Universidad de Costa Rica Facultad de Ciencias Básicas Escuela de Biología

Trabajo final de graduación modalidad "Práctica dirigida" para obtener el grado de ''Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología''

Estandarización de la detección de los principales virus que afectan la planta de banano (Musa sp.): Banana bunchy top virus, Banana streak virus y Cucumber mosaic virus

> María Laura Segura Jiménez B56814

> > Sede Rodrigo Facio

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2022

Miembros del tribunal

Dr.rer.nat. Federico L'Albertazzi Director del Trabajo Final de Graduación

M.Sc. Ana María Conejo Asesora del Trabajo Final de Graduación

1 ab

Ph.D. James Karkashian Córdoba Asesor del Trabajo Final de Graduación

Ph.D. Cindy Fernández García Presidente del Tribunal

Keiles Rojos & vier

M.Sc. Keilor Osvaldo Rojas Jiménez Miembro del Tribunal

B.Sc. María Laura Segura Jiménez Postulante

Dedicatoria

A mi mamá que siempre me apoyó, me impulsó a seguir adelante con mis proyectos y metas, y me mostró lo que significa un lazo de familia, te amo gracias por ser un ejemplo.

A mi compañero de vida KJ, gracias por haberme permitido seguir adelante y por haber sacrificado tanto para ayudarme a cumplir mis metas.

A todos los científicos de las siguientes generaciones, no se den por vencidos, luchen por pasión y trabajen por sus metas.

Agradecimientos

A mi tía Ani gracias por siempre estar detrás de mí, por preocuparte por mi bienestar y por mis metas.

Al comité asesor por haberme guiado y logrado que culminara mi proyecto de graduación satisfactoriamente. Al director Dr.rer.nat. Federico Albertazzi por haberme contactado con CORBANA y haberme apoyado en todo el proceso práctico del proyecto, a Ph.D. James Karkashian por haberme guiado en el proceso y por sus aportes tan importantes en la materia de virus y a M.Sc. Ana María Conejo por su ayuda en todo el proceso práctico y la estadía en el laboratorio.

A CORBANA por haberme dado la oportunidad de crecer como profesional, y haberme abierto las puertas de sus laboratorios e instalaciones, así como la vivencia de una experiencia inolvidable. Especialmente a los mencionados en este trabajo Don Mauricio Guzmán, Don Jorge Sandoval, MSc. Ana María Conejo, M.Sc. Fabiola Alfaro, María José Sáenz, y al personal administrativo en general.

A mi perrita Maya haberme acompañado, después de un día largo en el laboratorio además de los días de redacción y búsqueda de información. A mi perrita Azula por acompañarme en los últimos meses de redacción.

A Kathy Crew por haber donado amablemente los controles positivos de los ensayos, así como las metodologías para algunos de los virus, esto por medio del convenio de Transferencia Tecnológica CORBANA- Australia (2018-2019). Índice general

1. Antecedentes	17
1.1 Generalidades del cultivo de banano variedad Cavendish Gran Enan sp.)	o (<i>Musa</i> 17
1.2 Virus en plantas	17
1.3 Virus en el cultivo de banano (<i>Musa</i> sp.)	18
1.4 Virus de importancia para el cultivo del banano (<i>Musa</i> sp.) en Costa Rica 1.4.1 <i>Banana bunchy top virus</i> : Distribución geográfica, síntomas y carac moleculares	18 terísticas 18
1.4.2 <i>Banana streak virus</i> : Distribución geográfica, síntomas y carac moleculares	terísticas 19
1.4.3 <i>Cucumber mosaic virus</i> : Distribución geográfica, síntomas y carac moleculares	terísticas 21
1.5 Técnicas Moleculares para la detección de virus en plantas de banano (Mus	<i>a</i> sp.)_22
2. Justificación	23
2.1 Importancia económica del cultivo de banano en Costa Rica	23
2.2 Problemas fitosanitarios del cultivo de banano	23
2.3 Pérdidas económicas debido a virus en plantas de banano (<i>Musa</i> sp.)	24
2.4 Virus en plantas de banano en Costa Rica	25
2.5 Manejo de virus en plantaciones de banano (<i>Musa</i> sp.)	25
2.6 Importancia de PCR para la detección de virus en plantas	26
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo General	27
3.2 Objetivos especificos	27
4. Materiales y Métodos	28
4.1 Revisión de Bibliografía	28
4.2 Controles positivos utilizados en la investigación	28
4.3 Metodologías y detección de los virus estudiados	29
4.3.1 Detección Banana bunchy top virus	29
4.3.2 Detección Banana streak virus	31

4.3.3 Detección Cucumber mosaic virus	34
4.4 Diseño experimental	42
4.4.1 Banana bunchy top virus	42
4.4.2 Banana streak virus	42
4.4.3 Cucumber mosaic virus	44
4.5 Materiales y casas comerciales/marcas	45
4.6 Labores extracurriculares del proyecto de virus	45
5. Resultados	46
5.1 Banana bunchy top virus	46
5.1.1 Detección molecular	46
5.1.2 Revisión bibliografíca	49
5.2 Banana streak virus	51
5.2.1 Detección molecular	51
5.2.2 Revisión bibliografíca	66
5.3 Cucumber mosaic virus	68
5.3.1 Detección molecular	68
5.3.2 Revisión bibliografíca	72
5.4 Controles Positivos	73
5.4.1 Banana bunchy top virus	73
5.4.2 Banana streak virus	74
5.4.3 Cucumber mosaic virus	75
5.5 Labores extracurriculares del proyecto de virus	76
6. Discusión	77
6.1 Banana bunchy top virus	77
6.2 Banana streak virus	79
6.3 Cucumber mosaic virus	84
6.4 Limitantes del proyecto y recomendaciones	87
7. Conclusiones	89
7.1 Banana bunchy top virus	89
7.2 Banana streak virus	90
7.3 Cucumber mosaic virus	91
8. Bibliografía	92

Índice de figuras

 Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de PCR para la detección del

 BBTV utilizando los imprimadores específicos
 BBTVF1/BBTVR1 (Chen & Hu,

 2013).
 46

 Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de PCR de diluciones seriadas

 para la detección del BBTV utilizando los imprimadores específicos BBTVF1/BBTVR1

 (Chen & Hu, 2013).
 48

 Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores

 específicos BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de

 BSV-GF, tratamiento SA (izq) y CA (der).

 53

 Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores

 específicos BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de

 BSV-OL, tratamiento SA (izq) y CA (der).

 53

 Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores

 específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY,

 tratamiento SA (izq) y CA (der).
 54

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, tratamiento SA (izq) y CA (der). _____55

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 y BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY y BSV-GF tratamiento SA y CA. ____56

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 y BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY y BSV-OL tratamiento SA y CA. ____57

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF en los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) tratamiento SA (izq) y CA (der). _____61

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF en los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger), tratamiento SA. ____63 Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY en el control negativo de la variedad Mysore tratamiento SA (izq) y CA (der). _____64 Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY

65

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-GF en el control negativo de la variedad Gold Finger tratamiento SA (izq) y CA (der)._____66

 Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de RT-PCR para la detección

 del CMV utilizando los imprimadores específicos CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE), mezcla

 1.1 transcripción reversa (izq) y mezcla 1.2 transcripción reversa (der).

 69

 Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de RT-PCR para la detección

 del CMV utilizando los imprimadores específicos CP-CMV-RE/CP-CMV

 (CATIE).

 70

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de RT-PCR para la detección del CMV utilizando los imprimadores específicos CMVF/CMVR (Bariana et al., 1994)._**71**

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Imprimadores específicos utilizados para la detección molecular de BBTV29
Cuadro 2. Condiciones de la mezcla 1 de PCR y del termociclador para la detección de
BBTV (Chen & Hu, 2013)31
Cuadro 3. Imprimadores específicos utilizados para la detección molecular de BSV32
Cuadro 4. Condiciones de la mezcla 1 de PCR y del termociclador para la detección de BSV
(CATIE)34
Cuadro 5. Imprimadores específicos utilizados para la detección molecular de CMV35
Cuadro 6. Condiciones de la mezcla 1 y del termociclador para el paso de desnaturalización
para la detección de CMV (CATIE)36
Cuadro 7. Condiciones de la mezcla 2 y del termociclador para el paso de desnaturalización
para la detección de CMV (Musanet Biodiversity International)36
Cuadro 8. Condiciones de la mezcla 1.1 y del termociclador para el paso de transcripción
reversa para la detección de CMV (CATIE)37
Cuadro 9. Condiciones de la mezcla 1.2 para el paso de transcripción reversa para la
detección de CMV (CATIE)37
Cuadro 10. Condiciones de la mezcla 2 y del termociclador para el paso de transcripción
reversa para la detección de CMV (Musanet Biodiversity International)37
Cuadro 11. Condiciones de la mezcla 1 y del termociclador para el paso de PCR para la
detección de CMV (CATIE)38

Cuadro 12. Condiciones de la mezcla 2 y del termociclador para el paso de PCR para la
detección de CMV (Musanet Biodiversity International)38
Cuadro 13. Condiciones de la mezcla y del termociclador para el paso de desnaturalización
para la detección de CMV (CATIE)40
Cuadro 14. Condiciones de la mezcla y del termociclador para el paso de transcripción
reversa para la detección de CMV (CATIE)41
Cuadro 15. Condiciones de la mezcla y del termociclador para el paso de PCR para la
detección de CMV (CATIE)41
Cuadro 16. Materiales utilizados para la detección de BBTV, BSV y CMV en plantas de
banano (<i>Musa</i> sp.)45
Cuadro 17. Prueba para la detección de BBTV con los imprimadores BBTVF1/BBTVR1
según la metodología modificada 1 CORBANA y Chen & Hu (2013) al utilizar distintas
condiciones en el la mezcla de PCR47
Cuadro 18. Prueba de sensibilidad de la concentración mínima de ADN diluido, con los
imprimadores BBTVF1/BBTVR1 según la metodología modificada 1 CORBANA y Chen
& Hu (2013)48
Cuadro 19. Metodologías para la detección de BBTV encontradas en la búsqueda de
revisión bibliográfíca (2015-2021)49
Cuadro 20. Prueba para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-OL-GF-F1/
BSV-OL-GF-R1 y BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-F1 al utilizar la metodología modificada
1 para BSV (CATIE), con 5 tipos de muestras provenientes de distintas variedades de banano
y dos tratamientos SA y CA52

Cuadro 21. Prueba para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE), con 5 tipos de muestras provenientes de distintas variedades de banano y dos tratamientos SA y CA. __54

Cuadro 22. Visualización de los productos de IC-PCR de los ensayos para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 y BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE) con BSV-GF Australia y BSV General CORBANA y dos tratamientos SA y CA. _____56

Cuadro 23. Visualización de los productos de IC-PCR de los ensayos para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1 y BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-R1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE) con BSV-OL y BSV General CORBANA y dos tratamientos SA y CA. _____57

Cuadro 24. Prueba para validar los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF, al utilizar dos tratamientos SA y CA. _____58

Cuadro 25. Prueba para validar los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF, al utilizar el tratamiento SA. _____62

Cuadro 26. Prueba para validar el control negativo de la variedad Mysore con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY al utilizar dos tratamientos SA y CA. _____63

Cuadro 27. Prueba para validar el control negativo de la variedad Red Dacca con imprimadores específicos BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-OL al utilizar dos tratamientos SA y CA. _____64

Cuadro 28. Prueba para validar el control negativo de la variedad Gold Finger con imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-GF al utilizar dos tratamientos SA y CA. _____65

Cuadro 29. Metodologías para la detección de BSV encontradas en la búsqueda de revisión bibliográfíca (2015-2021)._____66

Cuadro 30. Prueba para la detección de CMV con los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE) metodología modificada 1 para CMV CATIE/ Musanet Biodiversity International al utilizar dos condiciones en la mezcla 1 de transcripción reversa (1.1 y 1.2). ____69

Cuadro 31. Prueba para la detección de CMV con los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE) al utilizar la metodología modificada 2 para CMV CORBANA- Islas et al., 2006 y CATIE.______70

Cuadro 32. Prueba para la detección de CMV con los imprimadores CMVF/CMVR (Bariana et al., 1994) al utilizar la metodología modificada 1 para CMV CATIE/ Musanet Biodiversity International y las condiciones mezcla 2 de RT-PCR por Musanet Biodiversity International. ______71

Cuadro 33. Metodologías para la detección de CMV encontradas en la búsqueda de revisión bibliográfíca (2015-2021). 72

Cuadro 34. Resumen de las labores	extracurriculares	del proyecto o	de virus realizadas
durante las 20 semanas prácticas en las	instalaciones del l	Laboratorio de l	Biología Molecular
CORBANA			76

Glosario de términos

ADNhs: ADN hebra simple

ADNhd: ADN hebra doble

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa

IC-PCR: Inmunocaptura - Reacción en cadena de la polimerasa

IC-RT-PC: Inmunocaptura - Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa- Cuantitativo

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

CIBCM: Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular

UCR: Universidad de Costa Rica

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

CORBANA: Corporación Bananera Nacional

BBTV: Banana bunchy top virus

CMV: Cucumber mosaic virus

BSV: Banana streak virus

BBrMV: Banana bract mosaic virus

BanMMV: Banana mild mosaic virus

TA: Temperatura ambiente

BSV-OL: Banana streak virus variedad Red Dacca

BSV-GF: Banana streak virus variedad Gold Finger

BSV-MY: Banana streak virus variedad Mysore

DTT: DL-Ditiotreitol

DIBA: Inmunobligación puntual

RT-RPA: Transcripción reversa- Amplificación de recombinasa polimerasa

RCA: Amplificación de círculo rodante

+: Banda observada

-: Banda no observada

+?: Posible banda muy tenue

+/-: Resultado inespecífico

CA: Con anticuerpo

SA: Sin anticuerpo

BSA: Albúmina de suero bovino

AuNP: nanopartículas de oro

1. Antecedentes

1.1 Generalidades del cultivo de banano variedad Cavendish Gran Enano (Musa sp.)

El cultivo de banano es uno de los más importantes a nivel mundial, este ocupa el cuarto lugar después del arroz, maíz y trigo, cultivado principalmente en América y Asia (Vargas-Céspedes et al., 2017). Gracias a sus tierras aptas para los cultivos y condiciones climáticas, Latinoamérica ha jugado un papel vital en suplir la demanda mundial, al constituir una de las regiones más importantes de cultivo de banano (Altendorf, 2019a). Actualmente, Ecuador, Costa Rica y Colombia son los principales países productores de banano en Latinoamérica (Gómez-Quintero, 1995).

La variedad de banano Cavendish Gran Enano es la que se cultiva mayoritariamente para el comercio, la cual tiene características de importancia como ser resistente a las razas 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* (Augstburger et al., 2001), tener un mejor rendimiento y un racimo más largo (Daniells, 1993). Además, en comparación con el banano Gros Michael, el Cavendish Gran Enano tiene una productividad mayor de hasta 60 ton/ha, y su tamaño, sistema foliar y enraizamiento la hacen menos susceptible a volcarse por vientos (Martínez & Hoyos, 2012).

1.2 Virus en plantas

Los virus en plantas fueron descubiertos en el siglo XIX en plantas de tabaco, en las cuales se sospechó la existencia de un agente infeccioso causando los síntomas de la planta (Stanier & Villanueva, 1996). En 1898, Martinus Willem Beijerinck describió a los "virus" como los causantes de la enfermedad del "mosaico del tabaco" y no los microbios como se pensaba anteriormente; también destacó que las plantas de tabaco eran muy susceptibles a la enfermedad, ya que una sola gota del "filtrado con virus" podía infectar numeroras hojas y ramas (Beijerinck, 1898).

A partir de ese momento se han descrito cientos de virus en plantas, los cuales al ser parásitos intracelulares dependen de la maquinaria celular del hospedero para replicarse (Ceccotti et al., 2007). Estos infectan a su hospedero por medio de partículas virales (viriones) que se encuentran constituidas por genomas de una o más cadenas de ARN o ADN y proteínas que forman la cápside (Van Regenmortel & Mahy, 2009). Estos viriones penetran en la célula a través de la membrana plasmática y pueden entrar por heridas o vectores como insectos (Angeles-Alyllón et al., 2016).

1.3 Virus en el cultivo de banano (*Musa* sp.)

Hasta el momento solamente se conocen cinco virus que afectan al banano: CMV, BBTV, BSV, BanMMV y BBrMV (Rybicki & Pietersent, 1999; Lockhart, 2002). Estos virus se transmiten gracias a la propagación del material clonal en la siembra del cultivo de banano o por medio de vectores como insectos (Selvarajan et al., 2008; Lava-Kumar et al., 2015). Estos virus tienen una incidencia directa en el crecimiento de las plantas y en su productividad, dependiendo de qué tan severa es la infección (Lockhart, 2002).

1.4 Virus de importancia para el cultivo del banano (Musa sp.) en Costa Rica

1.4.1 Banana bunchy top virus: Distribución geográfica, síntomas y características moleculares

El BBTV ha tenido afectación principalmente en los continentes de África, Oceanía y Asia (Lava-Kumar et al., 2015). Aunque es endémico del sureste de Asia, la primera vez que se reportó fue en 1889 en Fiji y se extendió a otras regiones cercanas, posiblemente debido a la exportación del material infectado (Amin et al., 2008). En el continente

americano y las islas del Caribe aún no se encuentra presente (Drew, Moisander, & Smith, 1989), pero se encuentra en casi todas las regiones productoras de banano, afectando más de 33 países como Taiwán, Filipinas e Islas del Pacífico Sur (Mansoor et al., 2005; Mikwamba et al., 2019).

El BBTV se transmite por el áfido del banano *Pentalonia nigronervosa* o por materiales de siembra infectados (Das & Banerjee, 2018). Al inicio de la infección, el principal síntoma diagnóstico es la presencia de unas rayas verde oscuro en la nervadura central y el peciolo (CTHAR, 1997). Más adelante se desarrolla una clorosis en los márgenes de las hojas y se reduce el crecimiento (Manzo-Sánchez, Ciencias, & Colima, 2016). También se observa el fruncimiento de las hojas terminales, apariencia de los peciolos de roseta, los márgenes de hojas aparecen amarillos y ondulados, y además las plantas que se infectan jóvenes no producen fruto (Conant, 1992).

El BBTV es un virus perteneciente a la familia *Nanoviridae* y al género *Babuvirus* (Stainton et al., 2015), con un genoma de ADNhs (Rybicki, 2015) y con partículas de 18-20nm (Dale et al., 1993). Su genoma está conformado por 6 componentes circulares de ADNhs de 1.1kb (Das & Banerjee, 2018), denominados: ADN-R, ADN-U3, ADN-S, ADN-M, ADN-C, y ADN -N, los cuales codifican por proteínas de componentes de la cápside, de movimiento y de replicación (Stainton et al., 2015).

