

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Detección del virus TSWV por medio de la técnica molecular RT-PCR en *Chrysanthemum* spp. provenientes del municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.

Wendy Carolina Argueta Marroquín

Guatemala

2007

Detección del virus TSWV por medio de la técnica molecular RT-PCR en *Chrysanthemum* spp. provenientes del municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Detección del virus TSWV por medio de la técnica
Molecular RT-PCR en *Chrysanthemum* spp. provenientes del
municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.

Trabajo de investigación presentado por
Wendy Carolina Argueta Marroquín para optar al grado
académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2007

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Vo.Bo.:

(f) 
Licenciada Margarita Palmieri

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciada Margarita Palmieri

(f) 
Pamela Marie Pennington Ph.D

(f) 
Licenciado Luis Eduardo Martínez

Fecha de aprobación del examen: Guatemala, 12 de diciembre 2007

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE FÓRMULAS.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
A. Cultivo del crisantemo (<i>Chrysanthemum</i> spp.).....	3
1. Origen.....	3
2. Taxonomía y morfología.....	3
3. Importancia económica y distribución geográfica.....	3
B. Virus del Bronceado del Tomate (TSWV).....	6
1. Historia de TSWV.....	6
2. Morfología.....	7
3. Biología y transmisión de TSWV.....	9
4. Vectores de TSWV.....	11
5. Hospederos de TSWV.....	15
6. Síntomas causados por TSWV.....	16
7. Medidas de control.....	17
C. Detección e identificación de TSWV.....	18
1. Métodos de detección.....	18
a. ELISA.....	18
b. Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	19
D. Validación de pruebas diagnósticas.....	21
1. Sensibilidad y especificidad.....	22
2. Razones de probabilidad.....	23

III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. OBJETIVOS.....	26
A. General.....	26
B. Específicos.....	26
V. HIPÓTESIS.....	22
VI. MÉTODOS.....	28
A. Procedimiento.....	28
1. Sitio de colecta de muestras de crisantemos.....	28
2. Colecta y transporte de las muestras.....	28
3. Almacenamiento de las muestras.....	29
4. Tabulación de datos de campo e identificación de las muestras.	29
5. Extracción de ARN de las muestras de crisantemo.....	29
6. Extracción de ARN a partir de las muestras de crisantemo.....	30
7. Síntesis de ADNc por transcripción reversa acoplada (RT).....	30
8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
9. Electroforesis en agarosa.....	32
10. Detección de los productos de PCR en gel de agarosa...	32
11. Purificación y secuenciación del fragmento amplificado con el método de RT-PCR implementado.....	32
12. Detección del virus TSWV por ELISA directo.....	32
13. Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
A. Sitio y método de colecta, transporte y almacenamiento de la muestra.....	35
B. Estandarización del protocolo para la detección del virus TSWV en crisantemos.....	36
1. Método de extracción.....	36

2. Método para reacción transcripción reversa (RT).....	38
3. Método para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
C. Determinación del método adecuado para la extracción del ARN viral del virus TSWV.....	42
D. Parámetros de la sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA para la detección del virus TSWV en crisantemo.....	44
VIII. CONCLUSIONES.....	48
IX. RECOMENDACIONES.....	49
X. LITERATURA CITADA.....	50
XI. APÉNDICES.....	54
A. Boleta de colecta en campo.....	54
B. Método de extracción según Locali <i>et al.</i> (2003).....	54
C. Método de extracción según Lee (2003).....	55
D. Método de RT-PCR según el kit Access RT-PCR Systems, Promega©.....	55
E. Método de RT-PCR según Boletín EPPO (2004).....	56
F. Método de RT-PCR según el Kit Reverse Transcription System, Promega©.....	56
G. Método de PCR según Boletín EPPO (2004).....	56
H. Método de PCR según Kit Reverse Transcription System, Promega.	57
I. Preparación del buffer TAE IX.....	57
J. Preparación de Buffer de Extracción Directo para ELISA.....	57
K. Cálculo del tamaño de muestra utilizando el programa R Development Core Team (2007).....	57
L. Fotografías del tejido vegetal muestreado.....	58
M. Secuencia del fragmento L del genoma del virus TSWV y los sitios	

de unión de los iniciadores utilizados para la detección.....	59
N. Resultados de la detección del virus TSWV en crisantemos utilizando dos métodos de extracción diferentes.....	61
O. Secuenciación del fragmento amplificado utilizando la técnica RT- PCR.....	62
P. Resultados de la detección del virus TSWV en crisantemos utilizando la técnica ELISA.....	65
Q. Secuencia de trabajo recomendado por el Boletín EPPO.....	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Localidades que productoras de crisantemo en el municipio de San Juan Sacatepéquez.....	5
2. Forma usual de presentar los resultados de una validación para pruebas diagnósticas.....	22
3. Pares de iniciadores utilizados para la detección del virus TSWV y del segmento 5S del ARN ribosomal de planta.....	30
4. Protocolo de transcripción reversa con Kit Access RT-PCR Systems, Promega© para la detección del virus TSWV.....	39
5. Protocolo de PCR según instrucciones del Boletín EPPO (2004) para la detección del virus TSWV.....	40
6. Comparación entre dos métodos de extracción diferentes utilizando la prueba estadística χ^2	42
7. Comparación de los resultados para la detección de TSWV en crisantemos utilizando dos métodos diferentes.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Plantaciones de ornamentales en el Municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.....	5
2. Organización del genoma y estrategias de expresión del ARN de TSWV.....	8
3. Estructura del virus TSWV.....	9
4. Micrografías electrónicas de la fusión del virus en el intestino de <i>Frankliniella occidentalis</i> en su estadio larvario.....	11
5. Ciclo de vida del vector trips y de transmisión de Tospovirus.....	13
6. Representación esquemática del tracto intestinal y posición de las glándulas salivales de <i>F. occidentalis</i>	14
7. Síntomas característicos de la infección por TSWV en hojas de diferentes plantas.....	16
8. Síntomas de infección por TSWV en crisantemos.....	17
9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
10. Diagrama de flujo para la detección de TSWV en crisantemos.....	29
11. Detección de TSWV en crisantemos cultivados como control positivo.....	41
12. Curva ROC para la validación de la técnica RT-PCR.....	46
13. Muestras colectadas para la detección del virus TSWV (fotografías tomadas en los invernaderos del Municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala).....	58
14. Detección del genoma viral en productos extraídos utilizando método Locali <i>et al.</i> (2003).....	61
15. Detección del genoma viral en productos extraídos utilizando método Lee (2003).....	61
16. Productos positivos extraídos según método Locali <i>et al.</i> (2003).....	62
17. Resultados para la prueba de ELISA.....	65

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula	Página
1. Fórmula para determinar sensibilidad.....	22
2. Fórmula para determinar especificidad.....	22
3. Fórmula para determinar valor predictivo positivo.....	23
4. Fórmula para determinar valor predictivo negativo.....	23
5. Determinación del tamaño de la muestra según la prueba de probabilidad.....	33

RESUMEN

Desde su aparición en 1915 el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV por sus siglas en inglés) ha causado varias pérdidas en cultivos como lechuga, tomate y flores ornamentales, entre un gran rango de hospederos que tiene este virus. En Guatemala el crisantemo es uno de los cultivos con mayor importancia económica, siendo el municipio de San Juan Sacatepéquez uno de los mayores productores al contar con más de 500 invernaderos de plantas de corte. En los últimos años este cultivo se ha visto afectado por varios patógenos, por lo que se han iniciado estudios para determinar su identidad. Utilizando la técnica de ELISA, diagnóstico realizado en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, se ha detectado la presencia del virus TSWV en las plantaciones de San Juan Sacatepéquez. Este trabajo tiene por objetivo la implementación de la técnica molecular RT-PCR como prueba de diagnóstico capaz de detectar el genoma del virus TSWV en extractos de tejido vegetal de crisantemo. Además, busca verificar la confiabilidad de la técnica de ELISA, prueba de referencia utilizado dentro del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, para la detección de este virus.

