadores específicos al gen de la CP con RNA de mosquita blanca.** (A) Carriles 2 al 6 muestras de campo, carriles 7 y 8 control positivo y negativo respectivamente, carriles 1 y 9 marcador de peso molecular de 100 pb (B) Carriles del 2 al 5 muestras de campo, carriles 6 y 7 control positivo y negativo, carriles 1 y 8 marcador de peso molecular de 100 pb.

### 4.3.1. Detección del CYSDV en mosquita blanca con SYBR Green

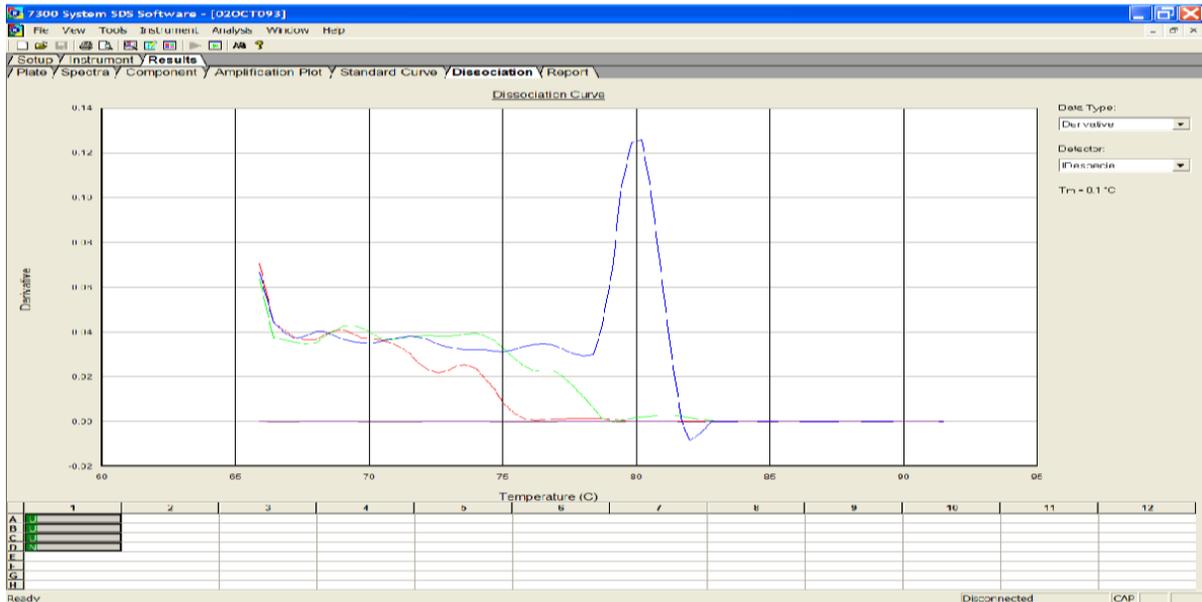
La detección del CYSDV en mosquita blanca mediante tiempo-real fue satisfactoria utilizando el kit de SYBR Green de Applied Biosystem<sup>MR</sup>; las muestras en donde se encontró el virus fueron las colectadas en la región de Matamoros, Coahuila. En el estado de Nuevo León, no se encontró el virus en el vector (Figura 9).



**Figura 9. RT-PCR tiempo-real.** La línea azul representa el control positivo con un Ct de 25, la línea morada y roja son muestras 1 y 4 positivas al CYSDV con un Ct de 32 y de 37, la línea celeste es el control negativo de reacción.

Las cantidades de cDNA utilizado en la prueba de PCR tiempo-real fue de 22.5 ng y de 225 ng siendo ambas cantidades adecuadas para la detección del virus mediante esta técnica, se evaluaron tres concentraciones de iniciadores CYScpR/CYScpF 0.5, 0.25 y 0.125 pmoles/ $\mu$ l, y la concentración más adecuada para la técnica fue de 0.125 pmoles/ $\mu$ l.

Con respecto a la curva de disociación, en la figura 10 se observa que no se desarrollaron dímeros con los iniciadores utilizados para la detección del CYSDV así como el rango de temperatura al cual se está mostrando la amplificación de las muestras en comparación con el control positivo utilizado.