1.4.2 Banana streak virus: Distribución geográfica, síntomas y características moleculares

La primera vez que se observó el BSV fue en Costa de Marfil en 1958 (Dahal et al., 1998), a partir de ese momento se ha expandido a todos los continentes (Lockhart, 1995) en regiones de África, Asia, Oceanía, Europa, Centroamérica y Suramérica, Islas del Pacífico (Harper et al., 2002). En América se ha reportado en Honduras, Cuba, Ecuador y Costa Rica (Ramírez & Rivera, 1998; Javer-Higginson et al., 2014; Iskra-Caruana et al., 2014).

El BSV es transmitido por la cochinilla *Planococcus citri* y otras especies asociadas o por material de siembra infectado (Iskra-Caruana et al., 2014). Algunos síntomas que produce este virus son rayas necróticas y cloróticas a lo largo de la lámina de la hoja y partición del peciolo (James et al., 2011). Además, se ha reportado reducción en el tamaño del racimo, malformación de los bananos en el racimo y disminución de la calidad de la fruta en general (Lockhart, 1995).

En los últimos años este virus ha cobrado importancia debido a que se han visto plantaciones infectadas espontáneamente, las cuales se consideraban libres de virus. Existen entonces dos formas de contraer el virus, la transmisión por las cochinillas y la endógena (Lava-Kumar et al., 2015). Esta forma endógena de contraer el virus se debe a secuencias endógenas virales, las cuales se activan y propagan el virus por los tejidos de la planta (Gayral et al., 2008; Delanoy et al., 2003).

Entre los tipos de BSV, se puede distinguir el BSV-OL que afecta principalmente al grupo *Musa* AAB (Subgrupo plátano, cv. Hartón Gigante). Este tiene una secuencia viral integrada, que se distingue por tener el genoma del virus completo pero reorganizado con un modelo de activación episomal en plantas, que tienen integradas secuencias de BSV en el genoma (Harper et al., 2005). El BSV-OL afecta principalmente cultivos en Centroamérica y Sudamérica (Idan & Koc, 2019). El otro tipo es el BSV-Cav, el cual afecta principalmente a la variedad de banano Cavendish (*Musa* AAA) y se encuentra en Europa (Daniells et al., 2001; Idan & Koc, 2019).

El BSV es un pararetrovirus del género *Badnavirus* y de la familia *Caulimoviridae*, que tiene un ADNhd circular de 7.2 a 7.8kb (Iskra-Caruana et al., 2014). Las partículas virales son baciliformes de aproximadamente 120-150 x 30 nm (Kenyon et al., 2003). Con respecto al genoma, este tiene tres marcos de lectura abiertos (ORFs). El ORF1 codifica proteínas asociadas a las partículas virales, el ORF2 codifica proteínas para el ensamblaje de las partículas virales y el ORF3 tiene dominios que se asocian con funciones como movimiento, transcriptasa reversa y ribonucleasa H (Tripathi et al., 2019).

1.4.3 *Cucumber mosaic virus*: Distribución geográfica, síntomas y características moleculares

El CMV es uno de los principales virus que afectan los cultivos del banano en Oceanía, Asia, África y América (Dheepa & Paranjothi, 2010). En Latinoamérica se ha reportado desde la década de los 1930s en países como Argentina, en algunos sitios de la provincia de Formosa. En el cual hace dos años, el CMV era el único virus reportado para los cultivos de *Musa* sp. de la zona (Mederos et al 2018; Singh et al., 1995).

El CMV fue descubierto hace más de un siglo (Doolittle, 1916) y tiene como vectores de transmisión a los áfidos *Aphis gossypii* y *Aphis craccivora*, que atacan al banano de una manera devastadora (Dheepa & Paranjothi, 2010). Entre los síntomas visibles de la enfermedad del CMV se destacan hojas con rayas amarillas y patrones de mosaico, márgenes de las hojas enrrollados, clorosis, pudrimiento de hojas del corazón y centro del pseudotallo (Singh et al., 1995). También se ha visto un retraso en el crecimiento y bajos rendimientos (Magnaye & Valmayor, 1995).

El CMV es un virus de la familia *Bromoviridae* y del género *Cucumovirus* (Roossinck Roossinck, 2002; Peng et al., 2012). Las partículas virales del CMV tienen un

genoma de 7.5kb (Manzo-Sánchez, Ciencias, & Colima, 2016), con un ARNhs con sentido positivo que posee 3 moléculas de ARN y una de ARN subgenómico, que son utilizados para diseñar los imprimadores para el PCR (Palukaitis et al., 1992). Estos 3 ARNs codifican una serie de proteínas: el ARN1 y 2 codifican proteínas de duplicación, y el ARN3 codifica las proteínas de movimiento y de la cápside (Tzean et al., 2019).

1.5 Técnicas Moleculares para la detección de virus en plantas de banano (Musa sp.)

Con el avance de la biología molecular, las técnicas moleculares para la detección de patógenos son cada vez más utilizadas en el área agrícola, especialmente para la detección de virus (Persley, 2012). Los métodos utilizados comprenden métodos como microscopía electrónica y métodos serológicos como ELISA, ambos menos efectivos cuando la carga viral es baja (Tatsuji et al., 1994). También hay métodos basados en ácidos nucleicos como PCR, los cuales son más efectivos en la detección (Arumugam et al., 2017).

Los tres virus en banano descritos ya han sido detectados por PCR en otros trabajos. Por ejemplo, el BBTV se ha detectado por PCR en tiempo real, siendo un método sensible y confiable, capaz de monitorear la carga viral del virus en plantas (Furuya et al., 2004; Tanuja et al., 2019). Por medio de PCR se han logrado detectar los dos grupos principales de BBTV, el grupo Indo-Pacífico (PIO) y el grupo Sur-Este Asiático (SEA) en plantas infectadas con el virus para determinar el origen de la variante, por medio de la construcción de imprimadores específicos (Wickramaarachchi et al., 2016).

Kouassi et al. (2010) detectaron satisfactoriamente el CMV es un 97 % de las muestras recolectadas de plantas infectadas, usando imprimadores específicos para el gen de la proteína de la cápside, considerando RT-PCR como un método confiable para la detección del virus, el cual se planeaba establecer en laboratorios fitopatológicos en África. Para el BSV, la detección por medio de PCR también demostró ser efectiva (Lockhart, 2002), utilizando imprimadores como Badna T y Badna 2, para poder diferenciar satisfactoriamente entre distintas variantes del virus en plantas infectadas (Lheureux, 2007).

2. Justificación

2.1 Importancia económica del cultivo de banano en Costa Rica

Costa Rica se ha catalogado como uno de los mejores y principales productores de banano internacionalmente, con una productividad de 2,325 cajas/ha y que ha logrado un área de producción de 430 km², con una producción de más 100 millones de cajas anuales (Vargas-Céspedes et al., 2017). Anualmente se generan entre 650 y 700 millones de dólares, dándole una importancia y privilegio a la siembra de banano en el ámbito agrícola nacional, pues es un motor de desarrollo económico y social al representar el 2,2 % del producto interno bruto (CORBANA, 2011).

2.2 Problemas fitosanitarios del cultivo de banano

Los problemas fitosanitarios principales que enfrentan los cultivos de banano, son los agentes causales de enfermedades por hongos como la Sigatoka negra y amarilla *Pseudocercospora fijensis* (Rivas & Rosales, 2003) y *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense (Leiva-Mora, 2006). Las bacterias como *Ralstonia solanacearum* raza 2 y *Dickeya chrysanthemi*, y los virus como el *Banana bunchy top virus* y *Banana streak virus*, causan grandes pérdidas anuales económicas para los agricultores (Álvarez et al., 2015). Mundialmente las pérdidas económicas por *F. oxysporum* f.sp.cubense raza 4 van de los \$121 millones a los \$253 en Indonesia y Taiwán (Altendorf, 2019b). Por otro lado, *P. fijensis* ha generado pérdidas de rendimiento del 50 % en México (Mendoza & Fernando, 2017).

2.3 Pérdidas económicas debido a virus en plantas de banano (Musa sp.)

El BBTV ha causado severos problemas en distintas regiones del mundo. Australia ha tenido inconvenientes con este virus, el cual causó que el área de cultivo del banano se redujera en un 90 % en South Wales (Patil, 2020). La producción bajó de 460,000 cajuelas a 140,000 cajuelas, gracias a una única fuente de introducción de material infectado desde la región de Fiji, en la década de los 20s-30s (Dale, 1987). En Queensland, el área cultivada disminuyó un 95 % (Patil, 2020) y se afectaron 112 plantaciones, 506 ha inicialmente y luego el patógeno se extendió, llegando a afectar 2023 ha en la década de los 1920s (Dale, 1987).

En la región de Tamil Nadu el área cultivada pasó de 18,000 a 2,000 ha debido al BBTV, con una incidencia del 14-72 % (Selvarajan et al., 2011). En Fiji, donde fue reportado por primera vez, se contabilizó una disminución de la producción pasando de 778,000 a 114,000 racimos de banano (Smith et al., 1998). En los 1990s el BBTV devastó un 55 % de los cultivos en Pakistán (Valencia-Morales, 2016). Por lo que resulta importante el control preventivo y descartar casos sospechosos para evitar la devastación completa de los cultivos.

El BSV también ha causado pérdidas económicas alrededor del mundo. África tuvo pérdidas mayores al 90 % en cultivos de banano (Harper et al., 2002), además de una disminución del 29 % en el peso del racimo de banano (Kenyon et al., 2003). En Ecuador más de 112 ha han sido afectadas, con la pérdida de 124,788 plantas que fueron diagnosticadas con el virus (Susan-Tepletlan et al., 2016). En este país también se ha reportado una reducción de hasta 35 % en la productividad del cultivo (Villegas-Estrada et al., 2011).

2.4 Virus en plantas de banano en Costa Rica

En Costa Rica de los virus BBTV, CMV y BSV solamente los últimos dos se encuentran en el país actualmente. Los primeros reportes del CMV se dan en 1986, en plantas de cultivos comerciales de banano, que comenzaron a expresar los síntomas típicos del virus. Posteriormente CORBANA en conjunto con la UCR, llevó a cabo un proyecto para caracterizar el CMV a nivel molecular, ya para ese momento solamente existía este virus en este cultivo en el país (Rivera et al., 1992).

El BSV fue el segundo virus en estar presente en el país en el cultivo de banano. Inicialmente se tenía la sospecha de su introducción, por algunos signos típicos en las plantas de banano, pero no fue hasta 1994 que por métodos diagnósticos específicos se determinó que era BSV (Ramírez & Rivera, 1998). Este virus ha causado severos problemas en cultivos de Cavendish en el país, dejándolos inservibles para su comercialización (Susan-Tepletlan et al., 2016).

Se han realizado esfuerzos por parte del CIBCM en la UCR, para la detección del BSV en plantas de banano. Por otra parte, el MAG emitió un estado, con respecto al BSV, en el cual se sugería eliminar cualquier material sospechoso infectado, establecer evaluaciones de rutina para los materiales y las plantas madre utilizando métodos específicos de detección, entre otros (Ramírez & Rivera, 1998).

2.5 Manejo de virus en plantaciones de banano (Musa sp.)

El manejo de virus en plantas resulta complicado por su tamaño y su condición de parásito (González-Garza, 2017). La manera más efectiva de control es prevenir o retrasar la infección en el cultivo (Persley, 2012). Esto se puede lograr regulando el movimiento de plantas infectadas gracias al establecimiento de cuarentena, y además es importante

establecer la misma medida para los materiales de plantación e implementos usados (Tripathi et al., 2016). Cuando la enfermedad ya se encuentra en las plantaciones, la mejor manera de control es la erradicación de las plantas infectadas y las aledañas (Viejó-Barzola, 2020).

2.6 Importancia de PCR para la detección de virus en plantas

Para que estas medidas resulten en un mejor manejo del virus, se tienen que complementar con una detección temprana por PCR para asegurarse de remover tempranamente las plantas que efectivamente estén contaminadas o de que el material plantado se encuentre libre del virus (Mocha-Cuenca, 2018). Además, las plantas infectadas con el virus pueden ser asintomáticas por periodos de hasta 1 mes y la forma más eficiente y económica de poder detectarlas es por medio de PCR (Lava-Kumar et al., 2015).

Los métodos de diagnóstico por síntomas no son confiables, pues hay virus que causan síntomas visibles parecidos como clorosis y arrugamiento de las hojas. También el estrés abiótico u otros patógenos pueden estar causando síntomas similares (Kumar, 2020). Otras técnicas convencionales como el cultivo del virus en plantas indicadoras, presentan desventajas en comparación con PCR porque se necesita aislar el virus, y son métodos laboriosos que tardan mucho más en confirmar la enfermedad (Benavides-López, 2019).

La técnica de PCR permite también distinguir entre distintas variantes virulentas, al diseñar imprimadores específicos y amplificar satisfactoriamente fragmentos de plantas infectadas sintomáticas o asintomáticas, con muestras diluidas. Además, se pueden cuantificar las concentraciones virales de las plantas infectadas para determinar el estado de la enfermedad (Hu et al., 1995).

26

En general, la cuantificación y detección molecular de estos tres virus en plantas de *Musa* sp. conferiría una ventaja a CORBANA. Este sería el segundo laboratorio a nivel nacional en implementar la detección de virus pues al momento presente, solo el CIBCM ofrece este servicio. Esto permetiría con facilidad descartar casos sospechosos en el país de CMV, BSV y principalmente el BBTV que es el más peligroso en el momento por no encontrarse en el país.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Estandarizar el servicio de detección de tres virus que afectan la planta de banano (*Musa* sp.): *Banana bunchy top virus, Banana streak virus y Cucumber mosaic virus* en el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA).

3.2 Objetivos especificos

- Seleccionar de la bibliografía reciente (2015-2020) las principales metodologías existentes para la detección de *Banana bunchy top virus*, *Banana streak virus y Cucumber mosaic virus*.
- Determinar un proveedor de los controles positivos Banana bunchy top virus, Banana streak virus y Cucumber mosaic virus, para la estandarización de las metodologías seleccionadas y para tener acceso a un stock de controles positivos para el servicio de detección de los virus.
- Estandarizar las metodologías seleccionadas para la detección de *Banana* bunchy top virus, Banana streak virus y Cucumber mosaic virus.

 Documentar el protocolo de detección de *Banana bunchy top virus, Banana* streak virus y Cucumber mosaic virus bajo las condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA.

4. Materiales y Métodos

4.1 Revisión de Bibliografía

Se realizó una revisión bibliográfica, de documentos con las principales metodologías para la detección del BBTV, BSV y CMV principalmente entre 2015-2021.

4.2 Controles positivos utilizados en la investigación

Todos los controles positivos (BBTV, BSV y CMV) los tenía con anterioridad el laboratorio de Biología Molecular, obtenidos por medio de la Dra. Kathy Crew en un convenio realizado entre 2018-2019. Estos controles eran un pedazo de hoja de banano liofilizada con síntomas del respectivo virus, provenientes de un invernadero de plantas tropicales en Australia.

Además, el control positivo para la variedad BSV-MY también se obtuvo de hojas de plantas de banano con síntomas variedad Mysore sembradas en la parcela experimental en el complejo del Centro de Investigaciones CORBANA, La Rita, Guápiles. Así mismo hubo un control positivo de BSV General, el cual provenía de hojas de una planta de banano con síntomas igualmente sembrada en la parcela experimental, la cual se tenía confirmación de la presencia del virus, pero se desconocía la variedad de BSV. También se contaba con un control sintético BSV+ solamente para el paso de PCR.

Para CMV también se uso otro control positivo, el cual era un extracto crudo de hoja, que traía el kit "Kit ELISA CMV (CAB 44501)" el cual es de la casa comercial Agdia. Este kit lo mando a pedir el laboratorio de Biología Molecular CORBANA en el año 2017. También se tenía un posible control positivo, el cual provenía de una hoja con síntomas de la variedad de banano Calcuta 4, la cual se obtuvo en un recorrido para recolectar muestras en las parcelas experimentales del Centro de Investigaciones, CORBANA, La Rita, donde asistieron Msc. Ana María Conejo, Msc. Mauricio Guzmán y mi persona.

4.3 Metodologías y detección de los virus estudiados

4.3.1 Detección Banana bunchy top virus

Para la metodología se utilizó el par de imprimadores BBTVF1/BBTVR1 mandados a sintetizar a Macrogen Inc. (Corea del Sur). El peso molecular de la secuencia amplificada y su secuencia se pueden observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Imprimadores específicos utilizados para la detección molecular de BBTV.

Imprimador	Secuencia	Tamaño molecular esperado (pb)
BBTVF1	5'-ACCAGCCGACTACATGTCTG-3'	155
BBTVR1	5'-TCCTCAACACGGTTGTCTTC-3'	

4.3.1.1 Metodología modificada 1, autores originales CORBANA (Extracción ADN) y Chen & Hu, 2013 (PCR)

a. Extracción de ADN (CORBANA)

 Colocar toda la muestra liofilizada disponible (> 0.5 g) en un tubo Eppendorf de 2 ml junto con 4 minibalines, y macerar a una frecuencia de 20 por 1:15 min, luego junto con 2 ml del tampón extractor. Volver a poner en el macerador por 30 seg. Recuperar 1 ml del macerado en otro tubo Eppendorf de 1.5 ml, agregar 7 μ l β -mercaptoetanol y máxima agitación (abrir los tubos luego del vortex para liberar presión).

2. Incubar por 25 min a 65 °C y agitar cada 10 min.

3. Centrifugar 5000 rpm por 10 min.

4. Recuperar 1000 μ l en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml, agregar 400 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, máxima agitación e incubar por 2 min en el congelador a -20 °C. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y recuperar 800 μ l en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml.

5. Agregar nuevamente 400 μ l de de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, máxima agitación e incubar por 2 min en el congelador a -20 °C. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y recuperar 600 μ l en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml.

6. Agregar 400 μl de la solución PEG 30%, más 200 μl de NaCl 5M. Mezclar y dejar precipitando toda la noche a 4°C.

7. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min, decantar el sobrenadante, agregar 200 μ l de etanol al 70%, agitar y centrifugar nuevamente a 13000 rpm por 5 min. Decantar el sobrenadante, agregar nuevamente 200 μ l de etanol al 70%, repitir el paso anterior. Luego se dejar secar los tubos abiertos en bloque térmico a 37 °C por 40 min.

8. Resuspender el ADN en H_2O filtrada y autoclavada, en 100 µl de acuerdo con el tamaño del botón, incubar 5 min a 37 °C y resuspender.

9. Determinar la concentración y pureza del ADN mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Realizar las reacciones de amplificación en un volumen total de 20 μ l, con las condiciones del Cuadro 2. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient) o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en el Cuadro 2. Analizar 2 μ l de los productos de PCR junto con 0.7 μ l del tinte GelRed, mediante un gel de agarosa 1 % (p/v) y observar bajo el transiluminador Uvitec Cambridge.

Cuadro 2. Condiciones de la mezcla 1 de PCR y del termociclador para la detección de BBTV (Chen & Hu, 2013).