Durante el proceso de estandarización se observó que el paso determinante para lograr la detección del virus es el método de extracción de su genoma. El método que mostró ser más sensible es el sugerido por Locali *et al.* (2003). De igual forma, la manipulación de las muestras es importante para no degradar el ARN viral ya que es muy susceptible. Se determinaron los parámetros de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA utilizando veinte muestras de crisantemo colectadas en el municipio de San Juan Sacatepéquez. La determinación se realizó empleando la Curva ROC utilizando los resultados generados por la prueba de ELISA y por la técnica de RT-PCR estandarizada. Se determinó que la técnica de ELISA es aceptable en términos de especificidad (85.0 %) pero no así en términos de sensibilidad (62.5 %). Esto sugiere que la técnica genera resultados positivos confiables; sin embargo, podrían generarse resultados falsos negativos. Con base en esto es necesario establecer una secuencia de trabajo que se inicie realizando la detección del virus con la prueba de ELISA y luego por la técnica de RT-PCR, con especial enfoque en las muestras con

resultado negativo por ELISA. Se recomienda que los resultados obtenidos por este estudio exploratorio sean empleados con criterio, y en un futuro se dé continuidad al proyecto considerando las recomendaciones planteadas en este trabajo.

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente, los cultivos de crisantemo y otras flores de corte, se han visto afectados por enfermedades virales, siendo uno de los causantes más importante el Virus del Bronceado de Tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV según sus siglas en inglés). Este virus posee un amplio rango de hospederos, pudiendo infectar a más de 600 especies diferentes de plantas. Algunos de los síntomas que causa este virus son: necrosis, clorosis (amarillamiento) o anillos de algún patrón específico en las hojas, aunque también se pueden observar en el tallo, acolochamiento hacia debajo de las hojas, deformación de la vena central y, en general, la planta es más pequeña que una planta sana (enanismo) (Whitfield *et al.* 2005).

La enfermedad, también conocida como marchitez manchada o bronceado del tomate fue descrita por primera vez en Australia en 1915 y en 1930 se identificó al agente causal: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Este virus es uno de los más alarmantes para los agricultores y horticultores ya que ha causado varias epidemias mundiales (Inoue 2006). El virus TSWV es transmitido por los insectos de la familia Thripidae (Thysanoptera) que al ser polífagos y poder sobrevivir a ambientes variados, son capaces de transmitir el virus a un número amplio de plantas (EPPO/CABI 2007). Actualmente, en el municipio San Juan Sacatepéquez, Guatemala, el virus TSWV está causando pérdidas en el cultivo de crisantemos que representa el 50% de la actividad agrícola de esta región (Mejía 2006). Durante el año 2006 en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala se determinó por medio de la técnica ELISA que uno de los patógenos que están afectando a los crisantemos es el virus TSWV.

Este es un estudio preliminar que sugiere la utilización de la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa) como método de diagnóstico para el virus TSWV en tejido vegetal de crisantemo. Se propone utilizar esta técnica molecular por su alta sensibilidad y confiabilidad. La primera etapa del proyecto fue implementar el método para lograr el diagnóstico del virus. El método consistió en la extracción del ácido nucleico que forma el genoma viral, la amplificación por RT-PCR y detección del genoma viral por electroforesis en gel de agarosa. Al haber logrado la estandarización del método, se determinó la

especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA. Al comparar los resultados de esta prueba con los obtenidos por la técnica de RT-PCR para las mismas muestras.

II. ANTECEDENTES

A. Cultivo del crisantemo (*Chrysanthemum* spp.)

1. **Origen.** En China el crisantemo es empleado como ornamental desde hace más de dos mil años; su cultivo se trasladó a Japón donde se convirtió en una flor santa que recibía una veneración divina. Actualmente, se utiliza en ceremonias ya que es símbolo de una vida larga. Esta planta ornamental fue introducida en Europa en el último tercio del siglo XVIII. Los primeros cultivos en España coinciden con el inicio en el siglo XIX. El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo. La mayoría de las especies de donde se han generado los cultivos actuales son originarias de China, estas especies son: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum x hortorum*. El crisantemo en maceta es denominado *Dedranthema* (Mejía 2006).

2. **Taxonomía y morfología.** El género *Chrysanthemum* pertenece a la familia *Asteraceae* y engloba a las más antiguas flores cultivadas. Las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas. Según su forma las inflorescencias se pueden clasificar en: Sencillas (tipo margarita) compuestas de una o dos hileras de flores radiales y con flores hermafroditas centrales; tipo anémonas que son similares a las sencillas pero con flores concéntricas tubulares y alargadas; tipo araña, pluma, cuchara o hirsuta que poseen flores radiales que se curvan y son tubulares; y los denominados pompones en forma globular, constituidos por flores radiales cortas, uniformes y no presentan flores concéntricas (Mejía 2006).

3. **Importancia económica y distribución geográfica.** El crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas en todo el mundo. Una de las ventajas de este cultivo es su floración tardía, dando ventajas cuando las otras plantas de flor decaen en el otoño. Hay crisantemos de floración veraniega o temprana que florecen en respuesta a temperaturas cálidas, mayores o iguales a 15 °C, independientemente de la longitud del día y florecen todo el año. Al crisantemo se le ha dado otros usos, por ejemplo en varias partes de Asia las flores amarillas o blancas de los crisantemos

se hierven para hacer una bebida dulce que luego es comercializada. La bebida se conoce como "té de crisantemo" el cual posee múltiples usos medicinales como: reducir el dolor de garganta y fiebre, ayuda para recuperarse de gripe, se ha utilizado para tratar a personas con problemas circulatorios como venas varicosas y arterosclerosis (Hadidi *et al.* 2005).

Además, el crisantemo se usa como insecticida natural. Las flores secas se pulverizan y los compuestos activos, piretrinas, contenidos en las cáscaras de las semillas, se extraen y se venden en la forma de una oleoresina. Las piretrinas atacan el sistema nervioso de todos los insectos e inhiben a las hembras de mosquitos a picar, por lo que tienen un efecto repelente para insectos (Hadidi *et al.* 2005).

Aunque el crisantemo tiene varios usos, su importancia económica se basa en su utilización como flor ornamental. La producción es importante en varios países europeos (Países Bajos, Gran Bretaña y Francia), Colombia, Estados Unidos y Canadá donde desde hace mucho tiempo es un cultivo industrializado. En Japón la flor del crisantemo alcanza un valor simbólico. En el centro de Europa, Japón y Estados Unidos el crisantemo siempre ha tenido una gran demanda por lo que los trabajos de mejora genética son importantes y han dado lugar a numerosos cultivares con formas y colores diferentes. Después de la rosa, el crisantemo sigue siendo la flor cortada más vendida en las subastas holandesas de flores. Desde la diversificación de muchas formas hortícolas, el crisantemo puede actualmente ser comercializado casi todo el año como flor cortada y como planta ornamental en maceta. El número de colores y formas de flor del crisantemo de maceta sigue aumentando (Mejía 2006).

En Guatemala, el municipio de San Juan Sacatepéquez es conocido como uno de los principales productores de flores a nivel nacional. Este departamento es uno de los mayores productores de crisantemo, se formó una Asociación de Floricultores de San Juan (ASOFLORSA). Hasta el momento, dicha asociación tiene registrados un total de 2000 invernaderos donde se cultivan diferentes especies de flores, entre ellas cuatro tipos de crisantemo que comúnmente se les conoce como: Shasta o tipo Margarita, Anémonas, Araña y el cuarto comúnmente conocido como "pompón" (Figura 1). La venta de crisantemo representa un ingreso económico significativo para los agricultores de esta región (Reyes 2007).

Figura 1. Plantación de ornamentales en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.



Según ASOFLORSA, actualmente existen seis comunidades que se dedican a la producción de crisantemo, Comunidad de Zet, Comunidad de Ruiz, Cruz Blanca, Loma Alta, Camino de San Pedro y Sajcavillá. En dichas comunidades se encuentran 500 invernaderos que se dedican a la producción de crisantemo. La distribución de los invernaderos en las aldeas es de la siguiente forma:

Cuadro 1. Localidades productoras de crisantemo en el municipio de San Juan Sacatepéquez (ASOFLORSA).