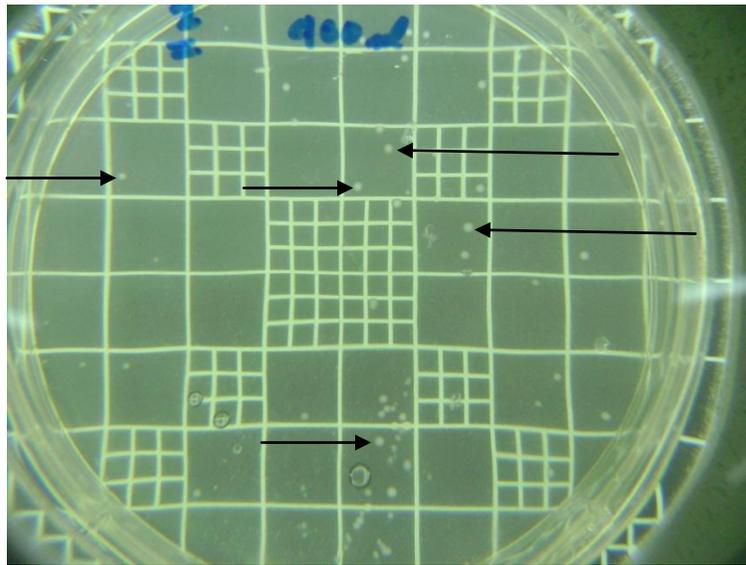
**Figura 10. Curva de disociación de PCR tiempo-real con SYBR Green.** Cada línea nos indica las amplificaciones de cada una de las muestras con base en el control positivo (línea azul).

#### 4.4. Caracterización Parcial del CYSDV

Se seleccionaron 2 muestras positivas de cada una de las localidades en donde se encontró el virus CYSDV. A partir de los productos de PCR de la amplificación de la cápside proteica del virus, se clonaron, transformaron y secuenciaron.

#### 4.4.1. Clonación y transformación

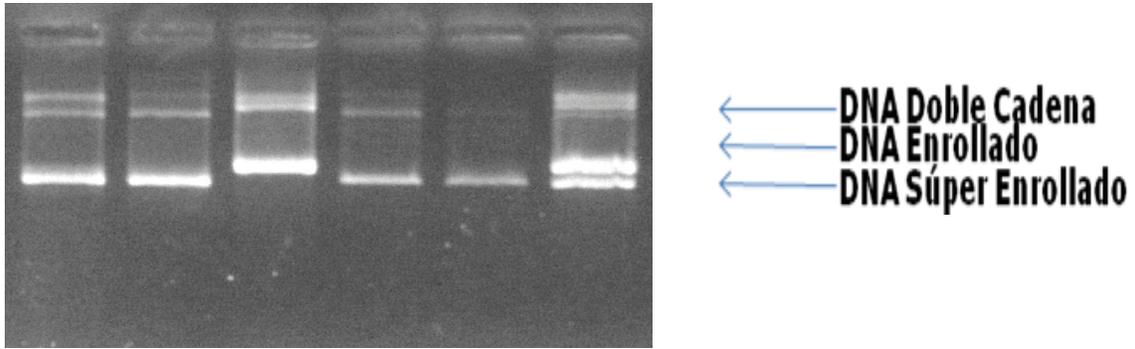
La clonación en el plásmido TOPO 4 fue satisfactoria con los fragmentos amplificados del gen que codifica para la CP del CYSDV. El vector fue introducido en la bacteria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y cultivado en medio LB sólido con Kanamicina mostrando uniformidad en el crecimiento bacteriano (figura 11).



**Fig. 11. Colonias de *Escherichia coli* con el vector plásmido que contiene insertado el fragmento de interés. Medio Lb agar + kanamicina, con crecimiento bacteriano.**

#### 4.4.2. Extracción del DNA plasmídico.

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR que codifican para la CP después de ser clonados en *E. coli*, fueron purificados como DNA plasmídico mediante el uso del kit Miniprep de Invitrogen<sup>MR</sup>. En la figura 12 se observan tres bandas indicando que la clonación y purificación se realizó correctamente.

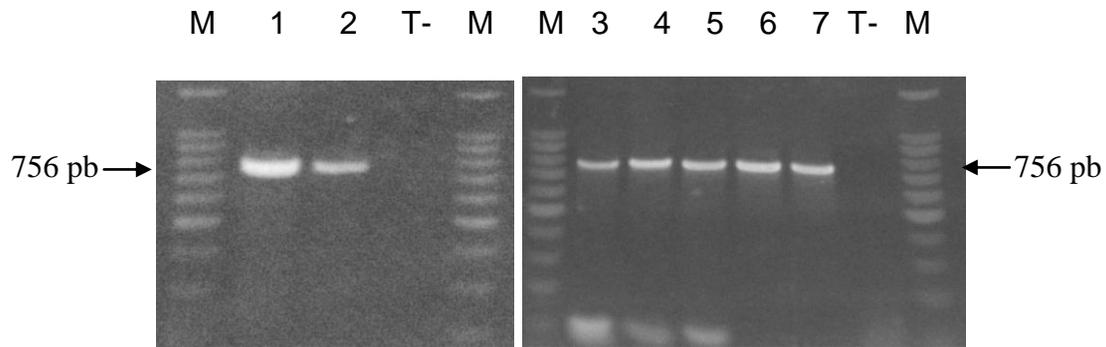


**Figura 12. Purificación del DNA plasmídico de varias clonas de *E. coli*.**

#### **4.4.3. PCR a partir de DNA plasmídico y purificación de los fragmentos de interés a partir de geles de agarosa**

Después de la purificación del fragmento CP del virus CYSDV, se realizó una PCR para asegurar la presencia del inserto, con oligonucleótidos específicos obteniendo fragmentos de 756 pb para la CP del CYSDV.