Reactivo	Concentración final	Volumen (µl)	Temperatura (°C)	Tiempo	
H ₂ O para PCR	-	6.75	95	7 min	
Tampón Polimerasa (5	1x	5	95		
X)				15 s]	40 ciclos
MgCl ₂ (25 mM)	2.5mM	2	58	30 s ∫	
dNTPs (10 mM)	1mM	2	72	30 s	
BBTV-F1 (10 uM)	1mM	1			
BBTV-R1 (10 uM)	1mM	1			
BSA (1 % p/v)	-	1			
Taq Polimerasa (5 U/ µl)	1 U/ μl	0.25			
ADN	20ng	1			
Volumen total		20	-		

* Las condiciones de la mezcla 2 de PCR detección de BBTV (Chen & Hu, 2013) fueron las mismas de la mezcla 1, menos el BSA (Su volumen fue agregado al volumen del agua para un total de 7.75 μl). Se utilizaron las mismas condiciones del termociclador que en la mezcla 1

4.3.2 Detección Banana streak virus

Para la metodología se utilizaron los pares de imprimadores BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 y BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 mandados a sintetizar a Macrogen Inc. (Corea del Sur). El peso molecular de la secuencia amplificada y su secuencia se pueden observar en el cuadro 3.

Imprimador	Secuencia	Tamaño molecular esperado (pb)
BSV-OL-RD-F1	5'-ATCTGAAGGTGTGTTGATCAATGC-3'	522
BSV-OL-RD-R1	5'-GCTCACTCCGCATCTTATCAGTC-3	
BSV-OL-GF-F1	5'-ACGAACTATCACGACTTGTTCAAGC- 3'	476
BSV-OL-GF-R1	5'-ACGAACTATCACGACTTGTTCAAGC- 3'	770
BSV-MY-F1	5'-TAAAAGCACAGCTCAGAACAAACC- 3'	589
BSV-MY-R1	5'-CTCCGTGATTTCTTCGTGGTC-3'	

Cuadro 3. Imprimadores específicos utilizados para la detección molecular de BSV.

4.3.2.1 Metodología modificada 1, autores originales CATIE

a. Inmunocaptura

1. Sensibilización: Realizar la dilución 1:200 indicada del anticuerpo (BSMYV IgG) en el tampón sensibilización (Na₂CO₃ [1X] y NaHCO₃ [1X], pH 9.6) y colocar 25 μ l en cada tubo de PCR (0.5 μ l). Dejar incubando a 4 °C toda la noche.

2. Primer lavado: Retirar el tampón de sensibilización de los tubos de PCR (0.5 μl) y colocar 30 μl del tampón de lavado (PBS [KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl 137 mM, KCl 2.7mM y NaN₃ 3mM] (1X) y Tween 20, pH 7.4) en cada tubo. Dejar por 3 min a TA y repitir el lavado dos veces más.

3. Colocación de las muestras: Macerar las muestras de banano en una dilución 1/10 (p/v) con el tampón de macerado (PBS Tween, 2 % PVP-40 y 1 % Albúmina de leche) y colocar 25 μ l de la muestra macerada los tubos respectivos. Dejar incubando a 4 °C toda la noche. *Los ensayos sin anticuerpo comienzan en este paso*.

4. Segundo lavado: Retirar las muestras maceradas de los tubos y colocar 30 μl del tampón de lavado en cada tubo, desechar el tampón inmediatamente y repetir este paso hasta que se observara el tubo como nuevo. Colocar el tampón de lavado nuevamente y dejar por 3 min a TA y repetir esto dos veces más.

b. PCR

Hacer una mezcla con los componentes respectivos para cada variante, con las condiciones que aparecen en el Cuadro 4. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient) o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en el Cuadro 4. Analizar 2 μ l de los productos de PCR junto con 0.7 μ l del tinte GelRed, mediante un gel de agarosa 1 % (p/v) y observar bajo el transiluminador Uvitec Cambridge.

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Temperatura	Tiempo	
	Final		°C		
H ₂ O para PCR	-	15.4	95	1min	
Tampón Polimerasa (5 X)	1X	5	95	30sec	
MgCl ₂ (25 mM)	2.5mM	2.5	52	1min	30 ciclos
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.5	72	1min	50 010105
BSV-MY-F1/BSV-OL-	0.3mM	0.75		J	
RD-F1/BSV-OL-GF-F1					
(10 uM)			72	5min	
BSV-MY-R1/BSV-OL-	0.3mM	0.75			
RD-R1/BSV-OL-GF-R1					
(10 uM)			10	for ever	
Taq Polimerasa (5 U/ μl)	0.02 U/ µl	0.1			
Volumen total		25			

Cuadro 4. Condiciones de la mezcla 1 de PCR y del termociclador para la detección de BSV (CATIE).

* Las condiciones de la mezcla 2 de PCR para la detección de BSV (CATIE) fueron las mismas de la mezcla 1, modificando el volumen utilizado de los dNTPs siendo 1 μ l (Su volumen fue agregado al volumen del agua para un total de 14.75 μ l). Se utilizaron las mismas condiciones del termociclador que en la mezcla 1

4.3.3 Detección Cucumber mosaic virus

Para las dos metodologías se utilizaron los pares de imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV y CMV-F/CMV-R mandados a sintetizar a Macrogen Inc. (Corea del Sur). El peso molecular de la secuencia amplificada y su secuencia se observan en el cuadro 5.

Imprimador	Secuencia	Tamaño molecular esperado (pb)
CP-CMV-RE	5'-GCTGGATGGACAACCCGTTC-3'	900
CP-CMV	5'-CTTTYTCATGGATGCTTCTC-3'	
CMV-F	5'-TATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCA-3'	500
CMV-R	5'-TTTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCC-3'	

Cuadro 5. Imprimadores específicos utilizados para la detección molecular de CMV.

4.3.3.1 Metodología modificada 1, autores originales CATIE y Musanet/ Biodiversity international.

a. Inmunocaptura (CATIE)

1. Sensibilización: Realizar la dilución 1:200 indicada del anticuerpo en el tampón sensibilización y colocar 25 μ l en cada tubo de PCR (0.5 μ l). Dejar incubando a 4 °C toda la noche.

2. Primer lavado: Retirar el tampón de sensibilización de los tubos de PCR $(0.5 \ \mu l)$ y colocar 30 μl del tampón de lavado en cada tubo. Dejar por 3 min a TA y repetir el lavado dos veces más.

3. Colocación de las muestras: Macerar las muestras de banano en una dilución 1/10 (p/v) con el tampón de macerado y colocar 25 μ l de la muestra macerada los tubos respectivos. Dejar incubando a 4 °C toda la noche.

4. Segundo lavado: En este paso mantener los tubos en un bloque térmico, retirar las muestras maceradas de los tubos y colocar 30 μl del tampón de lavado en cada tubo, desechar
el tampón inmediatamente y repetir este paso hasta que se observara el tubo como nuevo. Colocar el tampón de lavado nuevamente, dejar por 3 min a TA y repetir esto dos veces más.

b. RT-PCR (CATIE/ Musanet Biodiversity International)

1. Desnaturalización: Hacer una mezcla con los componentes mencionados en los Cuadros

6 y 7. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient)

o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en los Cuadros 6 y 7.

Cuadro 6. Condiciones de la mezcla 1 y del termociclador para el paso de desnaturalización para la detección de CMV (CATIE).

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Temperatura	Tiempo
	Final		°C	
H ₂ O para PCR	-	8	95	5 min
CP-CMV-RE (10	2 µM	2	10	5 min
μΜ)				
Volumen total		10		

Cuadro 7. Condiciones de la mezcla 2 y del termociclador para el paso de desnaturalización para la detección de CMV (Musanet Biodiversity International).

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)	Temperatura °C	Tiempo
H ₂ O para PCR	-	11.75	80	10 min
CMV-R (20 µM)	1.2 μΜ	0.75		
Volumen total		12.5		

2. Transcripción reversa: Hacer una mezcla con los componentes mencionados en los Cuadros 8, 9 y 10. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient) o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en los Cuadros 8 y 10.

Cuadro 8.	Condiciones	de la mezcla	a 1.1 y del	termociclador	para el pas	o de transcripci	ón
reversa para	a la detección	n de CMV (C	ATIE)				

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Temperatura	Tiempo
	Final		°C	
H ₂ O para PCR	-	9	40	40min
Tampón transcripción	0.3X	5	95	5min
reversa (1X)				
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.25	10	5min
RNAsa OUT (10mM)	0.2mM	0.25		
MMLV (200 U/ µl)	7 U/ μl	0.5		
Volumen total		15		

Cuadro 9. Condiciones de la mezcla 1.2 para el paso de transcripción reversa para la detección de CMV (CATIE).

* Se utilizaron las mismas condiciones del termociclador que en la mezcla 1.1

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)
H ₂ O para PCR	-	8.25
Tampón transcripción reversa	0.3X	5
(1X)		
DTT (0.1 mM)	0.005mM	0.75
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.25
RNAsa OUT (10mM)	0.2mM	0.25
MMLV (200 U/ μl)	7 U/ μl	0.5
Volumen total		15

Cuadro 10. Condiciones de la mezcla 2 y del termociclador para el paso de transcripción reversa para la detección de CMV (Musanet Biodiversity International).

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Temperatura	Tiempo
	Final		°C	
Tampón transcripción	0.5X	4	50	45min
reversa (1X)				
DTT (0.1 mM)	0.03mM	2	7	15min
dNTPs (10 mM)	1.4mM	1		
RNAsa OUT (10mM)	0.3mM	0.25		
Superscript III (200 U/	7 U/ µl	0.25		
µl)				
Volumen total		7.5		

3. PCR: Hacer una mezcla con los componentes mencionados en los Cuadros 11 y 12. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient) o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en los Cuadros 11 y 12. Analizar 2 µl de los productos de PCR junto con 0.7 µl del tinte GelRed, mediante un gel de agarosa 1 % (p/v) y observar bajo el transiluminador Uvitec Cambridge.

Cuadro 11. Condiciones de la mezcla 1 y del termociclador para el paso de PCR para la detección de CMV (CATIE).

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)	Temperatura °C	Tiempo	_
Producto de la	-				
transcripción reversa		1	94	4 min	
H_2O para PCR	-	14.8	94	1 min	ן
Tampón Polimerasa (5	1X	5		30 s	
X)			57		
$MgCl_2(25 mM)$	2.5	2.5	72	1 min	J
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.5	72	10 min	
CP-CMV-RE (10 uM)	0.2mM	0.5	10	for ever	
CP-CMV (10 uM)	0.2mM	0.5			_
Taq Polimerasa (5 U/ µl)	0.04 U/ μl	0.2			
Volumen total	•	25			

Cuadro 12. Condiciones de la mezcla 2 y del termociclador para el paso de PCR para la detección de CMV (Musanet Biodiversity International)

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)	Temperatura °C	Tiempo	_
Producto de la	-				_
transcripción reversa		2	94	1 min	
H_2O para PCR	-	13.96	94	20 s)
Tampón Polimerasa (5	0.5X	2		20 s	35 cicle
- X)			60		
$MgCl_2(25 mM)$	0.89mM	0.7	72	40 s	J
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.4	94	1 min	
CMV-F (20 µM)	0.4mM	0.4			
CMV-R (20 µM)	0.34mM	0.34			
Taq Polimerasa (5 U/ µl)	0.04 U/ µl	0.2			
Volumen total	•	20			

4.3.3.2 Metodología modificada 2, autores originales CORBANA- Islas et al, 2006 (Extracción de ARN) y CATIE (PCR)

a. Extracción de ARN (CORBANA- Islas et al., 2006)

- 1. Pesar 0.024 g del material liofilizado y en un tubo Eppendorf de 2 ml junto con 4 minibalines y macerar a una frecuencia de 20 por 2 min.
- 2. Homogenizar con 500 μl de Trizol, luego transferir el macerado a un tubo de 1.5 ml para remover los balines de la solución.
- 3. Incubar por 5 min a 25 °C en bloque térmico.
- 4. Adicionar 100 µl de cloroformo
- 5. Agitar manualmente por 15 seg.
- 6. Incubar por 5 min a TA.
- 7. Centrifugar por 15 min a 13000 rpm.
- 8. Remover el sobrenadante e incorporar 0.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 9. Transferir a una columna de centrifugación RNeasy spin y centrifugar a 10000 rpm

por 15 seg (descartar el filtrado).

- 10. Lavar la columna con 700 µl del tampón RPE.
- 11. Centrifugar a 10000 rpm por 15 seg (descartar el filtrado).
- 12. Adicionar a la columna 500 µl del tampón RPE.
- 13. Centrifugar a 10000 rpm por 15 seg (descartar el filtrado).
- 14. Adicionar a la columna 500 μl del tampón RPE.
- 15. Centrifugar a 10000 rpm por 2 min (descartar el filtrado).

16. Realizar una tercera centrifugación a 8000 rpm por 2 min para eliminar posible tampón remanente.

17. Transferir cuidadosamente la columna a otro tubo de recolección.

18. Adicionar 15 µl de agua libre de RNasa e incubar 5 min a TA.

19. Determinar concentración y pureza mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000c

(Thermo Scientific).

b. RT- PCR (CATIE)

Desnaturalización: Hacer una mezcla con los componentes mencionados en el Cuadro 13.
 Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient) o
 Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Condiciones de la mezcla y del termociclador para el paso de desnaturalización para la detección de CMV (CATIE).

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)	Temperatura °C	Tiempo
H ₂ O para PCR	-	5	95	5 min
CP-CMV-RE (10	2 µM	2	10	5 min
μΜ)				
ARN	10ng	3		
Volumen total		10		

2. Transcripción reversa: Hacer una mezcla con los componentes mencionados en el Cuadro
14. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient)
o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en el Cuadro 14.

Cuadro	14.	Condici	ones	de la	mezcla	y del	termociclador	para	el pas	so de	transcripci	ión
reversa	para	la detect	ción d	le CM	V (CAT	TE).						

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Temperatura	Tiempo
	Final		°C	
H ₂ O para PCR	-	8.25	40	40 min
Tampón transcripción	0.3X	5	95	5 min
reversa (1X)				
DTT (0.1 mM)	0.005mM	0.75	10	5 min
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.25		
RNAsa OUT (10mM)	0.2mM	0.25		
MMLV (200 U/ µl)	7 U/ μl	0.5		
Volumen total		15		

3. PCR: Hacer una mezcla con los componentes mencionados en el Cuadro 15. Las condiciones del termociclador (Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus gradient) o Applied Biosystems (Gen Amp 9700)) son las que aparecen en el Cuadro 15. Analizar 2 μ l de los productos de PCR junto con 0.7 μ l del tinte GelRed, un gel de agarosa 1 % (p/v) y observar bajo el transiluminador Uvitec Cambridge.

Cuadro 15. Condiciones de la mezcla y del termociclador para el paso de PCR para la detección de CMV (CATIE).

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)	Temperatura °C	Tiempo
Producto de la	-			
transcripción reversa		1	94	4 min
H_2O para PCR	-	14.8	94	ן 1 min
Tampón Polimerasa (5 X)	1X	5	57	30 s
$MgCl_2(25 mM)$	2.5mM	2.5	72	1 min
dNTPs (10 mM)	0.2mM	0.5	72	10 min
CP-CMV-RE (10 uM)	0.2mM	0.5	10	for ever
CP-CMV (10 uM)	0.2mM	0.5		
Taq Polimerasa (5 U/ μl)	0.04 U/ µl	0.2		
Volumen total	•	25		

30 ciclos

4.4 Diseño experimental

4.4.1 Banana bunchy top virus

Para todas las pruebas del diseño experimental se utilizó la misma muestra de ADN extraído de tejido liofilizado "BBTV Australia".

4.4.1.1 Condiciones de la mezcla PCR

Se realizaron dos mezclas de PCR una con BSA y otra sin BSA, así como dos controles negativos para cada una de las mezclas de PCR, todo bajo las mismas condiciones del termociclador, con solamente una réplica.

4.4.1.2 Sensibilidad

Para probar la sensibilidad de la metodología modificada 1 para BBTV utilizada se realizaron 7 diluciones seriadas (5 µl solución stock + 45 µl H₂O para PCR) partiendo de una solución stock de \approx 50 ng/ µl, así mismo se agregaron como controles una muestra de un control positivo "BSV+" y un control negativo de la mezcla de PCR. Las muestras fueron procesadas todo bajo las mismas condiciones del termociclador, con solamente una réplica.

4.4.2 Banana streak virus

Para todos los ensayos se realizó un único macerado del tejido junto con el tampón de extracción y este fue almacenado a 8 °C para sus posteriores usos, esto con las cinco muestras de controles positivos (BSV General CORBANA, BSV-MY CORBANA, BSV-MY Australia, BSV-OL Australia, BSV-GF Australia), así como las muestras de los controles negativos (Gold Finger, Red Dacca y Mysore). Cabe destacar que todos los ensayos se realizaron bajo las condiciones de la mezcla 1 de PCR para la detección de BSV (CATIE), a excepción de los siguientes ensayos en los cuales se realizaron bajo las condiciones de mezcla 2 de PCR: el ensayo sin anticuerpo para validar el control negativo de Red Dacca, utilizando como los controles positivos BSV-OL Australia y BSV+, así como los ensayos con y sin anticuerpo para validar el control negativo de la variedad Gold Finger, utilizando como los controles positivos BSV-OL Australia y BSV+.

4.4.2.1 Especificidad de los imprimadores utilizados

Se utilizaron tres pares de imprimadores específicos BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 y BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 para la determinar la especificidad en la detección de BSV-OL, BSV-GF y BSV-MY respectivamente. Estos imprimadores se utilizaron en cada una de las cinco muestras de macerado disponibles (BSV General CORBANA, BSV-MY CORBANA, BSV-MY Australia, BSV-OL Australia, BSV-GF Australia) y se realizaron tres réplicas por muestra. Los controles negativos de PCR se realizaron conforme a sus respectivos imprimadores de las mezclas de PCR, estos tuvieron una sola réplica.

Cabe destacar, que los productos de los IC-PCR en los tratamientos SA y CA, provenientes de las muestras BSV-GF Australia y BSV-OL Australia utilizando los imprimadores BSV-MY, así como BSV General CORBANA utilizando los imprimadores BSV-OL-GF y BSV-OL-RD y BSV-GF Australia utilizando los imprimadores BSV-OL-GF, se volvieron a visualizar en un gel con agarosa al 1% para poder observar las diferencias en la intensidad de las bandas dadas.

4.4.2.2 Controles negativos de las variedades de banano Gold Finger, Red Dacca y Mysore.

Los controles negativos provinieron de plántulas de banano libres de virus de las variedades Gold Finger, Red Dacca y Mysore. Estas plántulas fueron donadas por el laboratorio de cultivo *in vitro* de plantas de CORBANA. Los imprimadores utilizados para los IC-PCR fueron los mismos utilizados en los ensayos de especificidad (BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 y BSV-MY-F1/BSV-MY-R1). Las pruebas de los controles negativos se realizaron por triplicado, mientras los controles positivos utilizados (BSV- CORBANA General, BSV-OL Australia, BSV-GF Australia y BSV-MY Australia) tuvieron una/dos réplicas, y los controles negativos de sus respectivos PCRs tuvieron solamente una réplica.