Aldea	Numero de invernaderos
Comunidad de Zet	50
Comunidad de Ruiz	45
Cruz Blanca	55
Loma Alta	125
Camino de San Pedro	110
Sajcavillá	115
TOTAL:	500

El municipio de San Juan Sacatepéquez posee una latitud norte de 14°43'02" y longitud oeste de 90°38'34". Su extensión territorial es de 242 km² y se encuentra a 32 km de la capital. Limita al norte con Granados (Baja Verapaz), al este con San Raymundo (San Pedro Sacatepéquez, departamento de Guatemala) al oeste con San Martín Jilotepeque, El Tejar Chimaltenango y Santo Domingo Xenacoj del departamento de Sacatepéquez. Para San Juan Sacatepéquez la zona de vida es Bosque Húmedo Montano Bajo Subtropical (bh-MB) con temperaturas que oscilan de 15 a 23°C, la precipitación pluvial anual varía entre 1057 a 1588 mm con promedio de 1344 mm distribuido de mayo a noviembre (Reyes 2007).

El crisantemo es un cultivo que se ve afectado por plagas, debiéndose mantener un especial énfasis en la sanidad, dado a que se vende calidad tanto de flores como de follaje (Mejía 2006). Entre las enfermedades más importantes se encuentran las royas. Los patógenos que comúnmente afectan a estas plantas son: *Pseudomonas cichorii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia chrysanthemi*, *Stemphylium* sp., *Alternaria* sp., *Erysiphe cichoracearum*, *Puccinia horiana*, *Puccinia chrysanthem*, *Septoria obesa* o *S. Chrysanthemella*, *Ascochyta chrysanthemi*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solana* y *Pythium* spp. Actualmente, se ha detectado por la sintomatología generada y por diagnóstico utilizando la técnica de ELISA, la presencia del virus del Bronceado del Tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV por sus siglas en inglés) lo que ha causado pérdidas en la producción de crisantemos (Reyes 2007).

B. Virus del Bronceado del Tomate (TSWV)

1. Historia de TSWV. La enfermedad conocida como marchitez manchada o bronceado del tomate fue descrita por primera vez en Australia en 1915. Los insectos trips fueron implicados como vectores causantes de la enfermedad años después. En 1930, Samuel *et al.* (1930) demostró que el virus, el cual llamaron *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV por sus siglas en inglés) o virus del Bronceado del Tomate, era el agente causal de la enfermedad. Cincuenta años más tarde, Francki *et al.* (1985) observaron la semejanza entre el virus TSWV y los virus de la familia *Bunyaviridae* y género *Tospovirus*. Esta familia de virus es transmitida por artrópodos e infectaba

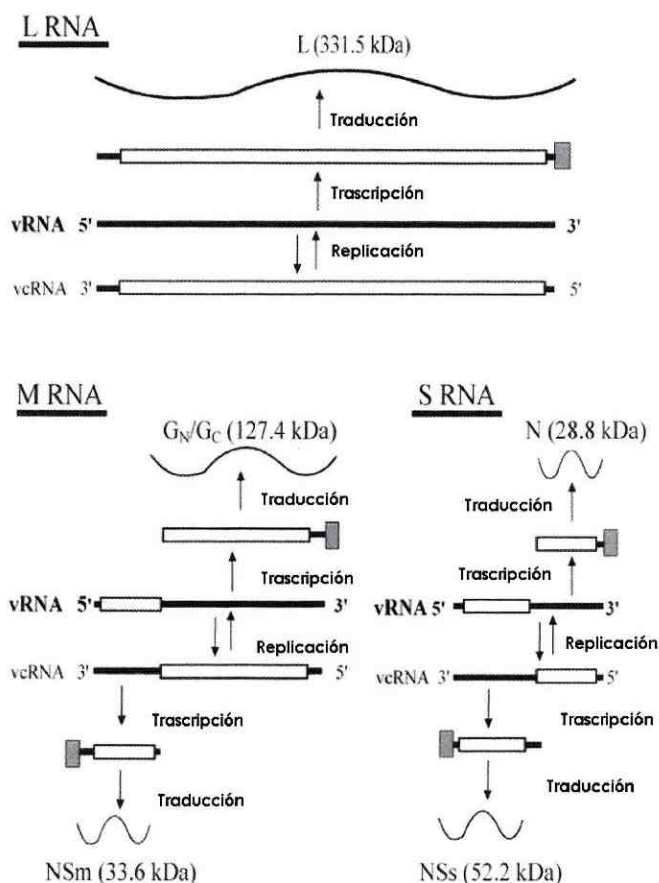
animales regularmente. Este virus, el TSWV, era el primer virus de esta familia que afectaba a plantas (Whitfield *et al.* 2005). Estos virus son partículas esféricas con cápside y envoltura. El genoma de este virus es ARN sentido negativo con un diámetro aproximadamente de 80-100nm (Cordeiro *et al.* 2006).

2. Morfología. El genoma del virus TSWV está compuesto por tres cadenas simples de ARN negativas o ambisentido designadas S (2.9 kb), M (4.8 kb) y L (8.9 kb). El ARN genómico es una cadena, de aproximadamente 60 pares de bases (pb), que se encuentra unido por sus extremos 3' y 5' al ser complementarios en su secuencias (Whitfield *et al.* 2005). La secuencia del extremo 5' está compuesta por regiones conservadas de 8 nucleótidos (5'-AGAGCAAU...) al igual que el extremo 3' (3'-UCUCGUUA...) (Büchen-Osmond 2003).

En cuanto a la organización y estrategias de expresión se sabe que la hebra ambisentido S del genoma viral codifica para proteínas no estructurales que no se presentan en las partículas virales maduras (NSs de 52.4k Da) en la hebra de ARN sentido; y además codifica para la nucleoproteína (N de 29 kDa) en la hebra sentido complementaria. Ambas proteínas se expresan por la traducción de ARN subgenómico estable que terminan en una estructura de "hairpin". Se cree que las proteínas no estructurales actúan en el silenciamiento del ARN durante la fase de infección a la planta. La nucleoproteína contribuye a la replicación del virus, tanto en forma, estructural como durante la regulación, donde participan los complejos de ribonucleoproteínas que conllevan a la iniciación de la transcripción y replicación viral (Figura 2) (Whitfield *et al.* 2005).

La hebra M del ARN codifica para otra proteína no estructural (NSm de 33.6 kDa) en la hebra sentido y una proteína (127.4 kDa) precursora de las glicoproteínas de membrana, en la hebra complementaria a la hebra sentido. La proteína NSm tiene la función de formar túbulos que permiten el movimiento de proteínas y otros componentes virales entre células. Las glicoproteínas G_N y G_C son traducidas como poliproteínas a partir de un solo marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) del ARNm transcrito a partir de la hebra complementaria a la hebra ARN sentido. Esta poliproteína es cortada en la ausencia de varias proteínas virales para producir componentes individuales de la membrana (Figura 2) (Whitfield *et al.* 2005).

Figura 2. Organización del genoma y estrategias de expresión del ARN de TSWV. vARN representa la hebra sentido de ARN y vcARN, al ARN complementario sentido. Los cuadros en blanco representan marcos abiertos de lectura.



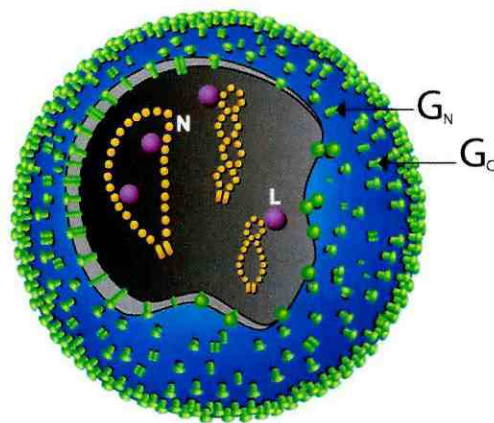
La hebra L del genoma es de sentido negativo y posee un ORF en la hebra complementaria que codifica para una proteína de 331 kDa (L) (Figura 2). El análisis de la secuencia y de la función de esta proteína ha revelado que funciona como una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp por sus siglas en inglés). La proteína RdRp del virus TSWV es característica al ser multifuncional ya que posee actividad de nucleasa, polimerasa y helicasa (Whitfield *et al.* 2005).

El virus TSWV posee una doble membrana proveniente del hospedero, pero el virus codifica para las proteínas virales G_N y G_C que se proyectan de la superficie con configuraciones monoméricas y diméricas (Figura 3). La cubierta del virus contiene ribonucleoproteínas compuestas por ARN de simple hebra encapsulados por la

nucleoproteína (N) y varias copias de la polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp o proteína L) (Whitfield *et al.* 2005).