Una vez seleccionadas las muestras positivas por PCR, se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en buffer de TBE al 1 % con un voltaje de 100 V, y luego de ser teñido el gel con una solución de bromuro de etidio se observó en un transiluminador de luz ultravioleta los productos esperados (Figura 13).



**Figura 13. PCR de las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con los iniciadores CYSDVf/CYSDVr.** Los carriles 1 al 7 contienen los productos de la amplificación en cada una de las clonas positivas a la CP del CYSDV. T- es el control negativo y los carriles M son el marcador de peso molecular de 100 pb.

Una vez hecho el PCR de las clonas con el fragmento de la CP del CYSDV se purificó el fragmento de 756 pb con el kit de invitrogen<sup>MR</sup> de purificación en gel para posteriormente realizar la electroforesis y se observó el producto de la purificación.

#### **4.4.4. Secuenciación, comparación de secuencias y construcción de un dendograma**

El cuadro 7 muestra los datos de las tallas originales y editadas obtenidas con el primer reverso. Las secuencias de los fragmentos originales obtenidos fueron observadas con el programa FinchTV con el cual se exportó la secuencia al programa Blast del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) obteniéndose la primera modificación. Esta secuencia modificada fue comparada con la secuencia de mayor homología disponible en GenBank y se dio una segunda edición para obtener la secuencia final con la que se trabajó en alineamientos y comparación de homologías.

**Cuadro 7. Tallas moleculares obtenidas con el primer reverso en la secuenciación de las clonas del presente trabajo y la secuencia base melón de Arizona, E.U.** La cobertura está expresada con base en la secuencia de melón de Arizona, E.U., accesión FJ492808).

<b>Clona</b>	<b>Talla original (pb)</b>	<b>Talla modificada 1 (pb)</b>	<b>Talla modificada 2 (pb)</b>	<b>Covertura</b>
Melón de Anahuac, N.L.	563	498	402	5529-5129
Sandía de Anahuac, N.L.	590	531	415	5542-5129
Melón de Matamoros, Coah.	576	566	398	5531-5134
Melón de Viezca, Coah.	596	574	412	5542-5134
Melón de Mapimí, Durango	596	571	422	5541-5120
Melón de Arizona, E.U.	7976	-	422	5541-5120

Para realizar la comparación de las secuencias de los productos amplificados con las secuencias disponibles en el GenBank se utilizó el software FASTA, así como el programa Megalign utilizando el método Clustal. En el cuadro 8 se puede observar el alineamiento de las 5 secuencias obtenidas en el presente estudio y la secuencia tipo, melón de Arizona, E.U.

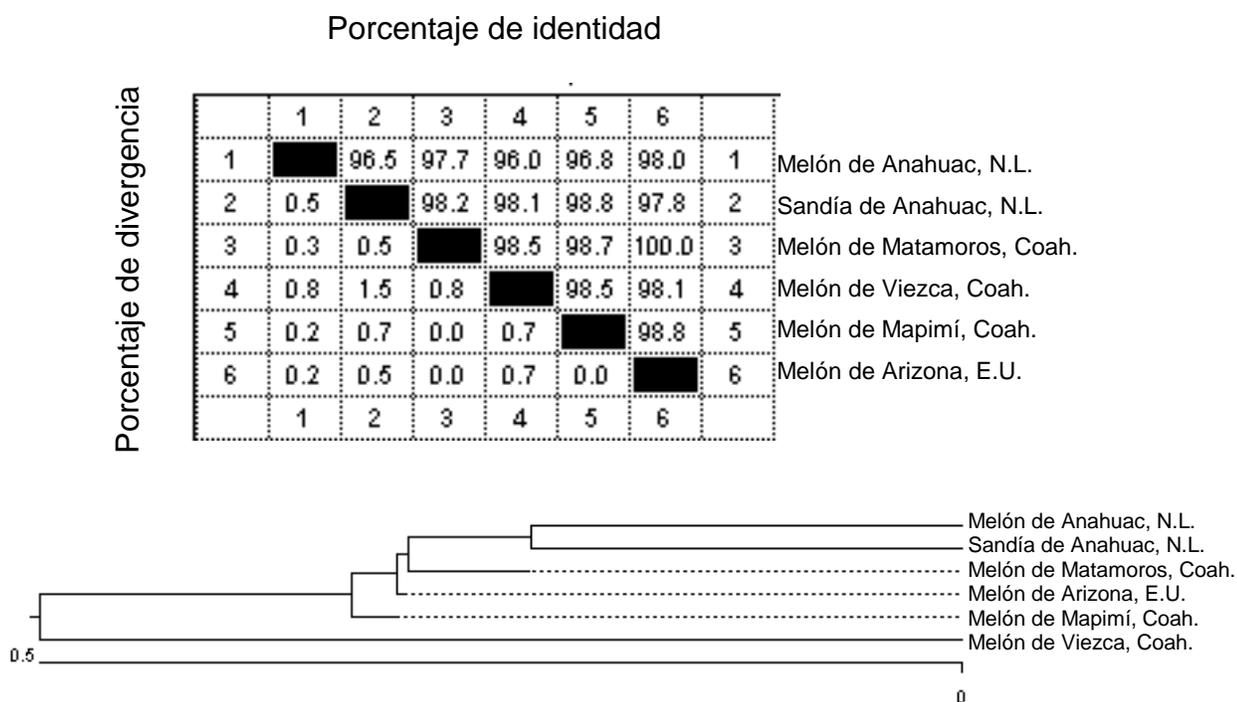
**Cuadro 8. Alineamientos de bases nucleotídicas de un fragmento de la cubierta proteica del CYSDV de diferentes aislamientos encontrados en el presente trabajo.**