4.4.3 Cucumber mosaic virus

Para todos los ensayos de IC-PCR se realizó un único macerado del tejido junto con el tampón de extracción y fue almacenado a 8 °C para sus posteriores usos, esto con las muestras CMV Australia y Calcula 4 CORBANA.

4.4.3.1 Condiciones de la mezcla de PCR

Para la metodología 1 modificada para IC-PCR, para la inmunocaptura se utilizó solamente el protocolo de CATIE con modificaciones, mientras que para las mezclas del RT-PCR se utilizaron dos autores. La mezcla 1 siguiendo el protocolo de CATIE con modificaciones y en el paso de transcripción reversa se probó una mezcla sin DTT y otra con DTT (Condiciones de la mezcla 1.1 y 1.2 de transcripción reversa). La mezcla 2 siguiendo el protocolo de Musanet Biodiversity International con sus respectivos imprimadores (CMVF/CMVR1, Bariana et al., 1994).

4.5 Materiales y casas comerciales/marcas

Material	Casa comercial/ Marca
Marcador molecular 100 pb	Thermo Fischer Scientific
Agarose TopVision	Thermo Fischer Scientific
Green Go Flexi Tampón + Gel Red	PROMEGA
dNTPs	Thermo Fischer Scientific
BSA	Thermo Fischer Scientific
Taq Polimerasa	PROMEGA
Anticuerpo BSMYV IgG	Agdia
Todos las sales reactivos	SIGMA
Kit ARN Plantas	Quiagen
Kit ELISA CMV (CAB 44501)	Agdia
Tubos PCR	Biologix
GoTaq Flexi Tampón	PROMEGA
$MgCl_2$	PROMEGA
Centrifuga	Mikro 200R Zentrifugen
Termocicladores	Eppendorf FlexiLid (Master Cycler nexus
	gradient) o Applied Biosystems (Gen Amp
	9700)
Máquina de vortex	Labnet International
Nanodrop 200c	Thermo Fischer Scientific
Micropipetas	Eppendorf Research o Coring Lambda
Vortex	Labrinet International
Puntas para micropipetas	Raining o Neptune
Transiluminador	Uvitec Cambridge
Cámaras de electroforesis	Fisherbiotech o Thermo Fischer Scientific

Cuadro 16. Materiales utilizados para la detección de BBTV, BSV y CMV en plantas de banano (*Musa* sp.).

4.6 Labores extracurriculares del proyecto de virus

Además del desarrollo del proyecto "Estandarización de la detección de los principales virus que afectan la planta de banano (*Musa* sp.): *Cucumber mosaic virus*, *Banana streak virus* y *Banana bunchy top virus*", en el transcurso de las 20 semanas prácticas en las instalaciones del laboratorio, se colaboró con labores intrínsecas del laboratorio, así como la ayuda a los encargados del laboratorio presentes.

5. Resultados

5.1 Banana bunchy top virus

5.1.1 Detección molecular

Para probar los imprimadores BBTVF1/BBTVR1 (Chen & Hu, 2013) se realizó la extracción de ADN de la muestra de tejido liofilizado según la metodología modificada 1 para BBTV, la extracción de ADN obtuvo una concentración de 493.3 ng/ μl y pureza 2.12.

Los resultados de la prueba de PCR para probar los imprimadores BBTVF1/ BBTVR1 (Chen & Hu, 2013) se observan en la Fig. 1, como se puede visualizar se obtuvo un producto de PCR con solo una banda para las condiciones 1 de la mezcla de PCR la cual no contenía BSA, mientras que se obtuvo un resultado inespecífico, dos bandas para las condiciones 2 de la mezcla de PCR, una de ellas la cual coincidía con el tamaño de banda esperado 155 pb (Cuadro 17). Los controles negativos de las dos condiciones de la mezcla de PCR no dieron amplificación.



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de PCR para la detección del BBTV utilizando los imprimadores específicos BBTVF1/BBTVR1 (Chen & Hu, 2013).

ID	Condiciones	Tipo de	BBTV
	mezcla PCR	muestra	(155 pb)
BBTV Australia	Mezcla 2	Tejido	+
		liofilizado	
Control negativo del	Mezcla 2	-	-
PCR			
BBTV Australia	Mezcla 1	Tejido	+/-
		liofilizado	
Control negativo del	Mezcla 1	-	-
PCR			
	ID BBTV Australia Control negativo del PCR BBTV Australia Control negativo del PCR	IDCondiciones mezcla PCRBBTV AustraliaMezcla 2Control negativo del PCRMezcla 2BBTV AustraliaMezcla 1Control negativo del PCRMezcla 1	IDCondiciones mezcla PCRTipo de muestraBBTV AustraliaMezcla 2Tejido liofilizadoControl negativo del PCRMezcla 2-BBTV AustraliaMezcla 1Tejido liofilizadoControl negativo del PCRMezcla 1Tejido liofilizadoControl negativo del PCRMezcla 1-BBTV AustraliaMezcla 1-PCRI-

Cuadro 17. Prueba para la detección de BBTV con los imprimadores BBTVF1/BBTVR1 según la metodología modificada 1 CORBANA y Chen & Hu (2013) al utilizar distintas condiciones en la mezcla de PCR.

Con respecto a la determinación de la sensibilidad de la metodología modificada 1 para BBTV utilizada por medio de diluciones seriadas para detectar la concentración mínima de ADN (ng/ μ l) (CORBANA & Chen & Hu, 2013), se observó que las primeras tres concentraciones dieron amplificación de una banda; sin embargo, no hubo una diferencia en la intensidad de la misma, la dilución en la concentración de \approx 0.005 ng/ μ l también dio amplificación de una banda con el tono similar, mientras que los controles negativos de BSV+ y el PCR no dieron amplificación como se esperaba (Cuadro 18, Fig. 2).

Carril	ID	Dilución	Tipo de	BBTV
			muestra	(155 pb)
1	BBTV	$pprox$ 50 ng/ μ l	Tejido	+
	Australia 50		liofilizado	
2	BBTV	\approx 5 ng/ μ l	Tejido	+
	Australia		liofilizado	
3	BBTV	$pprox$ 0.5 ng/ μ l	Tejido	+
	Australia		liofilizado	
4	BBTV	$pprox$ 0.05 ng/ μ l	Tejido	-
	Australia		liofilizado	
5	BBTV	$pprox 0.005$ ng/ μl	Tejido	+
	Australia		liofilizado	
6	BBTV	pprox 0.0005 ng/ µl	Tejido	-
	Australia		liofilizado	
7	Control	-	Tejido	-
	BSV+		liofilizado	
8	Control	-	Tejido	-
	negativo		liofilizado	
	PCR			

Cuadro 18. Prueba de sensibilidad de la concentración mínima de ADN diluido, con los imprimadores BBTVF1/BBTVR1 según la metodología modificada 1 CORBANA y Chen & Hu (2013).



Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de PCR de diluciones seriadas para la detección del BBTV utilizando los imprimadores específicos BBTVF1/BBTVR1 (Chen & Hu, 2013).

5.1.2 Revisión bibliografíca

Autor	Técnica	Imprimador	Secuencia	Tamaño molecular
Kumar	Ensavo de	Sonda	5'-tiol-C6)	-
(2017)	sonda AuNP	Donda	CACGCTATGAAAT	
(2017)	Solida / Iai (I		ACAAGACGC-3'	
Kumar.	PCR	BBT2.2F	5'-	500
(2017)			GCTAGGTATCCGA	
			AGAAATCC 3'	
		BBT2.2R	5'-	
			ATAAAGCTTTCAA	
			ACATGATATGT 3	
Lestari &		CP1/F	5'-	1083
Hidayat			CCCGGGAGAATAC	
(2020)			TTCACTGGGCTAT	
	PCR		GATT-3'	
		CP2/R	5'-	
			CCCGGGGCTTCACC	
			TTGCACACCAACA	
			GCAT-3'	
		mRep/F	5'-	
		Ĩ	GCGTGAAACGCAC	241
			AAAAGGCC-3'	
		mRep/R	5'-	
		-	GCATACGTTGTCA	
			AACCTTCTCCTC-3'	
Galvez et	PCR	BBTV S-F	5'-	
al.			CGTTTAGATGGGT	20
			TTTGGGCTC-3'	
(2020)		BBTV S–R	5'-	
			GATGTTCCTGTTG	
			CGACTCC-3'	
Jooste et	PCR	BBT-1	5'-CTC GTC ATG	
al. (2016)			TGC AAG GTT ATG	349
			TCG-3'	
		BBT-2	5'-GAA GTT CTC	
			CAG CTA TTC ATC	
			GCC-3'	
Selvarajan	PCR	BBTV-CP-F	5'-	
et al.			ATGGCTAGGTATC	
(2015)			CGAAGAAATCC-3'	513

Cuadro 19. Metodologías para la detección de BBTV encontradas en la búsqueda de revisión bibliografíca (2015-2021).

		BBTV-CP-R	5'-	
			TCAAACATGATAT	
			GTAATTCTGTC-3'	
Cruz et al.	PCR	F3	5'-	284
(2016)			GGAAGAAGCCTCT	
			CATCTGCTTCAGA	
			GAGC-3'	
		FPCR4	5'-	
			TTCCCAGGCGCAC	
			ACCTTGAGAAACG	
			AAAG-3'	
Tanuja et		BBTV- RT-	5'-	
al. (2019)	qPCR	CP-F	TCAACCAGCCGAC	-
			AACCTGT-3'	
		RT-CP-R	5'-	
			TGTCCCTGTTGCG	
			ACTCCTG-3'	
Majumder	DIBA basado	-	-	-
& Johari,	en AuNPs			
(2018)				
W/: always a	DCD			
wickfallia	PCK			1110
arachem		DNAI-F		1110
(2016)			5° CAC CCC CAC	
(2010)				
		DNAI-K	$G^{AA} AGG G^{AA} 3'$	
Das &	PCR	Ren1F		300
Baneriee	ICK	Kepff	5'-	500
(2018)			ATGGCGCGATATG	
(2010)			TGGTATG-3'	
		Ren1R	1001110 5	
		Repric	5'-	
			CGCATATCCTGTA	
			TGACATC-3'	
Rahavunia	PCR	DNA-R-F	5'-	1000
ti et al.			TTGAGAAACGAAA	
(2021)			GGGRAGC-3'	
~ /		DNA-R-R	5'-	
			GGTGTGCGCCTGG	
			GAAG-3'	
Baldodiya	PCR	BBTV-F	5'-	
et al			GGATGTTCACCAT	1111
(2019)			CAACAATCCC-3'	

		DNA-1-R	5'-	
			TGCATACCACATA	
			TCGCGCCAT-3'	
Barbosa et		BBTV CP- F	5'-	
al. (2020)	PCR múltiple		CGTTTAGATGGGT	524
			TTTGGGCTC-3'	
		BBTV CP-R	5'-	
			GATGTTCCTGTTG	
			CGACTCC-3'	
Niyongere	PCR	CPXI.PRI	5'-	
et al.			GCTAGGTATCCGA	
(2015)			AGAAATCC-3'	550
		BBTV3C.EX	5'-	
		Р	ATAAAGCTTTCAA	
			ACATGATATGT-3'	

5.2 Banana streak virus

5.2.1 Detección molecular

En las pruebas de especificidad para los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-F1 (Geering et al., 2000) se puede observar que las muestras de BSV General CORBANA y BSV-GF Australia dieron amplificación de una banda para todas las réplicas, con ambos tratamientos, aunque las bandas CA dieron ligeramente más tenues para 1A–3A (Cuadro 20, Fig. 3). Las demás muestras no dieron amplificación, así como los controles negativos del PCR. Las muestras de BSV General CORBANA y BSV-OL Australia amplificaron una banda con los imprimadores BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 para todas las réplicas (Geering et al., 2000), mientras que las demás muestras no amplificaron, así como los controles negativos del PCR (Cuadro 20, Fig. 4).

Cuadro 20. Prueba para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 y BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-F1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE), con 5 tipos de muestras provenientes de distintas variedades de banano y dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de	BSV-GF	BSV-OL
			muestra	(476 pb)	(522 pb)
1,2,3	BSV General	SA	Macerado	+,+,+	+,+,+
	CORBANA				
4,5,6	BSV-MY	SA	Macerado	-,-,-	-,-,-
	CORBANA				
7,8,9	BSV-MY	SA	Macerado	-,-,-	-,-,-
	Australia				
10,11,12	BSV-OL	SA	Macerado	-,-,-	+,+,+
, ,	Australia			, ,	, ,
13,14,15	BSV-GF	SA	Macerado	+,+,+	-,-,-
, ,	Australia			, ,	
16	Control negativo	SA	_	_	
	PCR				, ,
1A.2A.3A	BSV General	CA	Macerado	+.+.+	+.+.+
7 7-	CORBANA	-		, ,	7 7
4A.5A.6A	BSV-MY	CA	Macerado		
	CORBANA			7 7	7 7
7A.8A.9A	BSV-MY	СА	Macerado		
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	Australia	011		, ,	, ,
10A.11A.12A	BSV-OL	СА	Macerado		+.+.+
,	Australia			7 7	.,.,.
13A 14A 15A	BSV-GF	CA	Macerado	+ + +	
	Australia		1.14001440	.,.,.	, ,
16A	Control negativo	CA	_	-	
	PCR	<u></u>			, ,



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-GF, tratamiento SA (izq) y CA (der).



Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-OL, tratamiento SA (izq) y CA (der).

Para los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 se pudo determinar una amplificación de una banda con al menos una de las réplicas de las cinco muestras tanto en los tratamientos SA y CA, por otro lado, se puede observar que las bandas de BSV-MY-CORBANA y BSV-MY Australia son más brillantes y claras (Fig. 5), mientras que las bandas presentadas en las muestras de BSV-OL Australia y BSV-GF Australia suelen ser muy tenues (Cuadro 21, Fig. 6).

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de	BSV-MY
			muestra	(589 pb)
1,2,3	BSV General	SA	Macerado	-,-,+
	CORBANA			
4,5,6	BSV-MY	SA	Macerado	+,+,+
	CORBANA			
7,8,9	BSV-MY Australia	SA	Macerado	+,+,+
10	Control negativo de	SA	Macerado	-
	PCR			
11,12,13	BSV-OL Australia	SA	Macerado	+,+,+
14,15,16	BSV-GF Australia	SA	Macerado	-,+,-
17 y 18	Controles negativos	SA	Macerado	-,-
	PCR			
1A,2A,3A	BSV General	CA	Macerado	+,+,+
	CORBANA			
4A,5A,6A	BSV-MY	CA	Macerado	+,+,+
	CORBANA			
7A,8A,9A	BSV-MY Australia	CA	Macerado	+,+,-
10A	Control negativo de	CA	Macerado	-
	PCR			
11A,12A,	BSV-OL Australia	CA	Macerado	+,+,+
13A				
14A,15A,	BSV-GF Australia	CA	Macerado	+,+,-
16A				
17A y	Controles negativos	CA	Macerado	-,-
18A	PCR			

Cuadro 21. Prueba para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE), con 5 tipos de muestras provenientes de distintas variedades de banano y dos tratamientos SA y CA.



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, tratamiento SA (izq) y CA (der).



Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, tratamiento SA (izq) y CA (der).

Cuando se volvieron a visualizar los productos de PCR provenientes de las muestras BSV General CORBANA, BSV-OL Australia y BSV-GF Australia con los imprimadores respectivos (Cuadros 22 y 23), se pudo notar una diferencia en intensidad de la banda al utilizar los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 para la detección de BSV-GF y BSV-OL en las muestras BSV-GF Australia y BSV-OL Australia, siendo esta más tenue o en el caso BSV-GF nula en algunas de las réplicas (Cuadros 22 y 23, Figs. 7 y 8).

Cuadro 22. Visualización de los productos de IC-PCR de los ensayos para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 y BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE) con BSV-GF Australia y BSV General CORBANA y dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de	Imprimadores	Amplificacion
			muestra		
14,15,16	BSV-GF	SA	Macerado	BSV-MY	-,+?,-
	Australia				
1,2,3	BSV	SA	Macerado	BSV-OL-GF	+,+,+
	General				
	CORBANA				
13,14,15	BSV-GF	SA	Macerado	BSV-OL-GF	+,+,+
	Australia				
14A,15A,16A	BSV-GF	CA	Macerado	BSV-MY	+?,+,-
	Australia				
1A,2A,3A	BSV	CA	Macerado	BSV-OL-GF	+,+,+
	General				
	CORBANA				
13A,14A,15A	BSV-GF	CA	Macerado	BSV-OL-GF	+,+,+
	Australia				·



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 y BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY y BSV-GF tratamiento SA y CA.

Cuadro 23. Visualización de los productos de IC-PCR de los ensayos para determinar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1 y BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-R1 al utilizar la metodología modificada 1 para BSV (CATIE) con BSV-OL y BSV General CORBANA y dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de	Imprimadores	Amplificacion
			muestra		
11,12,13	BSV-OL	SA	Macerado	BSV-MY	+,+,+
	Australia				
1,2,3	BSV	SA	Macerado	BSV-OL-RD	+,+,+
	General				
	CORBANA				
13,14,15	BSV-OL	SA	Macerado	BSV-OL-RD	+,+,-
	Australia				
11A,12A,13A	BSV-OL	CA	Macerado	BSV-MY	+,+,+
	Australia				
1A,2A,3A	BSV	CA	Macerado	BSV-OL-RD	+,+,+
	General				
	CORBANA				
13A,14A,15A	BSV-OL	CA	Macerado	BSV-OL-RD	+,+,-
	Australia				



Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 y BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY y BSV-OL tratamiento SA y CA.

Mientras que al usar los imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 y BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-F1 respectivamente, se puede observar una intensidad de la banda mucho mayor en BSV-GF Australia y BSV-OL Australia que al utilizar los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Figs. 7 y 8). De la misma manera se observa que la muestra BSV General CORBANA también presenta una intensidad de banda igual a la que se visualizó con las muestras de BSV-GF Australia y BSV-OL Australia utilizando los imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 y BSV-OL-RD-F1/ BSV-F1/ BSV-F1/

Ninguno de los tres controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) amplificaron con sus imprimadores respectivos en ninguna de las réplicas para el primer ensayo SA, utilizado a BSV General CORBANA como control positivo. BSV General CORBANA no mostró amplificación con los imprimadores BSV-MY-F/BSV-MY-R, mientras que con los imprimadores BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-F1 se observó una amplificación muy tenue y con los imprimadores BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 se visualizaron dos bandas indicando un resultado inespecífico (Cuadro 24, Fig. 9).