En total el material genético corresponde al 5% del peso del virus y las proteínas que sintetiza, al 70%. Recombinaciones de los segmentos puede contribuir a la diversidad del virus, en especial respecto a la expresión de síntomas en diferentes hospederos, propiedades serológicas y adaptabilidad del virus a nuevos hospederos y nuevos ambientes (EPPO/CABI 2007).

Figura 3. Estructura del virus TSWV.



(Whitfield *et al.* 2005).

3. Biología y transmisión de TSWV. Este virus es uno de los más alarmantes para los agricultores y horticultores ya que ha causado varias epidemias mundiales (Inoue 2006). TSWV ha sido un virus que ha devastado la industria agrícola, al inicio se toleraron las pérdidas en lechuga y tomate porque las epidemias se daban únicamente durante el verano. Sin embargo, el problema se hizo más serio forzando a varios agricultores a cambiar o retirarse por completo de la producción de estos cultivos. Actualmente, las pérdidas que causa este virus en los cultivos de lechuga son del 50-75%. El virus TSWV es transmitido por los insectos de la familia *Thripidae* (Thysanoptera) ya que, al estar infectados, introducen el virus a la planta al alimentarse de sus hojas. El menor tiempo de adquisición del virus es de 15 minutos por *T. tabaci*, pero la eficiencia de transmisión aumenta con el número de veces que el vector se alimenta de la planta (EPPO/CABI 2007). Se ha observado que la tasa de transmisión depende del estadio reproductivo, preferencias del hospedero y la población geográfica (Inoue 2006).

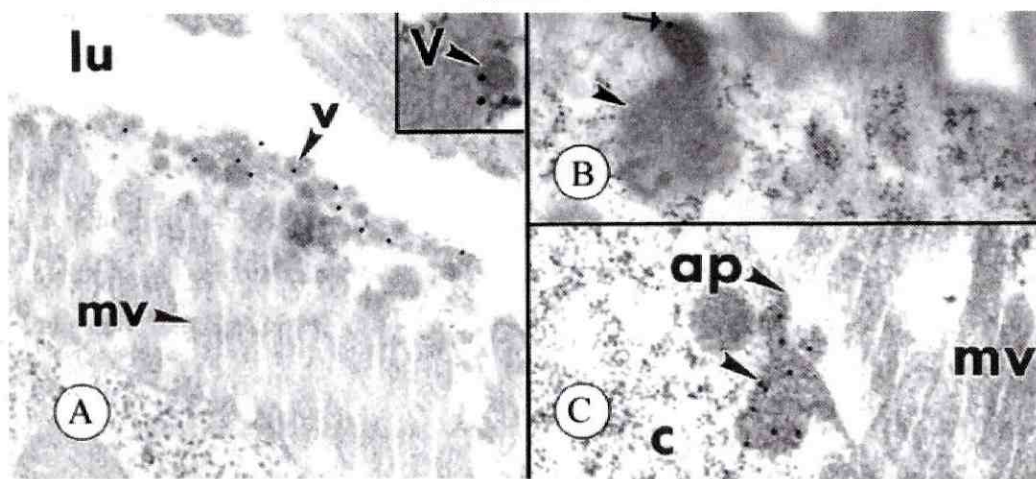
La entrada del virus a las células del hospedero se da luego de varios pasos que culminan con la fusión de las membranas del virus y del hospedero. Los virus se unen a las moléculas de las células del hospedero y la entrada del virus ocurre por dos mecanismos: el primero depende del pH y el segundo es independiente del pH. La vía de entrada del virus que depende del pH empieza con la unión del virus seguida por la fusión directa de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula del hospedero (Whittaker 2002).

La evidencia indica que algunos de los miembros de la *Bunyaviridae* ingresan a la célula por el mecanismo dependiente del pH en el cual se da la formación de un compartimiento celular conocido como endosoma. Los viriones son envueltos por esta vesícula y un cambio en el pH o unión con el compartimiento ácido (lisosoma) altera la conformación de la proteína de fusión del virus. Este cambio hace que las proteínas de fusión se expongan causando la unión de la membrana del virus a la de la célula del hospedero, y de esta forma el virus puede liberar su contenido al citoplasma de la célula hospedera (Sieczkarski y Whittaker 2002).

Con base a lo anterior, los tospovirus infectan al unirse a receptores de las células de insecto por medio de las glicoproteínas de la superficie del virus. Al darse la fusión de las membranas, iniciado por el descenso en el pH, se liberan segmentos del ARN viral acompañado con varias copias de complejo de ribonucleoproteínas (RPN por sus siglas en inglés) hacia el citoplasma de la célula hospedera. El RPN se utiliza como plantilla para la transcripción de ARNm catalizado por la enzima RdRp del virus. El material genético del virus posee ciertas características estructurales de organismos eucariotas que le permite que la polimerasa viral que corta de 10-20 nucleótidos del ARNm del hospedero, lo incorpore al extremo 5' del ARNm del virus. De esta forma, el proceso de traducción del hospedero también genera proteínas virales, incluida la RdRp que conlleva a la síntesis de varias copias del ARN viral. Probablemente, las proteínas del hospedero lleven a cabo la selección de la plantilla, estabilización de la enzima RdRp y los procesos catalíticos que permiten la extensión de hebras de ARN viral (Whitfield *et al.* 2005).

La replicación de los *Tospovirus* se ha descrito en el contexto de la infección a plantas; sin embargo, la identificación inmunocitoquímica y microscópica de las proteínas de TSWV en *Frankliniella occidentalis* establece que la replicación del virus también ocurre en el vector (Figura 4). La tasa de replicación de virus en el intestino y la migración del virus desde el intestino a las células del músculo visceral y las glándulas salivales son factores cruciales para determinar la competencia del vector (Whitfield *et al.* 2005).

Figura 4. Micrografías electrónicas de la fusión del virus en el intestino de *Frankliniella occidentalis* en su estadio larvario. (A) Sección delgada de células epiteliales del intestino del trips, las glicoproteínas de la membrana de los viriones de TSWV ingeridos han sido marcados con un anticuerpo policlonal. (B) Sección delgada de células epiteliales del intestino del trips, las glicoproteínas de la membrana del virion ha sido marcada con anticuerpos contra TSWV y proteína de oro A. (C) Tejido epitelial del intestino del trips, se ha marcado con anticuerpos contra la proteína N del virus y con proteína de oro A. En todas las micrografías se observa la fusión del virus a la membrana apical de las células epiteliales insecto. Membrana apical= ap, citoplasma= c, microvellosidades= mv, lúmen= lu, virus= v



(Whitfield *et al.* 2005).

4. Vectores de TSWV. Los insectos del orden *Thysanoptera*, comúnmente conocidos como trips, transmiten al menos diez especies de virus del género *Tospovirus*, entre estas: Peanut Bud Necrosis Virus, Groundnut Yellow Spot Virus, Impatiens Necrotic Spot Virus, Tomato Chlorotic Spot Virus, Tomato Spotted Wilt Virus y Watermelon Silver Mottle Virus. La transmisión de tospovirus por trips afecta a un diverso número de plantas alimenticias, fibras y ornamentales. Muchos de los trips, que sirven como vectores de tospovirus, poseen un rango extenso de hospederos y pueden sobrevivir a diferentes climas lo que aumenta el peligro de la dispersión del

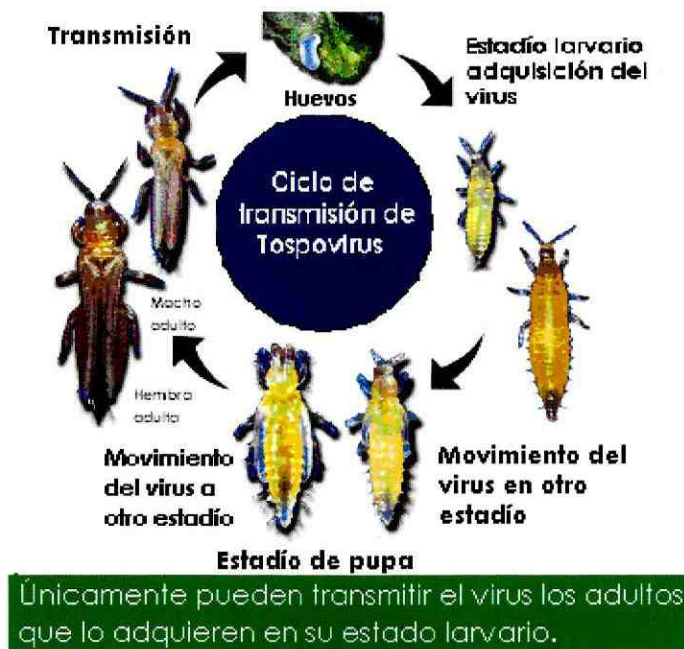
virus. La dispersión y sobrevivencia del virus TSWV depende de la coexistencia con su vector bajo las condiciones en las cuales las interacciones genéticas y fisiológicas entre ellos sea compatible. Por lo tanto, la coevolución entre trips y tospovirus posee gran influencia sobre la variabilidad entre los aislamientos de virus, epidemias y en la emergencia de nuevas especies de tospovirus (Whitfield *et al.* 2005). El virus TSWV es transmitido exclusivamente por siete especies de trips: *Trips tabaci*, *T. setosus*, *Frankliniella occidentalis*, *F. fusca*, *F. intonsa*, *F. schultzei* and *Scirtotrips dorsalis* (EPPO/CABI 2007).