	10	20	30	
1	- - - - -	- - A A C A T T C C A A A A C T G C G G T A A T A C C C C		Anahuac1.SEQ
1	C A T A A T C T G C T G G A A C A T T C C A A A A C T G C G G T A A T A C C C C		Anahuac2.SEQ	
1	- - - - -	- - G G A A C A T T C C A A A A C T G C G G T A A T A C C C C		Matamoros.SEQ
1	C A T A A T C T G C T G G A A C A T T C C A A A A C T G C G G T A A T A C C C C		Viesca.SEQ	
1	- A T A A T C T G C T G G A A C A T T C C A A A A C T G C G G T A A T A C C C C		MAPIMÓ.SEQ	
1	- A T A A T C T G C T G G A A C A T T C C A A A A C T G C G G T A A T A C C C C		Arizona.SEQ	
	40	50	60	70
28	A T G T T T C G C T T G A A G A T G A T G G T C A A C A G T G A C C T T T C C T		Anahuac1.SEQ	
41	A T G T T T C G C T T G A A G A T G A T G G T C A A C A G T G A C C T T T C C T		Anahuac2.SEQ	
30	A T G T T T C G C T T G A A G A T G A T G G T C A A C A G T G A C C T T T C C T		Matamoros.SEQ	
41	A T G T T T C G C T T G A A G A T G A T G G T C A A C A G T G A C C T T T C C T		Viesca.SEQ	
40	A T G T T T C G C T T G A A G A T G A T G G T C A A C A G T G A C C T T T C C T		MAPIMÓ.SEQ	
40	A T G T T T C G C T T G A A G A T G A T G G T C A A C A G T G A C C T T T C C T		Arizona.SEQ	
	80	90	100	110
68	G T T G C C T T C A A T A T C T C A A T T T C A T G T T C A T G A G C C C T G G		Anahuac1.SEQ	
81	G T T G C C T T C A A T A T C T C A A T T T C A T G T T C A T G A G C C C T G G		Anahuac2.SEQ	
70	G T T G C C T T C A A T A T C T C A A T T T C A T G T T C A T G A G C C C T G G		Matamoros.SEQ	
81	G T T G C C T T C A A T A T C T C A A T T T C A T G T T C A T G A G C C C T G G		Viesca.SEQ	
80	G T T G C C T T C A A T A T C T C A A T T T C A T G T T C A T G A G C C C T G G		MAPIMÓ.SEQ	
80	G T T G C C T T C A A T A T C T C A A T T T C A T G T T C A T G A G C C C T G G		Arizona.SEQ	
	120	130	140	150
108	C G T A T T G T C G A A A C G G G T T G G G C A C G T G T G G A A G G T T C C C		Anahuac1.SEQ	
121	C G T A T T G T C G A A A C G G G T T G G G C A C G T G T G G A A G G T T C C C		Anahuac2.SEQ	
110	C G T A T T G T C G A A A C G G G T T G G G C A C G T G T G G A A G G T T C C C		Matamoros.SEQ	
121	C G T A T T G T C G A A A C G G G T T G G G C A C G T G T G G A A G G T T C C C		Viesca.SEQ	
120	C G T A T T G T C G A A A C G G G T T G G G C A C G T G T G G A A G G T T C C C		MAPIMÓ.SEQ	
120	C G T A T T G T C G A A A C G G G T T G G G C A C G T G T G G A A G G T T C C C		Arizona.SEQ	
	160	170	180	190
148	C T T A A C A T A A T T G A T A A A G T C A G C C G T C C T C C A T G T C T T C		Anahuac1.SEQ	
161	C T T A A C A T A A T T G A T A A A G T C A G C C G T C C T C C A T G T C T T C		Anahuac2.SEQ	
150	C T T A A C A T A A T T G A T A A A G T C A G C C G T C C T C C A T G T C T T C		Matamoros.SEQ	
161	C T T A A C A T A A T T G A T A A A G T C A G C C G T C C T C C A T G T C T T C		Viesca.SEQ	
160	C T T A A C A T A A T T G A T A A A G T C A G C C G T C C T C C A T G T C T T C		MAPIMÓ.SEQ	
160	C T T A A C A T A A T T G A T A A A G T C A G C C G T C C T C C A T G T C T T C		Arizona.SEQ	
	200	210	220	230
188	T T T T G G T C A C C G T G C A T G A G T G T G T T G G T C A G A T T C A T C T		Anahuac1.SEQ	
201	T T T T G G T C A C C G T G C A T G A G T G T G T T G G T C A G A T T C A T C T		Anahuac2.SEQ	
190	T T T T G G T C A C C G T G C A T G A G T G T G T T G G T C A G A T T C A T C T		Matamoros.SEQ	
201	T T T T G G T C A C C G T G C A T G A G T G T G T T G G T C A G A T T C A T C T		Viesca.SEQ	
200	T T T T G G T C A C C G T G C A T G A G T G T G T T G G T C A G A T T C A T C T		MAPIMÓ.SEQ	
200	T T T T G G T C A C C G T G C A T G A G T G T G T T G G T C A G A T T C A T C T		Arizona.SEQ	