En el ensayo CA para los controles negativos de Mysore, Red Dacca y Gold Finger, todas las muestras de los controles positivos utilizados provenientes de BSV General CORBANA amplificaron de acuerdo con los respectivos imprimadores utilizados (BSV-MY-F/BSV-MY-R, BSV-OL-RD-F1/ BSV-OL-RD-F1 y BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1). Ninguna de las réplicas de los tres controles negativos demostró amplificación, al igual que ninguno de los controles negativos de sus respectivos PCRs (Cuadro 24, Fig. 9).

Cuadro 24. Prueba para validar los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF, al utilizar dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de	Imprimadores	Amplificacion
			muestra		
1,2,3	Control	SA	Macerado	BSV-MY	-,-,-
	negativo				
	BSV-MY				
4	Control	SA	Macerado	BSV-MY	-
	positivo				
	BSV				
	General				
	CORBANA				
5	Control	SA	Macerado	BSV-MY	-
	negativo del				
	PCR				
6,7,8	Control	SA	Macerado	BSV-OL-RD	-,-,-
	negativo				
	BSV-OL				
9	Control	SA	Macerado	BSV-OL-RD	+?
	positivo				
	BSV				
	General				
	CORBANA				
10	Control	SA	Macerado	BSV-OL-RD	-
	negativo del				
	PCR				
11,12,13	Control	SA	Macerado	BSV-OL-GF	-,-,-
	negativo				
	BSV-GF				
14	Control	SA	Macerado	BSV-OL-GF	+/-
	positivo				
	BSV				
	General				
	CORBANA				
15	Control	SA	Macerado	BSV-OL-GF	-
	negativo del				
	PCR				
1A,2A,3A	Control	CA	Macerado	BSV-MY	-,-,-
•	negativo				
	BSV-MY				
4A	Control	CA	Macerado	BSV-MY	+
	positivo				

	BSV General				
	CORBANA				
5A	Control	CA	Macerado	BSV-MY	-
	negativo del				
	PCR				
6A,7A,8A	Control	CA	Macerado	BSV-OL-RD	-,-,-
	negativo				
	BSV-OL				
9A	Control	CA	Macerado	BSV-OL-RD	+
	positivo				
	BSV				
	COPRANA				
104	Control	CA	Macerado	RSV-OL-RD	_
10/1	negativo del	CIT	Macciado	DOV OL ICD	
	PCR				
11A,12A,13A	Control	CA	Macerado	BSV-OL-GF	-,-,-
, ,	negativo				
	BSV-GF				
14A	Control	CA	Macerado	BSV-OL-GF	+/-
	positivo				
	BSV				
	General				
	CORBANA				
15A	Control	CA	Macerado	BSV-OL-GF	-
	negativo del				
	PCR				



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF en los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) tratamiento SA (izq) y CA (der).

Cuando se repitió el ensayo, esta vez con dos réplicas de los controles positivos (Cuadro 25) se visualizó que BSV General CORBANA amplifica para al menos una de las réplicas con los tres imprimadores utilizados, sin embargo, al utilizar los imprimadores BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-R1 aún se observan dos bandas. Por otro lado, ni los controles negativos de Mysore, Red Dacca y Gold Finger no amplificaron al igual que los controles negativos de PCR respectivos (Cuadro 27, Fig. 10).

En el ensayo con los controles negativos de, Red Mysore Dacca y Gold Finger al utilizar los controles positivos provenientes de Australia BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF, estos mostraron amplificación de una banda, tanto en el tratamiento SA como CA (Cuadros 26, 27 y 28, Figs. 11, 12 y 13). También se visualizó que el control positivo BSV+ amplificó una banda con los imprimadores respectivos (BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-F1 y BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1). Ninguna de las réplicas de los controles negativos de Mysore, Red Dacca y Gold Finger dieron amplificación con los respectivos imprimadores utilizados (BSV-MY-F/BSV-MY-R, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-F1 y BSV-OL-GF-F1/BSV-F1/BSV-F

Cuadro 25. Prueba para validar los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger) con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF, al utilizar el tratamiento SA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de muestra	Imprimadores	Amplificacion
1,2,3	Control negativo BSV- MV	SA	Tipo de muestra	BSV-MY	-,-,-
4, 5	Control positivo BSV General	SA	Macerado	BSV-MY	-,+
6	CORBANA Control negativo del PCR	SA	Macerado	BSV-MY	-
7,8,9	Control negativo BSV- OL	SA	Macerado	BSV-OL-RD	-,-,-
10,11	Control positivo BSV General CORBANA	SA	Macerado	BSV-OL-RD	+,+?
12	Control negativo del PCR	SA	Macerado	BSV-OL-RD	-
13,14 y 15	Control negativo BSV- GF	SA	Macerado	BSV-OL-GF	-,-,-
16, 17	Control positivo BSV General CORBANA	SA	Macerado	BSV-OL-GF	+/-,+/-
18	Control negativo del PCR	SA	Macerado	BSV-OL-GF	-



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/ BSV-MY-R1, BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1, BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF en los controles negativos (Mysore, Red Dacca y Gold Finger), tratamiento SA.

Cuadro 26. Prueba para validar el control negativo de la variedad Mysore con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY al utilizar dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de muestra	BSV-MY (589 pb)
1,2,3	Control negativo BSV- MY	SA	Macerado	-,-,-
4	Control positivo BSV MY Australia	SA	Macerado	+
5	Control negativo del PCR	SA	-	-
6	Control positivo virus +BSV	-	-	-
1A,2A,3A	Control negativo BSV- MY	CA	Macerado	-,-,-
4A	Control positivo BSV MY Australia	CA	Macerado	+
5A	Control negativo del PCR	CA		-



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-MY en el control negativo de la variedad Mysore tratamiento SA (izq) y CA (der).

Cuadro 27. Prueba para validar el control negativo de la variedad Red Dacca con imprimadores específicos BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-OL al utilizar dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de muestra	BSV-OL (522 pb)
1,2,3	Control negativo BSV- OL	SA	Macerado	-,-,-
4	Control positivo BSV-OL Australia	SA	Macerado	+
5	Control positivo virus +BSV	SA	-	+
6	Control negativo del PCR	-	-	-
1A,2A,3A	Control negativo BSV- OL	CA	Macerado	-,-,-
4A	Control positivo BSV-OL Australia	CA	Macerado	+
5A	Control negativo del PCR	CA	-	-



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-OL en el control negativo de la variedad Red Dacca tratamiento SA (izq) y CA (der).

Cuadro 28. Prueba para validar el control negativo de la variedad Gold Finger con imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-GF al utilizar dos tratamientos SA y CA.

Carril	ID	Tratamiento	Tipo de muestra	BSV-GF (476 pb)
1,2,3	Control negativo BSV-GF	SA	Macerado	-,-,-
4	Control positivo BSV-GF Aus	SA	Macerado	+
5	Control positivo virus +BSV	SA	-	+
6	Control negativo del PCR	-	-	-
1A,2A,3A	Control negativo BSV-GF	CA	Macerado	-,-,-
4A	Control positivo BSV-GF Aus	CA	Macerado	+



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-PCR con imprimadores específicos BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 (Geering et al., 2000) para la detección de BSV-GF en el control negativo de la variedad Gold Finger tratamiento SA (izq) y CA (der).

5.2.2 Revisión bibliografíca

_

Cuadro 29. Metodologías para la detección de BSV encontradas en la búsqueda de revisión bibliografíca (2015-2021).

Autor	Técnica	Imprimador	Secuencia	Tamaño molecular
				esperado (pb)
James et	RCA	BadnaFP	5'-	580
al. (2021)			ATGCCITTYGGIITIAAR	
			AAYGCICC-3'	
		BadnaRP	5'-	
			CCAYTTRCAIACISCICC	
			CCAICC-3'	
Mungai et	PCR	RD-F1	5'-	
al.			ATCTGAAGGTGTGTTG	522
(2015)			ATCAATGC-3'	
		RD-R1	5'-	
			GCTCACTCCGCATCTT	
			ATCAGTC-3'	
Martinez	IC-PCR	IM-F1	5'-	
et al.			CACCCAGACTTTTCTTT	384
(2020)			CTAG C-3'	
		IM-R1	TGCCAACGAATACTAC	
			ATCAAC-3'	
Idan &	PCR	BSV5466	5'-	
Koc,			AGAGTGGGTTTCATCA	731
(2019)			AGTAGC-3'	

		BSV6196	5'-	
			GAATTTCCCGCTCGCA	
			TAAG)	
Waliullah	PCR	BSV 4673	5'-	
et al.			GGAATGAAGAGCAG	644
(2020)			GCC-3'	0.11
(2020)			5'-	
		BSV 5317	AGTCATTGGGTYCAAC	
		DB + 3517	CTCTGTCCC-3'	
Abraham		EE-R	5'-	
et al	PCR			463
(2018)	ICK		CAAAGGA = 3'	+05
(2010)		FF-F	5'-	
		L1 -1		
			GCCA 3'	
Thomas	DCD	Im El	5'	
(2015)	FUK	ШІ-ГІ		201
(2013)			ATCAAC 2'	364
		Im D1	AICAAC-5	
		1111-K I	\mathcal{J} -	
			CALCEAGACITTICITT	
o ·		ODEO	CTAGC-3	
Onsarigo,	PCK	ORF2		0.00
(2017)			GCAGGAIGAGICIAGG	960
			AIGAGICAGCCAACAC	
		DAVIDO	CAAGGC-3	
		BstXI-R G		
			IGGCIGATAIGAIAGA	
C1	DOD		CATATGATAGACC-3	276
Sharma et	PCR	VV3F	5-	3/6
al. (2015)			TIGCCAAGAATICCTC	
			CAAG-3	
		VV3R	5-	
			AAGTTCTTGTCGGCAA	
	D (7D		GGTG-3'	
Higginson	PCR	VV2F	5'-	
et al.			TCTGAGATCTCCAGCC	639
(2015)			AGG-3'	
		VV2R	5'-	
			GACAGTTCCAGCACAG	
			CAGA-3'	
Zhang et	RT-			-
al. (2018)	LAMP	BSV-OL-F3	5'-	
			ATGCTAGGAGCTACAT	
			TC C -3'	

		BSV-OL-B3	5'-	
			TCCACTTACATACCCC	
			TC C -3'	
Mocha-	PCR	ScBV F5	5'-TCAAAGTTTGATTT	
Cuenca, (2018)			AAG AGCGGG-3'	221
		ScBV R5 5'	5'-	
			CTCCGAGAAAACCAAT	
			AT GTCATC-3'	
Selvarajan	PCR	VAP-F1	5'-	398
et al.			AGCTCATATGAGTCTA	
(2016)			GCCAACACCAA-3'	
		VAP-R1	5'-	
			AGCTCTCGAGTCATTG	
			TAGGGATCTTAGAA-3'	
Abdel-	IC-PCR	Badna FP	5'-	580
Sala,			'ATGCCITTYGGIITIAAR	
(2019)			AAYGCIC-3"	
		Badna RP	5'-	
			'CCAYTTRCAIACISCICC	
			CCAICC-3'	
Rao et al.,	PCR	IS1F	5'-	658
(2020)			CCTCTAGAACTGGCTA	
			CAATC-3'	
		IS1R	5'-	
			GGTAAATAGCAGTTGC CTTGC-3'	

5.3 Cucumber mosaic virus

5.3.1 Detección molecular

En la detección de CMV por medio de la metodología 1 modificada (CATIE/ Musanet Biodiversity International), al utilizar los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV, tanto CMV+ y CMV Australia no demostraron amplificación para ninguna de las réplicas, tanto al utilizar la mezcla 1.1 de transcripción reversa y la 1.2 la cual tenía "DTT", el control negativo tampoco amplificó para ninguna de las réplicas (Cuadro 30, Fig. 14).

Carril	ID	Tipo de muestra	CMV (900 pb) Mezcla 1.1 transcripción reversa	CMV (900 pb) Mezcla 1.2 transcripción reversa
1,2 y 3	CMV +	Macerado	-,-,-	-,-,-
4,5 y 6	CMV	Macerado	-,-,-	-,-,-
7,8 y 9	Control negativo PCR	-	-,-,-	-,-,-

Cuadro 30. Prueba para la detección de CMV con los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE) metodología modificada 1 para CMV CATIE/Musanet Biodiversity International al utilizar dos condiciones en la mezcla 1 de transcripción reversa (1.1 y 1.2).



Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-RT-PCR para la detección del CMV utilizando los imprimadores específicos CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE), mezcla 1.1 transcripción reversa (izq) y mezcla 1.2 transcripción reversa (der).

Cuando se utilizó la metodología modificada 2 (CORBANA- Islas et al, 2006 y CATIE) al utilizar los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV, el control positivo CMV Australia dio un resultado inespecífico para dos de las tres réplicas, sin embargo, se observaron dos bandas, mientras que el control negativo del PCR no amplificó (Cuadro 31, Fig. 15). **Cuadro 31.** Prueba para la detección de CMV con los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE) al utilizar la metodología modificada 2 para CMV CORBANA- Islas et al., 2006 y CATIE.

Carril	ID	Tipo de muestra	CMV (900 pb)
1,2 y 3	CMV Australia (Control	Tejido liofilizado	-,+/-,+/-
	positivo Kathy Crew)		
4	Control negativo PCR	-	-



Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de RT-PCR para la detección del CMV utilizando los imprimadores específicos CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE).

Por otro lado, cuando se realizaron los ensayos con la metodología 1 modificada (CATIE Australia/ Musanet Biodiversity International), al utilizar los imprimadores CMV-F/CMV-R, y las condiciones de mezcla 2 de RT-PCR, el control positivo CMV+ amplificó para las tres réplicas, sin embargo, en dos de las tres réplicas se observa un barrido tenue debajo de la banda (Cuadro 32, Fig. 16).

Cuadro 32. Prueba para la detección de CMV con los imprimadores CMVF/CMVR (Bariana et al., 1994) al utilizar la metodología modificada 1 para CMV CATIE/ Musanet Biodiversity International y las condiciones mezcla 2 de RT-PCR por Musanet Biodiversity International.

Carril	ID	Tipo de muestra	CMV (500 pb)
1,2,3	CMV +	Macerado	+,+,+
4,5,6	CMV Australia	Macerado	-,-,-
7,8,9	Calcuta 4 CORBANA	Macerado	-,-,-
10,11,12	Control negativo BSV	-	-,-,-



Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para productos de IC-RT-PCR para la detección del CMV utilizando los imprimadores específicos CMVF/CMVR (Bariana et al., 1994).
5.3.2 Revisión bibliografíca

Cuadro 33. Metodologías para la detección de CMV encontradas en la búsqueda de revisión bibliografíca (2015-2021).

Autor	Técnica	Imprimador	Secuencia	Tamaño
				molecular
				esperado (pb)
Azizan et	RT-PCR	CMV-F	5'-AAC CTT TGT GGG TAG	(r ⁽ⁱ⁾)
al. (2017)			TGA-3'	315
		CMV-R	5'-TTG AAC GCC AGA TGC-3'	
Srivastava	RT-PCR	CMV F1	5'-	249
et al. (2019)			CTTTCGCGACTTAATAAGACGT TAGCAGCTGGT-3'	
		CMV R1	5'-	
			CACAGTAGAATCAAATTTCGG CAAGGGATT-3'	
Khaled et al. (2015)	RT-PCR	CMV-F	5'-GCC GTA AGC TGG ATG GAC AA-3'	400
		CMV-R	5'-TAT GAT AAG AAG CTT GTT TCG CG-3'	
Kebede & Majumder (2020)	DIBA	-	-	-
Giakountis	RT-PCR	CMV_satRN	5'-	340
et al. (2018)		AF-F	GTTTTGTTTGTTGGAGAGTTGC G-3'	
~ /		CMV_satRN	5'-	
		A F-R	GGGTCCTGTAGAGGAATGTGA CATT-3'	
Fan et al. (2018)	Transcrip ción	F3	5'-CCACCCAACCTTTGTAGG-3'- 3'	183
	reversa	B5	5'-CGGCAAAGGATTAACT	
	mediada		CGA-3'	
Bald-	RT-PCR	CMV CPs	5'-	810
Blume et	RITER		CGGCCGCGGGGAATTCGATTAT	010
al.(2017)			GGATGCTTCTCCGCGA-3'	
		CMV_CPas	5'-	
			CGCGAATTCACTAGTGATTCC	
T			AACTCAGCTCCCGCCA-3'	
Thompson	RT-PCR	AtropaNad2.	5^{2}	100
et al.(2015)		1a	GATC-3'	188

		AtropaNad2.	5'-	
		2b	AGCAATGAGATTCCCCCAATAT CAT	
Zhang et	RT-PCR	CMV-F	5'- TCGGTCCGCTTCTGGT-3'	600
al.(2020)		CMV-B	5'- TCGGGAGCATCCGTGAG-3'	
(Adediji,	IC-RT-	CMV-F	5'-	502
2019)	PCR		TATGATAAGAAGCTTGTTTCGC	
			G-3'	
		CMV-R	5'-	
			GCCGTAAGCTGGATGGACAA-	
			3'	
(Pavithra et	RT-PCR	CMRN1	5'-	
al. (2019)		2F/1355 R-F	GTTTATTTAGAAGAGGGTACG	130
			GTTC-3'	
		CMRN1	5'-	
		2F/1355 R-R	CAGGATTGCATGGACATAGA-	
			3'	
Lan et al.	RT-PCR	CMV-CP-F	5'-	
(2020)			ATGGACAAATCTGAATCAACC	750
			AGT-3'	
		CMV-CP-R	5'-	
			GACTGGGAGCACTCCAGATG-	
			3'	
Stanković	RT-PCR	CMVCPfwd	5'-CAT	
et al.			GGATGCTTCTCCRCGAG-3'	871
(2021)		CMVCPrev	5'-CGTAAGCTGGATGG	
			ACAACC-3'	
Valachas et	RT-PCR	MV_CP_F	5'-	
al.			AACCAGTGCTGGTCGTAACC-3'	472
(2021)		MV_CP_R	5'-	
			GTTGGCTTGGACTCCAGATG-3'	
Rasoulpour	RT-PCR	CPTALL-3	5'-ATTTGGTTCAATTCC-3'	966
et al. (2016)		CPTALL-5	5'-GCCGATTTTACCAGTCAG-3'	

5.4 Controles Positivos

5.4.1 Banana bunchy top virus

Debido a que BBTV no se encuentra presente en el país, ni tampoco en el continente Latinoamericano, un control positivo para este virus puede provenir de un control positivo sintético. Thermo Fischer Scientific ofrece el servicio de construcción de plásmidos (GeneArt[™] Plasmid Construction Service), donde se podría mandar a sinterizar con las secuencias deseadas para BBTV y utilizarlo como control positivo.

La empresa GeneScript también ofrece el servicio de clonación por medio de diferentes vectores, estos tienen una amplia gama de hasta 150 entre ellos vectores provenientes de bacterias o de hongos como *Saccharomyces cerevisiae* o vectores virales como Baculovirus. Los precios comienzan desde los \$49 donde lo que se da es 4 µg de ADN plasmídico liofilizado de su inserto en el vector elegido.