El ciclo de vida de las especies de trips que son vectores de tospovirus se muestra en la Figura 5. Las hembras adultas colocan sus huevos en las plantas y luego de la eclosión, se dan dos estadios larvarios diferentes de larvas que se alimentan de las hojas de las plantas y partes de floración. Luego se da el estadio de pupa que crece en el suelo o sobre la planta. Por último, alcanzan el estadio adulto, en el cual los trips desarrollan alas y de esta forma se dispersan sobre otras plantas. Las especies de trips que transmiten el virus TSWV son polifagas, es decir, insectos que penetran y succionan para alimentarse y que lo pueden hacer en una gran variedad de tipos de células. Muchas especies de trips se alimentan de polen, estructuras de las flores y de las porciones vegetativas de las plantas. Para alimentarse los insectos penetran la epidermis de la hoja e ingieren el citoplasma a partir de las células mesófilas, ya sea, célula por célula o destruyendo varias células a la vez (Whitfield *et al.* 2005).

Únicamente los trips que adquirieron al virus en su estado de larva joven pueden transmitirlo a las plantas, luego de un período de latencia de varios días donde el virus se replica y circula dentro del vector (Inouei 2006). El virus se conserva aún durante el proceso de muda del vector y el período de latencia que es de 3-10 días, dependiendo de la especie del vector. Los vectores son altamente infectivos entre 22-30 días luego de que han adquirido al virus y retienen al virus por toda su vida; sin embargo, no hay evidencia de una transmisión transovarial (EPPO/CABI 2007).

En estudios realizados con inmunofluorescencia en especies de *F. occidentalis*, especie más diseminada y con mayor capacidad de transmisión, se ha determinado que el primer sitio de replicación viral se da en el intestino del vector. El intestino

Figura 5. Ciclo de vida del vector trips y de transmisión de tospovirus



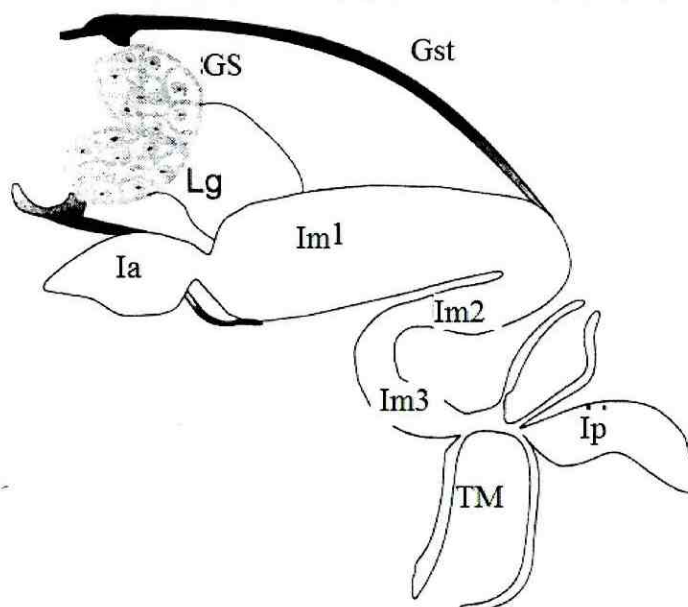
(Whitfield *et al.* 2005).

medio de este insecto consta de 2 giros, los cuales lo dividen en 3 regiones (Figura 6). Las primeras señales de infección detectadas se dan dentro del intestino anterior y se vuelven más intensas durante las siguientes 24 horas. Luego de 48 horas éstas disminuyen y vuelven a intensificarse luego de 72 y 96 horas. Aparentemente, la renovación del epitelio durante el proceso de muda (entre las 24 y 36 horas luego de la infección) da como resultado la pérdida temporal de células epiteliales, y por lo tanto, la reducción de la intensidad de infección. La infección en las células epiteliales es seguida de la invasión del virus al tejido muscular visceral circular y longitudinal, 72 horas luego de la infección, y aumentan a las 96 horas. Finalmente, la infección parece no existir en las células epiteliales del intestino de trips adultos. Una razón de esto es que la permeabilidad del epitelio intestinal, durante el estadio de pupa, genera la pérdida completa del virus en el tejido (Nagata *et al.* 1999, Nagata *et al.* 2002).

Durante el estadio adulto, la infección está presente en el tejido muscular visceral del intestino medio completo. Generalmente, presenta un patrón en forma de enrejado, sin embargo en la región Im3 puede llegar a abarcar unas cuantas franjas longitudinales. La presencia de infección en tejido muscular de regiones Im2 e Im3 en

etapa adulta a pesar de no encontrar infección en tejidos epiteliales de las mismas sugiere una transmisión lateral de célula a célula a partir de la región Im1 hacia tejidos musculares de las otras regiones. La infección también se pudo observar en el intestino anterior, pero ésta se ve únicamente en la etapa adulta. Probablemente, el virus no puede infectar al vector al ser ingerido a través del lumen intestinal. En las glándulas salivales se ven las primeras señales de infección entre las 72 y 96 horas, un gran porcentaje de adultos las tienen completamente infectadas. Adicionalmente, se puede ver infección en el ligamento que conecta las glándulas con la parte anterior de Im1 (Nagata *et al.* 1999, Nagata *et al.* 2002). Esto puede tener mucha relación con la capacidad de infección, ya que se ha encontrado que este ligamento es la vía de infección de las glándulas salivales. En especies como *F. tritici* que no es vector no se ha encontrado infección en este tejido, por lo que no se infectan las glándulas salivales, un paso determinante en la capacidad de infección del vector (Assis Filho *et al.* 2005).

Figura 6. Representación esquemática del tracto intestinal y posición de las glándulas salivales de *F. occidentalis*. Se observa el intestino anterior (Ia) Intestino medio 1, 2 y 3 (Im1, Im2 e Im3), intestino posterior (Ip), glándula salival (GS) glándula salival tubular (Gst) ligamento (Lg) y tubos de Malphigi (TM).



(Nagata *et al.* 1999).

El movimiento del virus ocurre durante el ciclo de desarrollo del vector al pasar del estadio de larva adulta al estadio de pupa. Esta pérdida del virus en el

intestino se puede deber a los cambios que ocurren durante la metamorfosis. Por lo tanto, las glándulas salivales se consideran como el reservorio más importante del virus TSWV en sus vectores. La transmisión del virus a una planta sana se da ya que el virus TSWV se mantiene en las glándulas salivales y se excreta en la saliva a la hora que el vector se alimenta de las hojas y su infección depende de la cantidad de virus en las mismas (Tsuda *et al.* 1996, Nagata *et al.* 2002).

5. Hospederos de TSWV. Este virus está ampliamente distribuido, y ha sido detectado en países de Asia, África, Europa, Estados Unidos, México, Canadá, América Central y El Caribe (EPPO/CABI 2007). TSWV es uno de los virus que afecta a 1090 especies de plantas clasificadas en 15 familias de monocotiledóneas y 69 familias de dicotiledóneas. Se estima que globalmente causa la pérdida de un billón de dólares anualmente. La importancia económica de TSWV, además de sus características biológicas y moleculares, han hecho de este virus uno de los más estudiados. En general, son dos los principales factores que hacen de TSWV uno de los virus más destructivos y globalmente distribuidos: la naturaleza del vector y la falta de especificidad de hospederos para el virus. Como consecuencia, TSWV es un virus con alto rango de hospederos y su control permanece siendo problemático (Parrela *et al.* 2003).