	240	250	260	270	
228	G T T T G G C G T T C T T C A T T G A C G T G C T C T G G T T T A A C C A A C A				Anahuac1.SEQ
241	G T T T G G C G T T C T T C A T T G A C G T G C T C T G G T T T A A C C A A C A				Anahuac2.SEQ
230	G T T T G G C G T T C T T C A T T G A C G T G C T C T G G T T T A A C C A A C A				Matamoro.SEQ
241	G T T T G G C G T T C T T C A T T G A C G T G C T C T G G T T T A A C C A A C A				Viesca.SEQ
240	G T T T G G C G T T C T T C A T T G A C G T G C T C T G G T T T A A C C A A C A				MAPIMÓ.SEQ
240	G T T T G G C G T T C T T C A T T G A C G T G C T C T G G T T T A A C C A A C A				Arizona.SEQ
	280	290	300	310	
268	T T G A A C C A A G C T T A T G T A A A A G G T T A A G A A T T C T T T C T C G				Anahuac1.SEQ
281	T T G A A C C A A G C T T A T G T A A A A G G T T A A G A A T T C T T T C T C G				Anahuac2.SEQ
270	T T G A A C C A A G C T T A T G T A A A A G G T T A A G A A T T C T T T C T C G				Matamoro.SEQ
281	T T G A A C C A A G C T T A T G T A A A A G G T T A A G A A T T C T T T C T C G				Viesca.SEQ
280	T T G A A C C A A G C T T A T G T A A A A G G T T A A G A A T T C T T T C T C G				MAPIMÓ.SEQ
280	T T G A A C C A A G C T T A T G T A A A A G G T T A A G A A T T C T T T C T C G				Arizona.SEQ
	320	330	340	350	
308	T C A G G G T T C T T T T C C A A A A A C T A T G G T T G C - A A A A T C T T T				Anahuac1.SEQ
321	T C A G G - T T C T T T T C C A A A A A C T A T G G G T G G C A A A A T C T T T				Anahuac2.SEQ
310	T C A G G - T T C T T T T C C A A A A A C T A T G G T T G C - A A A A T C T T T				Matamoro.SEQ
321	T C A G G - T T C T T T T C C A A A A A C T A T G G T T G C A A A A T C T T T N				Viesca.SEQ
320	T C A G G - T T C T T T T C C A A A A A C T A T G G T T G C A A A A A T C T T T				MAPIMÓ.SEQ
320	T C A G G - T T C T T T T C C A A A A A C T A T G G T T G C - A A A A T C T T T				Arizona.SEQ
	360	370	380	390	
347	C A T G C A C T T A G C A A A G G T G G C T T C A T C T T G A T C A C T C A T C				Anahuac1.SEQ
360	C A T G C A C T T A G C A A A G G T N G C T T C A T C T T G A T C A C T C A T C				Anahuac2.SEQ
348	C A T G C A C T T A G C A A A G G T T G C T T C A T C T T G A T C A C T C A T C				Matamoro.SEQ
360	C A T G C A C T T A G C A A A G G T N G C T T C A T C T T G A T C A C T C A T C				Viesca.SEQ
359	C A T G C A C T T A G C A A A G G T T G C T T C A T C T T G A T C A C T C A T C				MAPIMÓ.SEQ
358	C A T G C A C T T A G C A A A G G T T G C T T C A T C T T G A T C A C T C A T C				Arizona.SEQ
	400	410	420		
387	A C A T C T G C T C T A T T T G				Anahuac1.SEQ
400	A C A T C T G C T C T A T T T G				Anahuac2.SEQ
388	A C A T C T G C T C T				Matamoro.SEQ
400	A C A T C T G C T C T A T				Viesca.SEQ
399	A C A T C T G C T C T A T T T G A A A A G A C C T				MAPIMÓ.SEQ
398	A C A T C T G C T C T A T T T G A A A A G A C C T				Arizona.SEQ