5.4.2 Banana streak virus

A pesar de que BSV se encuentra presente en el país y es posible identificar plantas con síntomas y utilizar ese tejido vegetal infectado como control positivo para las pruebas de rutina, esto podría presentar variación en cuando al método de estandarización. Lo ideal en este caso sería crecer en los laboratorios e invernaderos de las instalaciones de CORBANA, plantas inoculadas con BSV (y variantes), provenientes de la purificación del virus de plantas infectadas en campo, sin embargo, esto requiere un alto costo económico, equipo y mano de obra especializada.

Agdia vende un control positivo proveniente de tejido liofilizado, el inconveniente es que este es de BSV-OL (LPC 72200), por lo que no se puede comprobar si también funcionaria para las demás variantes.

Para BSV debido a que existen distintas variantes, además de las estudiadas en los ensayos realizados (BSV-OL, BSV-GF y BSV-MY), para poder tener controles

estandarizados para cada variedad, se pueden utilizar nuevamente controles positivos provenientes de ADN sintético. Además de la empresa mencionada GeneArt[™] Plasmid Construction Service y la empresa Twist Bioscience (San Francisco, USA) ofrecen el servicio de clonación de genes/ fragmentos de genes, estos calculan el precio del servicio de acuerdo con la cantidad de pares de bases del fragmento deseado, comenzado con precios desde los \$30. Para esto se podrían utilizar genes que codifican para proteínas de la cubierta, etc.

5.4.3 Cucumber mosaic virus

Al igual que BSV, CMV también se encuentra presente en el país, por lo que también se podrían identificar plantas con síntomas y utilizar ese tejido vegetal infectado como control positivo o crecer las plantas inoculadas con el virus, resulta más conveniente utilizar otro tipo de control positivo para los procedimientos de rutina del laboratorio.

Los métodos mencionados anteriormente requieren de un alto costo económico y de personal capacitado, por lo que un control positivo proveniente de un kit para ELISA es mucho más económico, además es más estable, ya que proviene de una casa comercial certificada, como el utilizado en las pruebas realizadas en este proyecto (CMV +). Agdia también vende un control positivo liofilizado (CMV-CPC 44501) el cual se podría utilizar en la metodología de IC-RT-PCR. La casa comercial Creative Diagnosis también vende un kit (CMV ELISA Kit, DEIAPV4) que contiene un control positivo y se podría utilizar.

5.5 Labores extracurriculares del proyecto de virus

Las labores realizadas se indican en el Cuadro 49. Estas labores tuvieron una duración distinta cada una, algunas eran más rutinarias por lo que se realizaron durante todas las semanas, algunas fueron más puntuales por lo que tuvieron una duración más corta.

Cuadro 34. Resumen de las labores extracurriculares del proyecto de virus realizadas durante las 20 semanas prácticas en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular CORBANA.

Labor realizada	Duración (semanas)
Remoción del etiquetado de tubos Eppendorf	20
1.5 ul v 2 ul con etanol 96%	
Limpieza para reutilización de tubos	20
Eppendorf 1.5 μ l y 2 μ l provenientes de	
extracciones de ADN	
Deshielado, limpieza y ordenamiento del	10
congelador 8 °C	
Ordenamiento en Excel de la base de datos	1
de informes del Laboratorio de Biología	
Molecular CORBANA	
Alistar y ordenar tubos 2 ml para el	10
muestreo en campo de Sigatoka negra	
Limpieza para reutilización de tubos 2 ml	12
provenientes del muestreo en campo de	
Sigatoka Negra	
Colaboración en la fase de extracción de	10
ADN de muestras provenientes del muestreo	
en campo de Sigatoka Negra	
Selección de tubos Eppendorf 1.5 µl y 2 µl	20
para su posterior reutilización	
Limpieza de puntas para micropipetas (4	20
tamaños) para su reutilización	
Selección de puntas para micropipetas (4	20
tamaños) para su posterior reutilización	
Relleno de cajas de puntas nuevas o	18
reutilizadas para poner en el autoclave	
Ordenamiento de tubos Eppendorf 1.5 µl y 2	16
µl reutilizados	
Ordenamiento de puntas de micropipetas	16
reutilizadas	
Utilización del autoclave para esterilización	3
de puntas de micropipetas y tubos Eppendorf	

Colaboración realizando una electroforesis	4
en gel de agarosa 1 % para distintas	
muestras de CORBANA	
Ordenamiento en congelador 8 °C y	8
etiquetado de muestras de ADN	
provenientes de muestreos de distintos	
proyectos en CORBANA (2018-2021)	
Cuantificación de ADN por medio de	4
Nanodrop de muestras de distintos proyectos	
CORBANA	
Ordenamiento de la bodega de reactivos del	1
laboratorio de Biología Molecular	
CORBANA	
Realización de diluciones de ADN	3
provenientes de muestreo de Sigatoka Negra	
en malezas	
Limpieza y desinfección de las áreas de	2
trabajo del laboratorio de Biología	
Molecular con alcohol 70%	
Realización de PCR para muestras de	1
CORBANA	

6. Discusión

6.1 Banana bunchy top virus

La extracción de ADN realizada con el protocolo modificado CORBANA dio buenos resultados en cuanto a la concentración y pureza del ADN (493 ng/ μ l, 2.12), tomando en cuenta que solamente se tenía > 0.5g de tejido liofilizado disponible, aunque en el protocolo original se puede utilizar hasta 3 g de tejido fresco (CORBANA).

Con respecto a la doble banda presentada para la muestra de BBTV Australia con la mezcla de PCR 2 la cual contenía BSA (Fig. 1), se esperaba que tanto el tratamiento con BSA como sin BSA resultara en una banda, ya que el BSA solamente ayuda disminuir inhibición de la reacción de PCR (Kreader, 199; Xiao et al 2006), además, en el protocolo

de Chen & Hu, (2013) utilizaron BSA y obtuvieron amplificación de una sola banda de 155 pb.

Las bandas observadas para los productos de las muestras de BBTV Australia (Figs. 1 y 2) suelen ser tenues, pero son consistentes con las bandas ese peso molecular (100-200 pb) al observar el marcador molecular. En el protocolo de Chen & Hu (2013) las bandas se muestran con más intensidad, esta diferencia se puede deber a las diferentes condiciones de la mezcla de PCR utilizadas, ellos utilizan "Taq Immomix® (BioLine)" el cual es una mezcla de algunos componentes principales de la mezcla de PCR y una ADN polimerasa "IMMOLASETM", lo cual puede hacer que las bandas se vean con más intensidad (https://www.bioline.com/immomix.html).

La intensidad más tenue de las bandas observada, también se pudo haber debido simplemente a la carga viral del material utilizado. En otro trabajo, se amplificó a partir de tejido infectado y de un control positivo proveniente de una secuencia viral clonada en un plásmido y se obtuvo una banda de intensidad más fuerte al utilizar el control positivo del clon (Kumar, 2017).

En la prueba de sensibilidad se quería ver un degradado en la intensidad de la banda de acuerdo con su concentración de ADN, por lo tanto, para la dilución de ≈ 0.05 ng/ µl también se esperaba ver una banda al ser una concentración mayor a la dilución de ≈ 0.005 ng/ µl, la cual si amplificó.

En el ensayo de sensibilidad de Kumar (2017) sí se logra apreciar el degradado en la intensidad de la banda donde a mayor concentración mayor intensidad de banda, a diferencia de los resultados obtenidos este ensayo, donde realmente no hay una diferencia entre

intensidades. Se recalca que las concentaciones mínimas de sensibilidad varían de acuerdo con el ensayo, en la investigación de Kumar (2017) la detección mínima del protocolo eran 10 ng/µl, lo cual puede efectar en las intensidades de la banda. A demás, la intensidad en la banda se pudo haber visto afectada por un error humano a la hora de realizar las diluciones seriadas.

6.2 Banana streak virus

Con respecto a los imprimadores utilizados BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 estos demostraron especificidad, ya que mostraron amplificación como se esperaba con el control positivo BSV-GF Australia. Aunque estos también amplificaran con BSV General CORBANA, este al ser un control general, no se sabía, que variedad de BSV se encontraba presente en la muestra, en este caso la banda era de la misma intensidad a la dada por BSV-GF Australia, por lo que no se puede descartar que estuviera infectado por BSV-GF.

Los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 son los mismos utilizados por Geering et al. (2000) para la detección de BSV-GF en plantas de banano Gold Finger con síntomas de BSV-GF, estos debieron de dar amplificación de una banda de 476 pb como se esperaba por medio de IC-PCR, sin embargo, en los ensayos de especificidad de estos imprimadores la banda obtenida parece ser de un peso molecular mayor entre 500-600 pb (Fig. 3).

Estas las discrepancias con respecto al peso molecular esperado, además de migraciones no esperadas, se pueden deber al tinte utilizado en las electroforesis para observar la banda. En este caso se utilizó GelRed, las moléculas de este tinte son de mayor peso molecular, para evitar que entre a las células humanas, por lo que la migración del ADN

se puede ver afectado dando un peso molecular mayor al esperado (BIOTIUM, 2021) y con mayor probabilidad si se realiza la tinción previo a la electroforesis.

Los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 también demostraron especificidad ya que estos solamente amplificaron con BSV-OL Australia y BSV General CORBANA, este último anteriormente también había amplificado con los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1, esto se puede deber por varios factores, no se puede descartar que en una misma planta existan infecciones múltiples (Liu et al., 2012). De la misma manera que en la Fig. 3 en la Fig. 4 se puede notar una diferencia ligera entre el tamaño de las bandas, igualmente a causa del tinte GelRed y la manera de utilizalo en la metodología que se siguió.

Se sabe que el BSV es un virus complejo a nivel molecular, ya que se puede integrar al genoma de la planta (Harper et al., 2005), eso hace que su detección pueda ser complicada a la hora de realizar técnicas de detección ADN. A pesar de que se utilizó anticuerpo para eliminar la detección de partículas endógenas virales, existe la posibildad de que se detecte ADN producido por recombinación entre secuencias dentro del genoma, en el estudio de Sharma et al. (2015) se evidenciaron trazas recombinación en el genoma de BSV, aunque por medio de PCR, sin embargo, esos eventos se pueden observar como diferencias en los pesos moleculares obtenidos de las bandas (Fig. 2).

En la Fig. 8 (Carril 13A) se observa una la ligera diferencia de peso molecular en la banda, además de tener un grosor mayor, aunque ninguna de las otras réplicas diera este resultado, se puede atribuir al igual que en los ensayos con los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1, al tinte GelRed utilizado en las electroforesis, por error humanos en esa réplica se pudo haber agregado un exceso del tinte causando las discrepancias con respecto a las demás réplicas.

No se pudo confirmar la especificidad de los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1, estos parecen ser inespecíficos son respecto al tipo de BSV detectado, ya que a pesar de que amplificaron para BSV-MY CORBANA y BSV-MY Australia como se esperaba, también mostraron amplificación con BSV-OL Australia, aunque en la Fig. 7 aparece que estas bandas suelen ser más tenues, sí muestran una amplificación de una banda clara del peso molecular esperado (589 pb). Por otro lado, algunas de las réplicas de BSV- GF Australia mostraron una banda sumamente tenue, pero que igual demuestra inespecificidad de los imprimadores.

Por otro lado, BSV General CORBANA también amplifico con los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1, este control positivo proviene de una planta de *Musa* sp. lo cual indica que estos imprimadores son funcionales en la detección de BSV en distintos tipos de variedades de banano, no solamente Gold Finger, Red Dacca y Mysore, sin embargo no se podría determinar con exactitud a cual tipo de variedad de BSV corresponde (BSV-GF, BSV-OL y BSV-MY) o inclusive una nueva variedad no presentada en este estudio, para eso se tendría que secuenciar el fragmento amplificado (Baranwal et al., 2014; Iskra-Caruana et al., 2014).

Los controles negativos provenientes de las plantas libres de virus de cultivo *in vitro* (Gold Finger, Red Dacca y Mysore) no mostraron amplificación en ninguna de las pruebas utilizadas, con esto se confirma que son aptas para usarse en protocolos de rutina. Estos son un control negativo estable, ya que en el laboratorio de cultivo in *vitro* constantemente crecen

81

variedades libres de virus, además el laboratorio se encuentra dentro de las instalaciones del Centro de Investigaciones en la Rita, Guápiles por lo que tampoco representa un gasto en el transporte.

Los ensayos para la validación de los controles negativos sin anticuerpo con BSV General CORBANA control positivo se tuvieron que repetir, ya que la primera vez que se realizaron, los controles positivos fueron muy tenues o no amplificaban (Fig. 9), esto a pesar de que la metodología ya había sido validada anteriormente utilizando IC-PCR (CATIE, Figs. 4, 5 y 6).

Aunque la metodología había sido validada al utilizar BSV General CORBANA, los errores humanos pueden ocurrir, ya que los volúmenes suelen ser muy pequeños también son procedimientos largos donde se requiere destreza. Además, estos son procedimientos son de varios días con pasos dependientes uno del otro y no se puede determinar si el error ocurrió en la inmunocaptura o en el PCR, ya que solo al observar la electroforesis en gel se puede ver el resultado.

Al utilizar los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-R1 con BSV General CORBANA como control positivo se observa una amplificación inespecífica al observarse dos bandas, sin embargo, resulta interesante, ya que la banda más tenue es la tiene un peso molecular más cercano al esperado 476 pb (Fig. 9). Anteriormente estos estaban amplificando una sola banda, las soluciones stock fueron las mismas, además de que los "Master Mix" y las condiciones de PCR fueron las mismas para todo el ensayo.

Por otro lado, los controles positivos provenientes de Australia (BSV-MY, BSV-OL y BSV-GF) en los ensayos de validación de los controles negativos mostraron amplificación tal y como se esperaba. Cabe destacar que en los ensayos con BSV-GF Australia, se utilizó una solución stock nueva de los imprimadores para ver si se eliminaban las dos bandas observadas. Además, en los últimos ensayos realizados que fueron los ensayos utilizando BSV-OL y BSV-GF, se utilizaron otros volúmenes de la mezcla de PCR (Mezcla de PCR 2), lo cual tuvo resultados positivos ya que las bandas se observan muy claras y con una gran intensidad.

Todos los ensayos realizados para BSV tuvieron su contraparte realizando la metodología 1 modificada par BSV sin el paso inicial del recubrimiento con el anticuerpo, debido a que se quería comprobar si la metodología funcionaba sin el anticuerpo, ya que las partículas virales también son capaces de unirse a las paredes de plástico del tubo. También se quería probar si el anticuerpo BSMYV IgG, el cual era diseñado para BSV-MY funcionaba para las demás variedades, lo cual resultó cierto.

Esto principalmente porque CORBANA actualmente no posee un proveedor estable para el anticuerpo, antes la casa comercial que lo producía era Agdia, pero actualmente ya no lo produce más, por lo que se investigaron otros posibles proveedores del anticuerpo. Se encontró que la casa comercial Sediag empresa francesa produce un kit de ELISA el cual contiene un anticuerpo para BSV (https://sediag.fr/en/boutique/type-deculture/fruits/banana-streak-virus-bsv/) el cual podría ser funcional para la metodología de IC-PCR, sin embargo, en la página no se especificaban detalles del anticuerpo.

También se acudió a ponerse en contacto con el Dr. Benham Lockhart, de los pioneros en la detección de BSV en plantas de banano (Gayral et al., 2008; Dallot et al., 2001) el cual muy amablemente respondió que desconocía si otra casa comercial producía el

anticuerpo, pero que el muy amablemente como en otras publicaciones (Harper et al., 1999 ; Agindotan et al., 2006) podía donar para los experimentos, lo cual no funcionaba ya que lo que se pretendía era una estandarización de la metodología.

Otra opción para obtener un proveedor estable del anticuerpo es mandarlo a sintetizar, la empresa Thermo Fischer Scientific ofrece el servicio de producción especializada de anticuerpos para distintos fines, el cual consiste en preparación del antígeno, desarrollo de hibridoma por inmunizaciones, luego fusiones, subclonaje y finalmente la producción y purificación del anticuerpo (https://www.thermofisher.com). La empresa Absolute Antibody (https://absoluteantibody.com) también ofrece el servicio de construcción de anticuerpos, para la producción del anticuerpo tipo IgG se ofrece el servicio en ratones, ratas, hámster, ratones, cabras etc, para la cotización se debe enviar un correo con los detalles, ya que la pagina no indica los precios.

Hubo variación de la metodología en varios de los pasos y componentes de reacción, por ejemplo el tampón de macerado utilizado por Geering et al. (2000) contenía arena lavada, Tris-HCl y sulfito de sodio, además de ser molido con mortero, en nuestro caso fue con un macerador, la cantidad de tampón de lavado y anticuerpo en nuestro caso fue menor (30 μ l y 25 μ l respectivamente), además de las concentraciones molares de los reactivos de PCR como dNTPS, MgCl₂ entre otros, también las condiciones del termociclador fueron distintas.

6.3 Cucumber mosaic virus

En los resultados se puede observar que, al utilizar los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV en el IC-RT-PCR utilizando la metodología por CATIE, no se obtuvo amplificación (Fig 14), inicialmente se realizó la mezcla sin DTT el cual se agrega en el paso de retrotranscripción, ya que este actúa como un inhibidor de la actividad RNasa al impedir la formación de enlaces disulfuro en la reacción (Chen et al., 2004).

Sin embargo, la RNAsa OUT también cumple una función similar la cual fue agregado a la reacción, a pesar de esto no se observaron productos amplificados con ninguna de las dos mezclas de transcripción reversa, por lo que la utilización de estos imprimadores para IC-RT-PCR no se pudo validar en esta metodología en específico.

Cuando se utilizaron los mismos imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV (CATIE) esta vez utilizando la metodología 2 (CORBANA- Islas et al, 2006, CATIE), en la cual se utiliza ARN como molde proveniente de su extracción con tejido liofilizado para el RT-PCR, en lugar extracto crudo de hoja como en el IC-RT-PCR sí se obtuvo amplificación.

A pesar de que al utilizar la metodología de CORBANA- Islas et al, 2006 CATIE se obtuvo amplificación, al observar la electroforesis, se ven dos bandas, una que si corresponde al peso molecular de los imprimadores y otra debajo que se puede observar como una banda inespecífica.

La presencia de bandas inespecíficas se puede deber a que hay una extensión en la amplificación de los productos de PCR, lo que puede hacer que secuencias inespecíficas de ácidos nucleicos se unan a los imprimadores (Ruiz-Villalba et al., 2017). Se ha visto que uno de los factores más importantes en la especificidad de los imprimadores es el paso de anillamiento, donde la temperatura y duración son factores clave, también se recomienda un hot-start PCR (Hill & Stewart, 1992). Se tuvo la limitante de la cantidad del material del control positivo disponible, por lo tanto, no se pudieron realizar otros RT-PCR modificando las condiciones de PCR para evitar la presencia de bandas inespecíficas.