El virus TSWV afecta principalmente a plantas herbáceas como lechuga (*Lactuca sativa*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomates (*Lycopersicon esculentum*) y varias semillas ornamentales. Entre otros cultivos que se ven afectados están: alcachofas (*Cynara scolymus*), cucúrbitas (incluyendo al pepino, melón y sandía), y solanáceas como papas (*Solanum tuberosum*). Las plantas ornamentales que son afectadas por TSWV son: *Alstroemeria*, *Anemone*, *Antirrhinum*, *Araceae*, *Aster*, *Begonia*, *Bouvardia*, *Calceolaria*, *Callistephus*, *Celosia*, *Cestrum*, *Columnea*, *Cyclamen*, *Dahlia*, *Dendranthema x grandiflorum*, *Eustoma*, *Fatsia japonica*, *Gazania*, *Gerbera*, *Gladiolus*, *Hydrangea*, *Impatiens*, *Iris*, *Kalanchoe*, *Leucanthemum*, *Limonium*, *Pelargonium*, *Ranunculus*, *Saintpaulia*, *Senecio cruentus*, *Sinningia*, *Tagetes*, *Verbena*, *Vinca* and *Zinnia*. Weeds such as *Amaranthus* spp., *Conyza bonariensis*, *Galinsoga* spp., *Polygonum lapathifolium*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *Solanum nigrum*, *Sonchus* spp., *Stellaria media*, *Taraxacum officinale*, etc. (EPPO/CABI 2007). El ornamental de gran interés para este estudio es el crisantemo

(*Chrysanthemum carinatum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Chrysanthemum frutescens*, *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Chrysanthemum macrophyllu*, *Chrysanthemum x morifolium* y *Chrysanthemum x superbum*) ya que en regiones de Sur América se ha detectado la presencia del virus en este cultivo (Becerra *et al.* 1989). Además, en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala durante el año 2006 se detectó el virus TSWV en crisantemo utilizando la técnica de ELISA directo.

6. Síntomas causados por TSWV. Los síntomas que causa el virus TSWV varía dependiendo el tipo de planta y semillas, ya que puede inducir una gran variedad de síntomas (que pueden variar aún en la misma especie de hospedero) (EPPO/CABI 2007). La mayoría de tospovirus causan los siguientes síntomas: necrosis (café), clorosis (amarillas) o anillos de algún patrón específico. Las lesiones necróticas y cloróticas también se pueden formar en el tallo. En el caso del tomate las hojas infectadas con TSWV se observan de color café y desarrollan numerosas lesiones de color café más oscuro (Figura 7). Si la infección se da en plantas jóvenes no se desarrollan frutos y si se da en plantas adultas, los frutos se observan con anillos cloróticos y necróticos. Otros de los síntomas que se observan en las hojas son: acolochamiento hacia abajo, deformación de la vena central y en general la planta es más pequeña que una planta sana, comúnmente conocido como enanismo (Atkins y Mogol 2005).

Figura 7. Síntomas característicos de la infección por TSWV en hojas de diferentes plantas.



(Atkins y Mogol 2005).

Figura 8. Síntomas de infección por TSWV en crisantemos: clorosis en las hojas (A), coloración café en tallos (B), enanismo de la planta (C) y acolochamiento de las hojas (D). Fotografías tomadas en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.



7. Medidas de control. Para obtener un manejo eficiente de TSWV es de suma importancia considerar las interacciones entre vector, patógeno y hospedero. Los esfuerzos para controlar al virus TSWV se iniciaron desde que el virus fue descubierto. Al paso de los años se han utilizado dos estrategias: la utilización de cultivos resistentes al virus y el uso de tácticas de manejo que han servido para reducir la incidencia del virus. Sin embargo, no existe una forma directa de controlar al virus, por lo tanto el método de control debe ser dirigido al vector o a la aplicación de medidas sanitarias (Hadidi *et al.* 2005).

Debido a su pequeño tamaño, es difícil eliminar el movimiento de los trips dentro de los invernaderos. Sin embargo, sellar los invernaderos, principalmente en la época calurosa cuando aumentan los vuelos de éstos, es importante. También se deben erradicar hospederos que estén cercanos a las plantaciones e invernaderos que puedan servir como reservorios. Se debe tener cuidado con las distintas herramientas y forma

de manejo de las plantas para reducir la transmisión del virus a plantas sanas (Cranshaw 1988, Reitz 2005).

Pueden administrarse insecticidas, sin embargo se han dado incrementos en la resistencia hacia éstos (Reitz 2005). Adicionalmente, las diferentes formas de patrones de movimiento de las diferentes especies de trips pueden afectar un programa de control de éstos y del virus. Por ejemplo, un insecticida puede matar a todas las especies de trips; sin embargo, debido a que algunas especies son muy activas y móviles, pueden recolonizar rápidamente y confundir creyéndose que son resistentes. Todo esto dificulta las medidas de control de los vectores por lo que hace que el virus TSWV sea uno de los más temidos por los agricultores (Parrela *et al.* 2003, Reitz 2005).

C. Detección e identificación de TSWV.

1. Métodos de detección. Actualmente se utilizan varios métodos para la detección del virus TSWV, plantas indicadoras, el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima o Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA por sus siglas en inglés), microscopía electrónica y actualmente se hace uso de pruebas moleculares como la técnica de Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés) (EPPO/CABI 2007). En este estudio se utilizarán los métodos de ELISA y RT-PCR para la detección del virus TSWV en crisantemos.

a. ELISA: La prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un técnica de inmunoensayo que consiste en la detección de un antígeno (o anticuerpo), inmovilizado a una superficie, por un anticuerpo (o antígeno) enlazado a una enzima. Gracia a esta enzima al momento que se da la unión entre anticuerpo y antígeno se genera un producto detectable (generalmente e observa un cambio de color en la reacción) que puede ser medido por espectrofotometría. En este estudio se aplica la técnica de ELISA directo de captura, utilizando un anticuerpo de cobertura inicialmente al cual se unieron los antígenos virales en la muestra. Esta técnica consiste en la fijación de un anticuerpo de cobertura específico, para el antígeno que sje desea detectar, a la superficie del pozo. Cualquier exceso de anticuerpo es eliminado por lavados que se realizan a la placa. Luego se agregan la muestra donde

posiblemente se encuentran el antígeno, en este caso el TSJWUV. El exceso de antígenos también es eliminado por medio de lavados a la placa. Al agregar el anticuerpo conjugado a una enzima, que también es específico para el antígeno que se busca, va a reaccionar generando un cambio de color que es directamente percibido en la placa de reacción lo cual facilita la recolección de resultados (Janeway *et al.* 2001).

Los ensayos de ELISA directo constituyen un método rápido, sensible y de bajo costo de detección, en este caso se utilizará para la detección de antígenos o proteínas virales del virus TSWV. Las pruebas de ELISA permiten analizar una gran cantidad de muestras, sin embargo no son, generalmente tan sensibles como los ensayos de biología molecular (Lanciotti 2003).

b. Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

La técnica de PCR permite la amplificación o síntesis de un gran número de copias de un fragmento específico de ADN. Debido a que el material genético del virus TSWV es de ARN (que es una sola hebra y que no resiste el calor) es necesario realizar una Transcripción Reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La fase de RT permite generar una copia de la hebra de ARN, esta copia es en realidad ADN complementario (ADNc) de doble hebra que sí es resistente al calor lo que le permite ser útil para las fases posteriores durante la PCR. La conversión de las moléculas de ARN a ADNc se lleva a cabo por medio de la enzima transcriptasa reversa. En este paso no se generan copias completas de la molécula de ARN ya que se seleccionan iniciadores que se unan a sitios que están dentro del transcrito y no en sus extremos o bordes. Los iniciadores pueden ser generales o específicos a la secuencia que se desea detectar. Una vez concluido este paso se prosigue con el proceso de PCR (Brown 2001). Esta técnica de RT-PCR es de gran importancia en el diagnóstico de virus en que su material genético es ARN.