Las secuencias de los fragmentos de DNA de las clonas obtenidas en el presente trabajo mostraron de un 96 a un 100 % de identidad (Figura 14) comparadas con la secuencia de Arizona E.U. reportada en el banco de genes del NCBI.

Con respecto al dendograma generado con el programa Megalign, se observa que las muestras de melón y sandía de la localidad de Anahuac, N.L. se agrupan en una rama, unidas a melón de Matamoros, Arizona, Mapimí y Viezca (figura 14).



**Figura 14. Porcentaje de identidad y dendograma con las secuencias de ADN de la CP de CYSDV.**

## 5. DISCUSIÓN

El aislamiento del RNA total y del RNA del virus CYSDV fue obtenido exitosamente con el método Trizol Reagent<sup>MR</sup> en tejidos vegetales de calabacita, melón, sandía y pepino. También para el caso de mosquita blanca, se obtuvieron resultados positivos con la utilización del sistema de aislamiento de RNA total SV de la marca Promega.

Para la estandarización de la RT-PCR se usó como control positivo una muestra vegetal infectada con el virus CYSDV. Los oligonucleótidos que se utilizaron son los reportados por Rubio *et al.* (1999, 2001) para la p22 obteniéndose un producto de 565 pb, y para el gen del HSP70 (456 pb) los cuales fueron adecuados, también se utilizaron oligonucleótidos para el gen de la CP del virus así como iniciadores internos para el mismo gen propuestos por Marco *et al.* (2003), Kuo *et al.* (2007) y Polston *et al.* (2008), con los que se obtiene un producto de amplificación de 753 pb, y al utilizar los iniciadores internos CysCPf/CysCPr en la RT-PCR anidada se obtienen amplificaciones de 397 pb.

Se analizaron en total 113 muestras de calabacita, melón, sandía y pepino, colectadas en ocho localidades de igual número de municipios en los estados de Nuevo León, Coahuila y Durango durante los ciclos agrícolas verano-otoño del año 2008 y primavera-verano del 2009, y se obtuvieron 26 muestras positivas. Solamente en dos localidades, Cadereyta Jiménez y Salinas Victoria, N.L. no se detectó al virus en las muestras analizadas. Únicamente se detectó la presencia del virus en plantas cultivadas en el ciclo verano-otoño del año 2008. Aunque no tenemos una explicación comparativa sobre el comportamiento del virus en los dos ciclos agrícolas, y tampoco tenemos la evaluación de años adicionales, lo anterior es compatible con los resultados obtenidos por Wintermantel *et al.* (2009) quienes también observaron una menor incidencia del virus CYSDV en el sur de California en el ciclo de primavera comparado con una mayor incidencia en otoño. La más probable explicación sobre la diferencia en la ocurrencia del CYSDV entre

los ciclos agrícolas pueda ser atribuida a la ocurrencia del vector, la mosquita blanca, la cual a su vez, está influenciada por las condiciones climáticas y por la aplicación de insecticidas principalmente. Lo anterior fue corroborado con las detecciones del CYSDV en especímenes de mosquita blanca recolectados en localidades con muestras vegetales positivas al virus.

Los primeros reportes de la enfermedad causada por el virus CYSDV en México son muy recientes, en el año 2006 se reportó su incidencia en cultivos de melón, calabaza, pepino y la arvense “meloncillo coyote” en Caborca, Hermosillo y Guaymas, Sonora; y en el año 2007 en Guaymas, Valle del Yaquí, y la costa de Hermosillo, Sonora (Moreno-Bedoy y Figueroa-López , 2008; Moreno-Salazar *et al.*, 2009). Por lo anterior nuestros resultados representan el primer reporte de la incidencia del CYSDV en cultivos de cucurbitáceas en los estados de Nuevo León, Coahuila y Durango, lo que evidencia la diseminación del virus.