Al utilizar la metodología de la inmunocaptura de CATIE, pero las condiciones de RT-PCR de Musanet Biodiversity International y los imprimadores CMVF/CMVR, solo hubo amplificación del control positivo proveniente del kit para la detección de CMV. También se puede observar que la réplica 3 (Carril 3, Fig. 15) fue la que dio la banda más clara, en las otras dos réplicas, las bandas aparecen con un barrido ligero, pero igualmente se pueden considerar como amplificación de una banda con el peso esperado de 500 pb, los imprimadores utilizados (CMVF/CMVR) son los usados por Bariana et al., (1994), en los resultados obtenidos por el autor las bandas de 500 pb también aparecen con un barrido ligero.

Se puede determinar entonces que la metodología de IC-RT-PCR, utilizando la inmunocaptura con la metodología de CATIE, si es capaz de detectar CMV en plantas con síntomas, pero es dependiente de las condiciones de reacción y la mezcla de RT-PCR, en este caso la mezcla y condiciones de reacción de Musanet Biodiversity International presentaron resultados esperados amplificando una banda.

Algunas diferencias en las mezclas son la transcriptasa inversa usada en el caso de CATIE MMLV (Promega) y en el caso de Musanet Biodiversity International, Superscript III (Thermo Scientific). Esta última es genéticamente modificada para reducir la actividad de la ARNasa H, aumentar la vida media y mejorar la estabilidad térmica y en general se ha visto que esta tiene mayor sensibilidad y eficiencia que las MMLV no modificadas (Zucha et al., 2020; https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18080093), lo cual pudo haber influido en el resultado obtenido.

Los volúmenes de los componentes de las dos mezclas de RT-PCR fueron distintos, así como las concentraciones de los imprimadores, en el caso de los imprimadores CMVF/CMVR la concentración fue mayor de 20 uM, aunque con un volumen menor 0.4 µl y 0.34 µl respectivamente. Se ha visto que dependiendo de los imprimadores utilizados se tienen que ajustar los volúmenes o concentraciones de dNTPS y MgCl₂ (Thiele, 1991), lo cual pudo haber influenciado en que la mezcla de RT-PCR de Musanet Biodiversity International si mostrara amplificación.

El control positivo del kit de CMV provenía de un kit originalmente para ELISA, por lo que se esperaba que tuviera una mejor amplificación y que amplificara con las condiciones adecuadas de IC-RT-PCR. Este es un control certificado por una casa comercial y se espera que sea más estable que el control positivo proveniente de Australia, el cual como se mencionó estaba almacenado desde hace varios años.

Por otro lado, el control CMV Calcuta 4, se tenía como caso sospechoso, ya que solamente se tenía confirmación visual de síntomas, que pueden confundirse con otras enfermedades, para descartar con más certeza se pudo haber determinado si estaba infectado con BSV, el cual tiene síntomas similares como láminas rasgadas, amarillentas, pudrición del pseudotallo, etc (Higginson, 2007).

6.4 Limitantes del proyecto y recomendaciones

La cantidad de material con que se contaba de los controles positivos fue una de las limitantes del proyecto, como se mencionó en la metodología, lo que se tenía para cada virus era un tubo Eppendorf de 1-2 μ l con pedacitos de hojas con síntomas liofilizada por lo que la cantidad de experimentos fue limitada, además de que hubiera resultado interesante probar

más controles positivos provenientes de otras plantas infectadas con alguno de los tres virus del proyecto (BBTV, BSV y CMV).

El tiempo de los experimentos principalmente de las inmunocapturas también fue limitante, ya que el procedimiento en total tenía una duración de 3 días debido a la incubación del anticuerpo y las muestras, por lo que solamente se pudo realizar una inmunocaptura por semana, ya que el tiempo en el laboratorio era limitado debido a la pandemia actual del COVID-19.

Los materiales utilizados en las metodologías de los tres virus estudiados son de un alto costo económico, por lo que estos también eran limitados, y no se pudieron realizar tantos cambios en las mezclas de PCR como para determinar cuáles componentes eran clave y se mostraba una mejora en la claridad de las bandas, evitar bandas inespecíficas o inclusive conseguir que aparecieran bandas como en la metodología de detección para CMV 1 utilizando la mezcla de PCR de CATIE.

Se recomienda hacer ensayos para cambiar las concentraciones de los componentes de las mezclas de PCR (dNTPs, MgCl₂, BSA, taq pol, etc), para observar cómo resultan las amplificaciones, ver amplificaciones inespecíficas etc. También se recomienda utilizar una pre-mezcla de PCR de alguna marca comercial como PCR "Master Mix" M7502 (PROMEGA), GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA), PCR SuperMix (Thermo-Scientific) entre otros, donde solo se necesitan agregar los imprimadores, esto evita contaminación, inexactitud en los volúmenes agregados de cada componente y bandas inespecíficas. Para evitar cambios en la movilidad electroforética de las muestras, se recomienda utilizar una cantidad menor del tinte GelRed, además que esto también disminuye los costos económicos de los ensayos, ya que este tinte es de un algo precio económico. Así también se pueden probar distintas concentraciones de este para observar como estos cambios en las concentraciones pueden afectar los resultados de las electroforesis y así obtener las bandas con el peso molecular esperado.

También es recomendable realizar más réplicas de los ensayos de especificidad de los imprimadores para BSV-OL, BSV-GF. Ya que hay unas ligeras discrepancias con algunos pesos moleculares de algunas bandas, como se menciona en la discusión, a lo cual se le debe prestar atención al realizar más experimentos para poder determinar una mejor explicación a lo ocurrido.

Con respecto a los controles positivos, se recomienda en lugar de utilizar controles positivos provenientes de plantas infectadas naturalmente, utilizar plantas inoculadas con los distintos virus (BBTV, BSV y CMV) en invernadero, aunque se tiene claro que esto implicaría purificar las partículas virales lo cual implica un alto costo económico. Otra opción más viable para el control positivo y más estable es mandar a sintetizar ADN de una secuencia conocida del virus en un vector para así obtener un plásmido del virus.

7. Conclusiones

7.1 Banana bunchy top virus

Este virus tiene la mayor relevancia fitosanitaria al no encontrarse en América, por lo que la estandarización de un protocolo para su detección es de suma importancia. Se estandarizó la metodología para la detección de BBTV. Los imprimadores BBTVF1/BBTVR1 amplifican el fragmento deseado de 155 pb al utilizar como control positivo BBTV Australia, este dio amplificación de una banda con la mezcla de PCR sin BSA al seguir el protocolo de extracción de ADN ya estandarizado por CORBANA. Con respecto a los experimentos realizados para el límite de detección del PCR, se observa que el límite es 0.005 ng/ μ l, sin embargo, no se pudo ver un degradado en la intensidad de las bandas. Para los protocolos de rutina se puede utilizar ADN sintético mandado a fabricar.

7.2 Banana streak virus

Se estandarizó la metodología para la detección de BSV y sus variantes. Los imprimadores BSV-OL-GF-F1/BSV-OL-GF-F1 resultan específicos para la variedad BSV-GF, ya que estos demostraron solamente amplificación con BSV-GF Australia y BSV General CORBANA. De la misma manera los imprimadores BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 demostraron especificidad al solamente amplificar con BSV-OL Australia y BSV General CORBANA. Por otro lado, los imprimadores BSV-MY-F1/BSV-MY-R1 demostraron ser inespecíficos al haber amplificado con las muestras de BSV-OL y al menos alguna de las réplicas de BSV-GF.

También se concluye que algunos de los pesos moleculares especialmente de los imprimadores BSV-OL-GF-F1/ BSV-OL-GF-F1 y BSV-OL-RD-F1/BSV-OL-RD-R1 muestran una ligera diferencia de acuerdo con el peso molecular esperado. Por lo que se tiene que calibrar la cantidad utilizada del tinte GelRed, para obtener una constancia en los tamaños de banda esperados con respecto a sus pesos moleculares para sus respectivos imprimadores, debido a que la visualización de los productos de PCR es un paso esencial para la estandarización del protocolo.

Se concluye que existe una necesidad para obtener controles positivos estables y más al tratarse de un virus el cual tiene una amplia gama de variedades, por lo que los controles positivos se pueden mandar a sintetizar, siendo controles de ADN sintéticos para cada variedad. Así como también se puede mandar a sintetizar el anticuerpo para la detección de BSV, en empresas como Thermo Fischer Scientific.

Con respecto a los controles negativos provenientes de plantas de banano de cultivo *in vitro* de las variedades Mysore, Red Dacca y Gold Finger, se puede concluir que estas son aptas para utilizarlas como controles negativos en los ensayos de IC-PCR para la detección de BSV y sus respectivas variedades, debido a que no mostraron amplificación en ninguno de los ensayos realizados.

Al observar los resultados de los últimos ensayos de IC-PCR para los controles negativos de BSV- OL y BSV-GF los cuales fueron efectuados con la mezcla 2 de PCR para la detección de BSV, se puede concluir que esta mezcla presenta resultados similares en cuanto a la intensidad de las bandas comparado con la mezcla 1 de PCR. Aunque la variabilidad en las intensidades de las bandas se pudo haber debido a errores humanos. **7.3** *Cucumber mosaic virus*

Con respecto a los imprimadores CP-CMV-RE/CP-CMV se puede determinar que estos mostraron amplificación, aunque inespecífica, con la metodología 2 modificada para CMV, la cual implicaba una extracción de ARN del control positivo CMV Australia. Mientras que al utilizar la metodología modificada 1 para CMV con la mezcla y las condiciones de RT-PCR de CATIE no hubo amplificación para ninguna de las muestras utilizadas. Por lo tanto, se estandarizó al utilizar una extracción simple de ADN.

Los imprimadores CMVR/CMVF mostraron amplificación, pero solamente con el control positivo del kit de ELISA CMV, al utilizar la metodología modificada para CMV 1 con las condiciones de mezcla y el perfil del termociclador de Musanet Biodiversity International. Con estos resultados se puede determinar que el protocolo modificado de la inmunocaptura de CATIE no fue un paso limitante en la metodología modificada 2 para CMV, sino el paso de RT-PCR, sin embargo, no se puede determinar cuál factor exactamente fue el causante de la no amplificación de los productos de RT-PCR. Así se estandarizó el protocolo de detección de CMV, al utilizar las condiciones de mezcla de Musanet Biodiversity International.

8. Bibliografía

Abdel-Sala, A. M. (2019). Serological and Molecular Characterization of a New Badnavirus Species in Bougainvillea glabra Plants in Egypt. International Journal of Virology, 16(1), 8–15.

Abraham, A., Winter, S., Richert-Pöggeler, K. R., & Menzel, W. (2018). Molecular characterization of a new badnavirus associated with streak symptoms on enset (Ensete ventricosum, Musaceae). Journal of Phytopathology, 166(7–8), 565–571.

Adediji, A. O. (2019). Molecular detection of *Cucumber mosaic virus* from *Basella alba*, *Telfairia occidentalis* and *Talinum fruticosum* in Nigeria. Journal of Plant Protection Research, 59(2).

Agindotan, B., Winter, S., Lesemann, D., Uwaifo, A., Mignouna, J., Hughes, J., & Thottappilly, G. (2006). Diversity of banana streak-inducing viruses in Nigeria and Ghana: Twice as many sources detected by immunoelectron microscopy (IEM) than by TAS-ELISA or IC-PCR. African Journal of Biotechnology, 5(12), 1194–1203.

Angeles-Alyllón, M., Cambra, M., Llave, C., Moriones, E. (2016). Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides. Bubok, España.

Altendorf, S. (2019a). Bananas and major tropical fruits in Latin America and the Caribbean. FAO Food Outlook, 73–76.

Altendorf, S. (2019b). La marchitez del banano por *Fusarium* Raza 4 Tropical: ¿Una creciente amenaza al mercado mundial del banano? Perspectivas Alimentarias, 13–20.

Álvarez, E., Ceballos, G., Gañán, L., Rodríguez, D., González, S., & Pantoja, A. (2015). Production of Clean Planting Material for Managing Plantain Diseases. Colombia: CIAT.

Amin, I., Qazi, J., Mansoor, S., Ilyas, M., & Briddon, R. (2008). Molecular characterization of *Banana bunchy top virus* (BBTV) from Pakistan. Virus Genes, 36, 191–198.

Arumugam, C., Kalaimughilan, K., & Kathithachalam, A. (2017). *Banana bunchy top* Viral Coat Protein (CP) Gene Expression Studies at Molecular Level in Hill Banana cv. Sirumalai (AAB). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(6), 398–411.

Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J., & Streit, C. (2001). Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico Banano. Azizan, N. H., Ahmad, Z., Abidin, Z., & Phang, I. C. (2017). Science Heritage Journal / Galeri Warisan Sains (GWS) Study of *Cucumber mosaic virus gene* expression IN. 1(2), 29–31.

Bald-Blume, N., Bergervoet, J. H. W., & Maiss, E. (2017). Development of a molecular assay for the detection of *Cucumber mosaic virus* and the discrimination of its subgroups I and II. Journal of Virological Methods, 243, 35–43.

Baldodiya, G. M., Baruah, G., Borah, B. K., Modi, M. K., & Nath, P. D. (2019). Molecular characterization and sequence analyses of *Banana bunchy top virus* infecting banana cultivar Jahaji (Dwarf Cavendish) in Assam, India. 3 Biotech, 9(3).

Baranwal, V. K., Sharma, S. K., Khurana, D., & Verma, R. (2014). Sequence analysis of shorter than genome length episomal *Banana streak OL virus* like sequences isolated from banana in India. Virus Genes, 48(1), 120–127.

Barbosa, C. F. C., Koh, R. B. L., Aquino, V. M., & Galvez, L. C. (2020). Accurate Diagnosis of Multicomponent Babuviruses Infecting Abaca by Simultaneous Amplification of their Genome Segments. Philippine Journal of Science, 149(2), 373–382.

Bariana, H., Shannon, A., Chu, P. W., & Waterhouse, P. (1994). Detection of Five Seedborne Legume Viruses in One Sensitive Multiplex Polymerase Chain Reaction Test. The American Phytopathological Society, 84(10), 1201–1205

Beijerinck, M. (1898). Concerning a contagium vivum fluidium as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. Phytopathology Classics, 7(1), 33–52.

Benavides-López, L. F. (2019). Cuantificación temprana de *Pseudocercospora fijiensis* por medio de qPCR en modelos predictivos de Sigatoka Negra en plantas de banano (Musa AAA). Tecnológico de Costa Rica.

BIOTUM. (2021). Product Information GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. (www.biotium.com).

Ceccotti, S., Forteza, C., & Luberti, F. (2007). El diagnóstico en clínica estomatológica. Ed. Médica Panamericana, España.

Chen, Y., & Hu, X. (2013). High-throughput detection of *Banana bunchy top virus* in banana plants and aphids using real-time TaqManPCR. Journal of Virology, 193, 177–183.

Chen, Z., Ling, J., & Gallie, D. (2004). RNase activity requires formation of disulfide bonds and is regulated by the redox state. Plant Molecular Biology, 55(1), 83–96.

Conant, P. (1992). *Banana bunchy top* Disease, a New Threat to Banana Cultivation in Hawaii. Proceedings, Hawaiian Entomololgical Society, 31,91–96.

CORBANA. (2011). Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas para Reducir el Escurrimiento de Plaguicidas en el Cultivo del Banano de la Región Caribe Costarricense.

Cruz, F., Belen, G., & Alviar, A. (2016). Serological and molecular detection of mixed bunchy top and mosaic virus infections in abaca (*Musa* textilis Nee). Philippine Agricultural Scientist, 99(1), 88–98.

CTHAR. (1997). Banana bunchy top virus. Plant Disease.

Dahal, G., Hughes, J., & Lockhart, B. (1998). Status of *Banana streak* Disease in África: Problems and future research needs. Integrated Pest Management Reviews, 3, 85–97.

Dale, J. (1987). *Banana bunchy top*: an economically important tropical plant virus disease. Advances in Virus Research, 33, 301–325.

Dallot, S., Acuña, P., Rivera, C., Ramírez, P., Côte, F., Lockhart, B., & Caruana, M. (2001). Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). Archives of Virology, 146, 2179–2190.

Daniells, B. J. W., Geering, A. D. W., Bryde, N. J., & Thomas, J. E. (2001). The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. Annals of Applied Biology, 139, 51–60.

Das, T., & Banerjee, A. (2018). Distribution, molecular characterization, and diversity of *Banana bunchy top virus* in Tripura, India. Virus Disease, 29(2), 157–166.

Delanoy, M., Salmon, M., Kummert, J., Frinson, E., & Lepoivre, P. (2003). Development of Real-Time PCR for the Rapid Detection of Episomal *Banana streak virus* (BSV). Plant Disease, 87(1), 33–38.

Dheepa, R., & Paranjothi, S. (2010). Transmission of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecting banana by aphid and mechanical methods. Emirates Journal of Food and Agriculture, 22(2), 117–129.

Doolittle, S. P. 1916. A new infectious mosaic disease of cucumber. Phytopathology 6:145–147.

Drew, R., Moisander, J., & Smith, M. (1989). The transmission of *Banana bunchy top virus* in micropropagated bananas. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 16, 187–193.

Fan, X., Du, Y., Cai, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Liang, J., Yang, D., Zhang, Q., Zhang,
X., Zhang, W., Xu, Y., & Zhao, K. (2018). Rapid and sensitive detection of *Cucumber mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 51(2), 223–226.

Furuya, N., Somowiyarjo, S., & Natsuaki, K. (2004). Virus Detection from Local Banana Cultivars and the First Molecular Characterization of *Banana bunchy top virus* in Indonesia By. Agricultural Science of Tokyo Union of Agriculture, 49(3), 75–81.

Galvez, L. C., Barbosa, C. F. C., Koh, R. B. L., & Aquino, V. M. (2020). Loopmediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Abaca bunchy top virus and Banana bunchy top virus* in abaca. Crop Protection, 131(September 2019).

Gayral, P., Lescot, M., Lheureux, F., Lockhart, B. E. L., Matsumoto, T., & Piffanelli, P. (2008). A Single *Banana streak virus* Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovirus. Journal of Virological Methods, 82(13), 6697–6710.

Geering, A. D. W., McMichael, L. A., Dietzgen, R. G., & Thomas, J. E. (2000). Genetic diversity among *Banana streak virus* isolates from Australia. Phytopathology, 90(8), 921-927. Giakountis, A., Tsarmpopoulos, I., & Chatzivassiliou, E. K. (2018). *Cucumber mosaic virus* isolates from Greek legumes are associated with satellite RNAs that are necrogenic for tomato. Plant Disease, 102(11), 2268–2276.

Gómez-Quintero, L. (1995). La producción de banano en América Latina. Revista de Ciencias Agrícolas, 13, 130–133.

González-Garza, R. (2017). Evolution of diagnostic technics for plant viruses. Revista Mexicana de Fitopatología, 35(3), 591–610.

Harper, G., Hart, D., Moult, S., & Hull, R. (2002). Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. Annals of Applied Biology, 141, 247–257.