La técnica de PCR permite la amplificación selectiva de una región especial de ADN. La importancia de la PCR radica en su habilidad para amplificar *in vitro* segmentos de ADN o ADNc (ácido deoxirribonucleico complementario), a partir de cantidades traza del mismo. La reacción se basa en el hibridización y extensión enzimática, catalizada por una ADN polimerasa, dos iniciadores oligonucleótidos que flanquean en la región blanco o región de ADN que se desee amplificar. Se puede

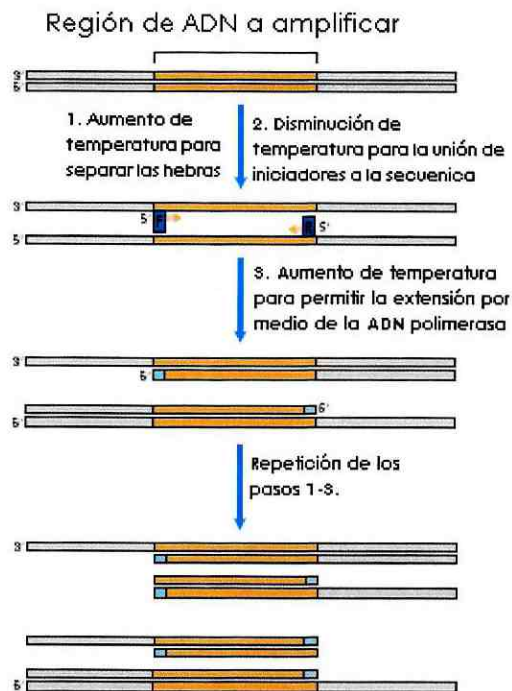
seleccionar cualquier molécula de ADN siempre y cuando se conozca la secuencia de sus bordes. Se debe conocer la secuencia de los bordes, del fragmento de ADN que se desea amplificar, ya que para llevar a cabo el PCR se deben utilizar dos iniciadores que se unen o hibridizan en cada uno de los bordes de las dos hebras que componen a una molécula de ADN. Los iniciadores delimitan la región que será amplificada (Brown 2001).

La amplificación usualmente se lleva a cabo utilizando la enzima Polimerasa I de ADN *Thermus aquaticus*. Para iniciar la amplificación se necesita agregar la enzima a la plantilla del ADN y se deben incubar para que se logre la síntesis de la hebra complementaria. Para que esto ocurra se debe elevar la temperatura a 94°C para que las dos hebras del ADN se separen, proceso que recibe el nombre de desnaturalización. Subsecuentemente la mezcla se lleva a una temperatura menor a la cual los iniciadores seleccionados se puedan unir a la secuencia de ADN a la que son complementarios en un corto segmento. Luego cada uno de los iniciadores son extendidos enzimáticamente por la ADN polimerasa permitiendo la síntesis de un segmento específico de ADN complementario a la región flanqueada de la hebra plantilla. Estos tres pasos desnaturalización, unión de iniciadores o hibridización y extensión de los iniciadores constituyen un ciclo de la PCR. Estos pasos se repiten las veces que se deseen (n) y al final se obtiene 2^n moléculas de ADN doble hebra que son copias de la secuencia de ADN flanqueadas por los iniciadores (Figura 9) (Lewin 2006). En este estudio se utilizó un par de iniciadores que amplificaron una región del genoma del virus TSWV de 276 pb.

Todos los ensayos de amplificación molecular involucran tres etapas básicas: 1) extracción y purificación de ácidos nucleicos de las muestras a analizar; 2) amplificación del ácido nucleico; y 3) detección y caracterización del producto amplificado. En el caso de este estudio la primera etapa se basa en la extracción del ARN hebra negativa del virus TSWV a partir del material vegetal de crisantemos. La segunda etapa consiste en la transcripción inversa del ARN hebra negativa para generar una hebra simple de ADN complementario (ADNc). Luego se realiza la amplificación del fragmento deseado. Posterior a la amplificación por RT-PCR, se detecta si la amplificación del producto deseado ocurrió por medio de electroforesis

en gel de agarosa, visualizando el producto por tinción con bromuro de etidio (Lanciotti 2003).

Figura 9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



(Lehninger *et al.* 2005).

D. Validación de pruebas diagnósticas

El propósito principal de este trabajo es lograr la implementación de un método que permita lograr la detección del virus TSWV. Para alcanzar este objetivo se decidió comparar los resultados obtenidos con RT-PCR y los obtenidos con ELISA, método de diagnóstico utilizado actualmente en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. El fin es obtener una técnica de diagnóstico que posea una alta probabilidad de identificar correctamente a los individuos enfermos o sanos. Los estudios diagnósticos permiten evaluar el funcionamiento de una prueba, existen varios parámetros que se han desarrollado para evaluar una prueba diagnóstica. Los más conocidos son la sensibilidad y la especificidad. Estos valores se expresan siempre en términos relativos con respecto a una prueba de referencia, es decir, aquella cuyos resultados sean aceptados como “reales” para un individuo (Greenberg *et al.* 2005).

1. Sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de una prueba es el porcentaje de individuos que poseen la enfermedad de interés y tienen un resultado positivo usando la prueba bajo estudio; la especificidad se refiere al porcentaje de individuos que se encuentran sanos y tienen un resultado negativo. Estos parámetros se calculan de la siguiente manera (Greenberg *et al.* 2005):

$$\text{Sensibilidad}(S) = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100\%$$

Fórmula 1

$$\text{Especificidad}(E) = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100\%$$

Fórmula 2

Cuanto mayor sea la sensibilidad de una prueba, aumenta la probabilidad de que ésta detecte a individuos con la enfermedad de interés. Las pruebas con una sensibilidad alta son útiles para descartar la presencia de una enfermedad, es decir, un resultado negativo excluye prácticamente la posibilidad de que la enfermedad esté presente. En el caso de la especificidad, cuanto mayor sea para una prueba, aumenta la probabilidad de que los individuos sin la enfermedad den resultados negativos. Los estudios muy específicos se usan para confirmar la presencia de una enfermedad; un resultado positivo es un indicador de que la enfermedad de interés está presente (Greenberg *et al.* 2005). La forma usual de presentar los resultados de una validación de pruebas diagnósticas es usando un cuadro 2 x 2, como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Forma usual de presentar los resultados de una validación para pruebas diagnósticas

		Criterio de verdad	
		Enfermo	Sano
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	<i>A</i>	<i>b</i>
	Negativo	<i>C</i>	<i>d</i>

Cuando los datos se presentan de esta forma, la sensibilidad se puede calcular como $S = a/(a+c)$ y la especificidad como $E = d/(b+d)$.

2. Razones de probabilidad. También es posible calcular las razones de probabilidad (RP). La razón de probabilidad positiva (RP^+) es la razón entre la probabilidad de un resultado positivo en un individuo enfermo y la probabilidad de un resultado positivo en un individuo sano. Ésta se puede calcular con la siguiente ecuación (Greenberg *et al.* 2005):

$$RP^+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}} \quad \text{Fórmula 3}$$

La razón de probabilidad negativa (RP^-) es la razón entre la probabilidad de un resultado negativo en un individuo enfermo y la probabilidad de un resultado negativo en un individuo sano. Ésta se puede calcular con la siguiente ecuación (Greenberg *et al.* 2005):

$$RP^- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}} \quad \text{Fórmula 4}$$

III. JUSTIFICACIÓN

Las flores y plantas ornamentales cultivadas en Guatemala son una fuente importante de empleo, dado el número de superficie cosechada y producción obtenida. Según el último Censo Agropecuario, para el año agrícola 2002/2003 se reportan 318 fincas dedicadas a esta actividad, con una superficie cosechada de 96 manzanas y una producción obtenida de 575,272.72 kilogramos. En algunas poblaciones, como San Juan Sacatepéquez, la principal actividad agrícola es el cultivo de flores de corte. El crisantemo, *Crhysantemum morifolium*, es el más representativo al ocupar más del 50% de la producción global de esta área por lo que representa un recurso económico importante (Mejía 2006).

El crisantemo también se encuentra dentro de los principales productos de plantas ornamentales, flores y follaje con potencial para las pequeñas y medianas empresas en Estados Unidos. El crisantemo se ha impuesto como una de las flores más importantes en la floricultura con una demanda creciente en todos los mercados. Sin embargo, la presencia de agentes patógenos, como el Virus del Bronceado del Tomate (TSWV por sus siglas en inglés), han causado pérdidas parciales o totales en plantaciones de flores de corte. Según información otorgada por trabajadores de ASOFLORSA se ha estimado que el virus TSWV afecta al 75% de crisantemos cultivados por tablón (25 m²). Por lo tanto, se ha determinado que uno de los patógenos más importantes en la problemática del crisantemo es el virus TSWV.