Al realizar la comparación genética de las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos amplificados de muestras positivas al virus CYSDV se obtuvo un porcentaje de homología entre un 96 y un 100 % para una porción del gen de la cápside en todas las clonas secuenciadas. Al realizar la construcción del dendograma con las secuencias de las muestras positivas colectadas de cada una de las regiones del Centro-Norte y Noreste México, y al ser comparadas con la variante de Arizona, Estados Unidos de Norteamérica obtenida del banco de genes (NCBI), se agruparon a las 2 secuencias de Anahuac, N.L.

## 6. CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo experimental de campo y laboratorio, así como las comparaciones de secuencias con software especializado, se obtuvo un protocolo basado en la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa para una detección eficiente del virus del amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV), además se determinó la incidencia del virus en lotes comerciales de melón Cantaloupe, Gota de miel, melón chino y sandía colectada en los estados de Nuevo León, Coahuila y Durango con las siguientes conclusiones específicas:

El RNA obtenido a partir de hojas frescas por el método comercial Trizol Reagent y el sistema de aislamiento de RNA total SV usado en mosquita blanca, fueron efectivos para el establecimiento de un protocolo basado en RT-PCR punto final y tiempo real para la detección del virus CYSDV.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la HSP70, la proteína 22 y CP fueron efectivos en la detección del virus del amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas.

Las muestras obtenidas en el verano del 2008 provenientes de los municipios de Cadereyta Jiménez y Salinas Victoria resultaron negativas al virus; sin embargo se obtuvo una muestra positiva en melón y dos en sandía de las plantas colectadas en Anáhuac N. L. Con respecto a las muestras colectadas durante el mismo año en Matamoros y Viesca Coahuila; así como en Mapimí, Durango, en su mayoría dieron positivas al CYSDV.

La presencia del CYSDV está asociada con las altas poblaciones de mosquita blanca (*B. tabaci*) lo cual fue corroborado por RT-PCR.

Se implementó un protocolo de detección molecular del CYSDV en mosca blanca mediante RT-PCR tiempo-real con la tecnología del SYBR Green de Applied Biosystem<sup>MR</sup>.

Se obtuvo un porcentaje de identidad del 96 al 100 % entre los fragmentos amplificados de muestras obtenidas de los municipios de Anahuac, N.L., Matamoros, Coahuila, Viesca, Coahuila y Mapimí, Durango al ser comparados con la CP de la cepa de Arizona, Estados Unidos de Norteamérica,.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abou-Jawdh, Y., Eid S.G., Atamian, H.S., and Havey, M. 2008. Assessing the movement of cucurbit yellow stunting disorder virus in susceptible and tolerant cucumber germplasm using serological and nucleic-based methods. *J. of Phytopathology* 156:438-445.
- Aguilar, J.M., Franco M., Marco, C.F., Berdiales, B., Rodríguez, C.E., Truniger, V., and Aranda, M.A. 2003. Further variability within the genus *Crinivirus*, as revealed by determination of the complete RNA genome sequence of cucurbit yellow stunting disorder virus. *J. of Gen. Virology* 84: 2555-2564.
- Aloisi, R.M. 1979. *Principles of Immunodiagnosics*. The C.V. Morby Co. Londres. 172p.
- Ávila, A.C., Salazar, L.F., Ortega, M., and Daniels, J. 1984. A new strain of Andean potato mottle virus from Brazil. *Plant Dis.* 68:997-998.
- Brown, J.K., Guerrero, J.C., Matheron, M., Olsen, M., and Idris, M.A. 2007. Widespread outbreak of cucurbit yellow stunting disorder virus in melon, squash and watermelon crops in the Sonoran desert of Arizona and Sonora Mexico. *Plant Disease Note*.
- Celix, A., López, S.A., Almaraz, N., Gómez, G.M., and Rodríguez, C.E. 1996. Characterization of *Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus*, a *Bemisia tabaci*-transmitted Closterovirus. *Phytopathology* 86:1370-1376.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Coutts, R.H.A. and Livieratos, I.C. 2003. Nucleotide sequence and genome organization of cucurbit yellow stunting disorder virus RNA1. *Archives of Virology* 148:2055-2062.
- De Bokx, J.A. 1972. *Virus of Potato and Seed Potato Production*. Pudoc, Wageningen, Holanda.
- Edwards, K., Logan, J. and Saunders, N. 2004. *Real-Time PCR an Essential Guide*. Editorial Horizon Bioscience. pp 71-184.
- Eid, S., Abou-Jawdah, Y., El-Mohtar, C., and Sobh, H. 2006. Tolerance in cucumber to CYSDV. *Plant Dis.* 90:645-649.