Harper, G., Hart, D., Moult, S., Hull, R., Geering, A., & Thomas, J. (2005). The diversity of *Banana streak virus* isolates in Uganda. Archives of Virology, 150, 2407–2420.

Harper, G., Dahal, G., Thottappilly, G., & Hull, R. (1999). Detection of episomal *Banana streak badnavirus* by IC-PCR. Journal of Virological Methods, 79(1), 1–8.

Higginson, E. (2007). *Banana streak virus* (BSV): Características biológicas, epidemiología e importancia económica. Fitosanidad, 11(4), 61–69.

Higginson, J., González-Ramírez, E., Teycheney, J., & Yves, P. (2015). Caracterización molecular de secuencias endógenas infecciosas de *Banana streak virus* (eBSVs) en cultivares interespecíficos e híbridos de bananos y plátanos cultivados en Cuba. Fitosanidad, 19(3), 233–241. Hill, P. J., & Stewart, G. S. A. B. (1992). The polymerase chain reaction in molecular and micro-biology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 10(1), 343–377.

Hu, J., Li, P., Barry, K., & Wang, M. (1995). Comparison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR Assays for Detection of Two *Cucumber mosaic virus* Isolates Infecting Banana in Hawaii. Plant Disease, 79(9), 902–906.

Idan, F., & Koc, G. (2019). Occurrence ecology and phylogeny of *Banana streak virus* (BSV) and *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) in *Musa* sp. production areas of the Mediterranean coastline of Turkey. Applied Ecology and Environmental Research, 17(3), 5935–5951.

Iskra-Caruana, M., Chabannes, M., Duroy, P., & Muller, E. (2014). A possible scenario for the evolution of *Banana streak virus* in banana. Virus Research, 186, 155–162.

James, A., Geijskes, R., Dale, J., & Harding, R. (2011). Development of a Novel Rolling-Circle Amplification Technique to Detect *Banana streak virus* that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequences. Plant Disease, 95(1), 57– 62.

James, P., Kidanemariam, B., Hamill, D., Dale, L., & Harding, M. (2021). Infectivity of an infectious clone of *Banana streak CA virus* in a-genome bananas (*Musa acuminata* ssp.). Viruses, 13(6), 1–11.

Javer-Higginson, E., Acina-Mambole, I., González, E., Font, C., González, G., Echemendía, A., ... Teycheney, P. (2014). Occurrence, prevalence, and molecular diversity of Banana streak viruses in Cuba. European Journal of Plant Pathology, 138, 157–166.

Johari, S., & Majumder, S. (2015). An Efficient DNA Extraction Protocol for Successful PCR Detection of *Banana bunchy top virus* from Banana Leaves. Asian Journal of Biotechnology, 7(2), 80–87.

Jooste, A. E. C., Wessels, N., & Van der Merwe, M. (2016). First Report of *Banana bunchy top virus* in Banana (*Musa* spp.) from South Africa. Plant Disease, 100(6), 1251.

Kapoor, R., Srivastava, N., Kumar, R., Sharma, S. K., Rai, R., Kumar, S., & Baranwal, V. K. (2020). Detection of episomal *Banana streak Mysore virus* by reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay. Journal of Plant Pathology, 102(2), 499–503.

Kebede, Y., & Majumder, S. (2020). Molecular detection and first report of *Cucumber mosaic virus* infecting 'Cavendish' banana plants in Ethiopia. Journal of Plant Diseases and Protection, 1–4.

Kenyon, L., Chancellor, T., & Lamboll, R. (2003). Epidemiology, vector studies and control of *Banana streak virus* in East African highland bananas. UK.

Khaled, G. A., Wardany, A., & Mahmoud, Y. M. (2015). Coat protein gene of new isolate of *Cucumber mosaic virus* infecting banana in Egypt. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 05(02), 177–181.

Kouassi, N. K., Wendy, M., Boonham, N., & Smith, J. (2008, October). Development of a diagnostic protocol for *Cucumber mosaic virus* for screening banana (*Musa* spp.) planting material in Ivory Coast. Acta Horticulturae, 879, 547–552 Kumar, P. (2017). Cloning of BBTV (*Banana bunchy top virus*) components and screening of BBTV using functionalized gold nanoparticles. Biotech.

Kumar, P. (2020). Virus Detection in Banana Virus Detection in Banana. IITA, Nigeria.

Kreader, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Applied and Environmental Microbiology, 62(3), 1102–1106.

Lan, H., Lai, B., Zhao, P., Dong, X., Wei, W., Ye, Y., & Wu, Z. (2020). *Cucumber mosaic virus* infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. Microbial Pathogenesis, 138, 103828.

Lava-Kumar, P., Selvarajan, R., Chabannes, M., & Hanna, R. (2015). Biology, Etiology, and Control of Virus Diseases of Banana and Plantain. Control of Plant Virus Diseases (1st ed., Vol. 91). Elsevier Inc.

Leiva-Mora, M. (2006). Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa* spp. Biotecnología Vegetal, 6(3), 131–147.

Lestari, S. M., & Hidayat, S. H. (2020). Survey and detection of *Banana bunchy top virus* in Java. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 583(1).

Lheureux, F., Laboureau, N., Muller, E., Lockhart, B. E., & Iskra-Caruana, M. (2007). Brief Report Molecular characterization of *Banana streak acuminata vietnam virus*

isolated from *Musa acuminata siamea* (banana cultivar). Archives of Virology, 152, 1409–1416.

Liu, F., Feng, L., Chen, X., Han, Y., Li, W., Xu, W., Cai, B., & Lin, M. (2012). Simultaneous Detection of Four Banana Viruses by Multiplex PCR. Journal of Phytopathology, 160(11–12), 622–627.

Lockhart, B. (2002). Management of viral diseases of banana. In Acorbat.Memorias XV reunión Colombia: Asociación de Bananeros de Colombia.

Lockhart, B. E. (1995). *Banana streak badnavirus* infection in Musa: epidemiology, diagnosis and control. Taiwan: ASPAC Food & Fertilizer Technology Center.

Magnaye, L. V., & Valmayor, R. V. (1995). BBTV, CMV and other viruses affecting banana in Asia and the pacific. USA.

Majumder, S., & Johari, S. (2018). Development of a gold-nano particle based novel dot immunobinding assay for rapid and sensitive detection of *Banana bunchy top virus*. Journal of Virological Methods, 255, 23–28.

Mansoor, S., Qazi, J., Amin, I., Khatri, A., Khan, I. A., Raza, S., ... Briddon, R. (2005). A PCR-Based Method, With Internal Control, for the Detection of *Banana bunchy top virus*. Banana. Molecular Biotechnology, 30, 167–169.

Manzo-Sánchez, G., Ciencias, F. De, & Colima, U. De. (2016). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa* sp.) en México. Revista Mexicana de Fitopatología, 32(2), 89–107.

Martínez, A. M., & Hoyos, L. (2012). Manual para el cultivo de frutales en el trópico. Banano. Produmedios, Colombia.

Mederos, D. C., Zapata, M. J., Filipovich, J. V., & Nome, C. (2018). *Cucumber mosaic virus* infecting 'Cavendish' banana in Argentina. The Australian Plant Disease Notes, 13(1), 36.

Mendoza, R., & Fernando, A. (2017). Efecto biofungicida de aceites esenciales en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijensis*) en el cultivo de banano. Universidad Técnica de Machala.

Mikwamba, K., Dessein, J., & Kambewa, D. (2019). Fighting *Banana bunchy top* disease in Southern Malawi. The interface of knowledge systems and dynamics in a development arena. The Journal of Agricultural Education and Extension, 1–20.

Mocha-Cuenca, B. (2018). Badnavirus, protocolo de diagnóstico, en las bananeras de El oro, Ecuador. Revista Científica Agroecosistemas, 6(3), 18–24.

Mungai, G., Ateka, E., Nyende, A., & Miano, D. (2015). Evaluation of In Vitro Protocols for Elimination of *Banana streak virus* from Tissue Cultured Explants in Banana Seedling Production. Current Research in Agricultural Sciences, 2(3), 81–89.

Niyongere, C., Lepoint, P., Loaenge, T., Blomme, L., & Milinda, E. (2015). Towards understanding the diversity of *Banana bunchy top virus* in the Great Lakes region of Africa. African Journal of Agricultural Research, 10(7), 702–709. Onsarigo, M. N. (2017). Assessment of *Banana streak MY virus*-based infectious clone vectors in *Musa* ssp. Centre for Tropical Crops and Biocommodities Science and Engineering Faculty.

Palukaitis, P., Roossinck, M., Dietzgen, R., & Francki, R. (1992). Cu*cumber mosaic virus*. Advances in Virus Research, 41, 281–348.

Patil, B. L. (2020). Plant Viral Diseases: Economic Implications. Reference Module in Life Sciences. India: Elsevier Ltd, USA.

Pavithra, B. S., Govin, K., Renuka, H. M., Krishnareddy, M., Jalali, S., Samuel, D.
K., & Himabindu, K. (2019). Characterization of *Cucumber mosaic virus* infecting coleus (*Plectranthus barbatus*) in Karnataka. Virus Disease, 30(3), 403–412.

Peng, J., Shi, M., Xia, Z., Huang, J., & Fan, Z. (2012). Detection of *Cucumber mosaic virus* isolates from banana by one- step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology, 157, 2213–2217.

Persley, D. (2012). Integrated Viral Disease Management in Vegetable Crops.

Rahayuniati, R. F., Subandiyah, S., Hartono, S., Somowiyarjo, S., Kurniawan, R. E. K., Prakoso, A. B., Crew, K., Vance, M. E., Ray, J. D., & Thomas, J. E. (2021). Recent distribution and diversity analysis on *Banana bunchy top virus* of banana and alternative host in Indonesia. Tropical Plant Pathology, 46(5), 506–517.

Ramírez, P., & Rivera, C. (1998). Status of *Banana streak virus* in Costa Rica. *Banana streak virus*: a unique virus-Musa interaction? (pp. 52–54). France: International Plant Genetic Resources Institute.

Rao, X. Q., Wu, Z. L., Wang, W., Zhou, L., Sun, J., & Li, H. P. (2020). Genetic diversity analysis reveals new badnaviruses infecting banana in South China. Journal of Plant Pathology, 102(4), 1065–1075.

Rasoulpour, R., Afsharifar, A., & Izadpanah, K. (2016). Partial biological and molecular characterization of a *Cucumber mosaic virus* isolate naturally infecting Cucumis melo in Iran. VirusDisease, 27(2), 193–197.

Rivas, G., & Rosales, F. (2003). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. International Plant Genetics Resources Institute.

Rivera, P, Ramírez, P., Pereira, P. (1992). Preliminary Characterization of Viruses Infecting Banana in Costa Rica, Proceedings of the Workshop on Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement. INIBAP.

Roossinck, M. J. (2002). Evolutionary History of *Cucumber mosaic virus* deduced by Phylogenetic Analyses. Journal of Virology, 76(7), 3382–3387.

Ruiz-Villalba, A., van Pelt-Verkuil, E., Gunst, Q. D., Ruijter, J. M., & Van Den Hoff,M. J. (2017). Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). Biomolecular Detection and Quantification, 14, 7–18.

Rybicki, E. P. (2015). A Top Ten list for economically important plant viruses. Archives of Virology, 150, 17–20.

Rybicki, E. P., & Pietersent, G. (1999). Plant virus disease problems in the developing world. Advances in Virus Research, 53, 127–175.

Selvarajan, R., Balasubramanian, V., & Gayathrie, T. (2016). Highly Efficient Immunodiagnosis of Episomal *Banana streak MY virus* Using Polyclonal Antibodies Raised Against Recombinant Viral-Associated Protein. Journal of Phytopathology, 164(7–8), 497– 508.

Selvarajan, R., Balasubramanian, V., Kavitha, K., Kavitha, K., Sathiamoorthy, S., & Ahlawat, Y. (2008). Detection of *Banana bunchy top virus* and Banana streak mysore virus by PCR: Impact of storing virus infected banana samples. Indian Journal of Virology, 19(2), 155–159.

Selvarajan, R., Balasubramanian, V., & Sasireka, T. (2015). A simple, rapid and solvent free nucleic acid extraction protocol for detection of *Banana bunchy top virus* by polymerase chain reaction and loop-mediated isothermal amplification. European Journal of Plant Pathology, 142(2), 389–396.

Selvarajan, R., Sheeba, M., Balasubramanian, V., Rajmohan, R., Lakshmi-Dhevi, N., & Sesireka, T. (2011). Molecular Characterization of Geographically Different *Banana bunchy top virus* Isolates in India. Indian Journal of Virology, 21(2), 110–116.

Sharma, S. K., Vignesh Kumar, P., Geetanjali, A. S., Pun, K. B., & Baranwal, V. K. (2015). Subpopulation level variation of banana streak viruses in India and common evolution of banana and sugarcane badnaviruses. Virus Genes, 50(3), 450–465.

Singh, Z., Jones, R., & Jones, M. G. K. (1995). Identification of *Cucumber mosaic virus* Subgroup I Isolates from Banana Plants by Infectious Chlorosis Using RT-PCR. Plant Disease, 79(7), 713–716.

Smith, M. C., Holt, J., Kenyon, L., & Foot, C. (1998). Quantitative epidemiology of *Banana bunchy top virus* disease and its control. Plant Disease, 47, 177–187.

Spiegel, S., Scott, S. W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N. N., & Rosner, A. (1996). Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology, 102(7), 681-685.

Srivastava, N., Kapoor, R., Kumar, R., Kumar, S., & Saritha, R. (2019). Rapid diagnosis of *Cucumber mosaic virus* in banana plants using a fluorescence-based real-time isothermal reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay. Journal of Virological Methods, 270, 52–58.

Stanier, R. Y., & Villanueva, J. R. (1996). Microbiología. Reverté, España.

Stainton, D., Martin, D. P., Muhire, B. M., Lolohea, S., Halafihi, M., Lepoint, P., Varsani, A. (2015). The global distribution of *Banana bunchy top virus* reveals little evidence for frequent recent, human-mediated long-distance dispersal events. Virus Evolution, 1(1), 1–16.
Stanković, I., Vučurović, A., Zečević, K., Petrović, B., Nikolić, D., & Delibašić, G. (2021). Characterization of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNAs associated with tomato lethal necrosis in Serbia. European Journal of Plant Pathology, 160(2), 301–313.

Susan-Tepletlan, P., Noa-Carrazana, J., Flores-Estevéz, N., & Córdova-Nieto, C. (2016). Una Amenaza Dormida: El Virus del Rayado del Plátano. Temas de Ciencia y Tecnología, 20(58), 3–7.

Tanuja, N., Ramanathan, A., Varanavasiappan, S., Devi, E. K., Arul, L., Sudhakar,
D., Kumar, K. K. (2019). Real Time PCR-Based Quantification of *Banana bunchy top virus*(BBTV) Titre in Banana cv. Grand Naine (*Musa acuminata*). Advances in Research, 20(4), 1–7.

Tatsuji, H., Kazuko, A., & Shikata, E. (1994). Virological methods A PCRmicroplate hybridization method for plant virus detection. Journal of Virological Methods, 46, 223–236.

Thiele, D. (1991). Polymerase chain reaction (PCR) and applications. Immunitat Und Infektion, 19(5), 138–142.

Thomas, J. E. (2015). MusaNet Technical Guidelines for the Safe Movement of *Musa* Germplasm. In Bioversity International (Ed.), Bioversity International (Issue 20).

Thompson, J. R., Langenhan, J. L., Fuchs, M., & Perry, K. L. (2015). Genotyping of *Cucumber mosaic virus* isolates in western New York State during epidemic years: Characterization of an emergent plant virus population. Virus Research, 210, 169–177.

Trinh, L., McCutchen, D., Bonner-Fraser, M., Fraser, S., Bumm, L., & McCauley, D. (2007). Short Technical Reports. Bio Techniques, 42(6).

Tripathi, J., Ntui, V., Ron, M., Muiruri, S., Britt, A., & Tripathi, L. (2019). CRISPR/Cas9 editing of endogenous *Banana streak virus* in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. Communications Biology, 2(46), 1–11.

Tripathi, S., Patil, B., & Verma, R. (2016). Viral Diseases of Banana and Their Management. In Plants Evolution and Management. Springer. USA

Tzean, Y., Lee, M., Jan, H., Chiu, Y., Tu, T., Hou, B., Yeh, H. (2019). *Cucumber mosaic virus*-induced gene silencing in banana. Science Reports, 9.

Valachas, C. A., Giantsis, I. A., Sareli, K., Winter, S., Zelezniakof, E., Pentheroudaki, Z., & Chatzivassiliou, E. K. (2021). Molecular analysis of Greek isolates of *Cucumber mosaic virus* from vegetables shows a low prevalence of satellite RNAs and suggests the presence of host-associated virus strains. Archives of Virology, 166(8), 2199–2208.

Valencia-Morales, H. (2016). Cogollo racimoso del banano.

Van Regenmortel, M. H., & Mahy, B. W. (Eds.). (2009). Desk encyclopedia of plant and fungal virology. Academic Press. USA.

Vargas-Céspedes, A., Watler, W., Morales, M., & Vignolal, R. (2017). Prácticas efectivas para la reducción de impactos por efectos climáticos en el cultivo de banano en Costa Rica. Costa Rica.

Viejó-Barzola, H. (2020). Manejo integrado del virus del rayado (*Banana streak virus*-BSV). Universidad Técnica de Babahoyo.

Villegas-Estrada, B., Cañas, G., & López, N. (2011). Enfermedades virales de los cultivos de plátano y banano en el Eje Cafetero, diagnóstico y manejo. Colombia: Editorial Tizán.

Waliullah, S., Fonsah, E. G., Ji, P., & Ali, M. E. (2020). First report of *Banana streak virus* infecting bananas (*Musa* spp.) in Georgia, U.S.A. Plant Disease, 104(4), 2–4.

Wickramaarachchi, W. A. R. T., Shankarappa, K. S., Rangaswamy, K. T., Maruthi, M. N., Rajapakse, R. G. A. S., & Ghosh, S. (2016). Molecular characterization of *Banana bunchy top virus* isolates from Sri Lanka and its genetic relationship with other isolates. Virus Disease, 27(2), 154–160.

Xiao, L., Alderisio, K., & Singh, A. (2006). Development and standardization of a *Cryptosporidium* genotyping tool for water samples (Vol. 91101). American Water Works Association.

Xie, W. S., & Hu, J. S. (1995). Molecular cloning, sequence analysis, and detection of *Banana bunchy top* virus in Hawaii. Phytopathology, 85(3), 339-347.

Zhang, J., Borth, W., Lin, B., Melzer, M., Shen, H., Pu, X., Sun, D., Nelson, S., & Hu, J. (2018). Multiplex detection of three banana viruses by reverse transcription loopmediated isothermal amplification (RT-LAMP). Tropical Plant Pathology, 43(6), 543–551. Zucha, D., Androvic, P., Kubista, M., & Valihrach, L. (2020). Performance comparison of reverse transcriptases for single-cell studies. Clinical Chemistry, 66(1), 217–228.