- Fribourg, C.E. and Nakashima, J. 1984. An improved latex agglutination test for routine detection of potato virus. *Potato Res.* 27:237-249.
- Gil-Salas, F.M., Morris, J., Colyer, A., Budge, G., Boonham, N., Cuadrado, I.M. and Janssen, D. 2007. Development of real-time RT-PCR assays for detection of cucumber vein yellowing virus (CVYV) and cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*. *J. of Virol. Methods* 146:45-51.
- Khasdan V., Levin I., Rosner A., Morin S., Kontsedalov S., Maslenin L., and Horowitz A. R. 2005. DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and studying population dynamics. *Bulletin of Entomological Research* 95:605-613.
- Kuo, Y.W., Rojas, M.R., Gilberston, R.L., and Wintermantel, W.M. 2007. First report of cucurbit yellow stunting disorder virus in California and Arizona, in association with cucurbit leaf crumple virus and squash leaf curl virus. *Plant Dis. Notes* 91.
- Liu, H.Y., Wisler, G.C., and Duffus, J.E. 2000. Particle lengths of whitefly-transmitted Criniviruses. *Plant Dis.* 84:803-805.
- Marco, C.F., Aguilar, J. M., Abad, J., Gómez G. M. L., and Aranda, M. A. 2003. Melon resistance to cucurbit yellow stunting disorder virus is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology* 93:844-852.
- Marco, C.F. and Aranda, M.A. 2005. Genetic diversity of a natural population of cucurbit yellow stunting disorder virus. *J. of General Virology* 86:815-822.
- Moreno-Bedoy, A. y Figueroa-López, P. 2008. Virus del amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) detectado en el sur de Sonora, México. *Memorias del Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*.
- Moreno-Salazar, S.F., Brown, J.K., Rentería-Martínez, M.E., Guerrero-Ruiz, J.C., Canseco-Vilchis, E.P., Ochoa-Meza, A. y Zamora, E. 2009. Identificación del agente causal del amarillamiento de las cucurbitáceas en el cultivo de melón en la región de la costa de Hermosillo, Sonora. *Memorias del Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*.
- Polston, J.E., Hladky, L.L., Akad, F., and Wintermantel, W.M. 2008. First report of cucurbit yellow stunting disorder virus in cucurbits in Florida. *Plant Pathology Disease Notes* 92.

- Rubio, L., Soong, J., Kao, J. and Falk, W.B. 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne *Closteroviruses* of cucurbits: Lettuce infections yellows virus, cucurbit yellow stunting disorder virus and beet pseudo-yellow virus. *J. of Virology* 89:707-711.
- Rubio, L., Jawadah, A.Y., Lin, H.X., and Falk, W.B. 2001. Geographically distant isolates of the *Crinivirus* CYSDV show very low genetic diversity in the coat protein gene. *J. of General Virology* 82:929-933.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera Edición, Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Cambra, M. 1981. *Técnicas Inmunoenzimáticas en Patología Animal y Vegetal*. Ministerio de Agricultura. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España. 57p.
- Shepard, J.F. and Secor, G.A. 1972. The effects of enzymatic digestion on the molecular weight and antigenic specificity of potato virus X protein. *Phytopathology* 62:1154-1160.
- Sinclair, J.W. and Crosby, K.M. 2002. A review of cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) a “new” virus affecting melons in the lower rio grande valley. *Subtropical Plant Science* 54:54-58.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Huldtt, G., and Engvall, E. 1974. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull. World Health Org.* 51:209-211.
- Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Cortez, A.A., and Natwick, E.T. 2009. A new expanded host range of cucurbit yellow stunting disorder virus includes three agricultural crops. *Plant Dis* 93:685-690.

## 8. APÉNDICE

### Cuadro 1A. Preparación de soluciones químicas.

#### **Acrilamida-bisacrilamida 30 % 200 ml**

58.4 g Acrilamida

1.6 g Bisacrilamida

#### **Agua DEPC 0.1%**

Tomar 1 ml de DEPC y aforar a 1000 ml de agua

#### **Azul de bromofenol 0.3%**

0.25% azul de bromofenol

0.25% xylene cyanol FF

30% glycerol

#### **Bromuro de etidio**

Solución stock 10 mg/ml

#### **EDTA 0.5 M (500 ml)**

93.06 gr EDTA

10 g NaOH

#### **Etanol 70 % (1 lto.)**

700 ml etanol absoluto

300 ml agua tratada con DEPC 0.1 %

#### **Persulfato de amonio (APS) 10 %**

1.5 g APS

Aforar a 15 ml

**SB 20X 1000 ml (NaOH 0.2 M, Acido bórico 0.7278 M)**

44.98 g ácido bórico

8 g hidróxido de sodio

**Tris-Base 50 mM (1000 ml)**

6.057 g Tris-base

**TBE 5X 1000 ml (Acido bórico 445 mM, Tris-base 445 mM, EDTA 10 mM)**

54 g Tris HCl pH7.4

27.5 g Ácido bórico

20 ml EDTA 0.5M

**TBE 0.5X**

Se prepara a partir de la solución TBE 5X