En la mayoría de los países, el virus TSWV es un patógeno cuarentenado, por lo que no permiten la entrada de cultivos que son hospederos del virus sin certificación para la ausencia del virus y su vector. Debido a esto, es importante determinar eficazmente la presencia del virus en los cultivos de crisantemos de San Juan Sacatepéquez por la implicación que esto tendría para la economía de Guatemala al ser el crisantemo un producto de exportación.

Actualmente, se utiliza la técnica inmunológica ELISA que detecta a los antígenos del virus. Sin embargo, con esta técnica no se puede asegurar que el virus esté presente al momento del análisis ya que sólo se requiere de las proteínas de superficie del virus para generar un resultado positivo. Esta técnica no asegura que el

virus todavía se esté replicando dentro del hospedero o circulando en la plantación. Debido a esto es importante establecer una técnica de detección molecular para el virus. La técnica RT-PCR se ha utilizado ampliamente como un método de detección altamente sensible y específica para la detección de virus en su estado infeccioso. Además, según el boletín EPPO (2004) se requiere de una secuencia de trabajo que involucre tanto la técnica de ELISA, para realizar un tamizaje inicial, y la técnica molecular RT-PCR para confirmar los resultados. En este estudio se estandarizará el método para la amplificación y detección de una región específica del genoma del virus TSWV por medio de la técnica de RT-PCR en tejido vegetal de crisantemos. Se espera que en un futuro se pueda establecer como el método de detección para realizar un diagnóstico temprano y certero de la presencia del virus. Además, se espera que en un futuro se logre aplicar este método para detectar la presencia del virus en el vector reportado, aportando una herramienta de monitoreo del porcentaje del virus circulando en el campo de cultivo con lo cual se podría tomar medidas preventivas y de control previas a la siembra del crisantemo.

IV. OBJETIVOS

A. General

Detectar el virus TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*, por sus siglas en inglés) por medio de la técnica molecular RT-PCR en tejido vegetal.

B. Específicos

1. Implementar el protocolo de almacenamiento y transporte de muestras, extracción del material genético y método RT-PCR para la detección del virus TSWV en crisantemos colectados en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.
2. Optimizar el procedimiento método de detección del virus TSWV por medio de la técnica RT-PCR.
3. Determinar la especificidad y sensibilidad de la técnica de ELISA en comparación con el método de RT-PCR implementado para establecer la secuencia de trabajo óptimo para lograr la detección del virus TSWV utilizando tejido vegetal de crisantemos colectados en el municipio de San Juan Sacatepéquez.

V. HIPÓTESIS

Es posible la detección del virus TSWV utilizando la técnica molecular RT-PCR en tejido vegetal de crisantemo colectado en el Municipio San Juan Sacatepéquez, Guatemala con mayor sensibilidad y especificidad en comparación con la técnica ELISA.

VI. MÉTODOS

A. Procedimiento

1. Sitio de colecta de muestras de crisantemos. Se realizaron dos viajes de campo, durante la época lluviosa, donde se colectaron muestras de crisantemos en fincas o invernaderos del municipio San Juan Sacatepéquez. Las coordenadas de los campos visitados son: 14° 43.664' N, 90° 38.022' W y 1773 m SNM; 14° 42.712' N, 90° 38.406' W y 1697 m SNM. El segundo muestreo se realizó en la misma aldea, en el campo cuyas coordenadas fueron: 14° 43.658' N, 90°38.017' W y 1781 m SNM.

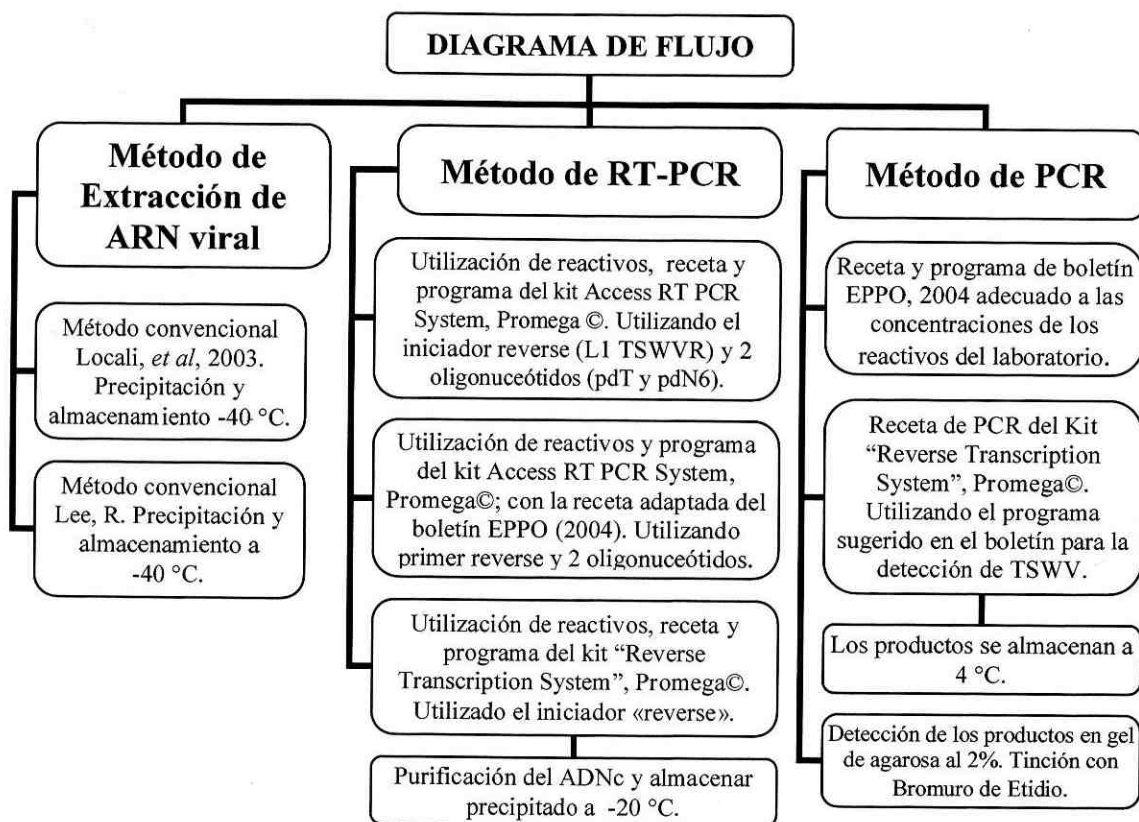
2. Colecta y transporte de las muestras. En el primer muestreo se colectaron plantas completas en la cuales se detectó la presencia de TSWV por la prueba rápida de campo Inmunostrip (TSWV Invitrogen© Elkart, Indiana) y técnica de ELISA (Kit DAS ELISA alkaline phosphatase, AGDIA© Elkart, Indiana) utilizando el lector de placas SpectraCount. Los controles positivos y negativos para las pruebas de ELISA fueron de la misma casa que el kit, AGDIA. Las plantas colectadas y analizadas y en especial las que fueron positivas para ELISA, se transplantaron y cultivaron en los invernaderos de la Universidad del Valle de Guatemala con el fin de conservar plantas infectadas que se utilizaron como controles positivos para la detección del virus y como fuente de inóculo para plantas indicadoras. Se usaron como controles positivos después de comparar sus lecturas de absorbancia y compararlas con la de los controles positivos provenientes de AGDIA. En el segundo muestreo se procedió a tomar 20 muestras de crisantemo (hojas y tallos). El material vegetal se colocó en bolsas Ziploc identificadas con un código numérico correlativo. Se observaron los síntomas en las muestras colectadas, en especial los que son característicos de una infección por TSWV, y también se colectó material vegetal sin síntomas obvios. En la boleta de colecta (Apéndice A) se marcaron los síntomas encontrados en cada una de las plantas. Las muestras se colocaron en hielera con bolsas de hielo («icepacks») para el transporte hacia la Universidad del Valle de Guatemala.

3. Almacenamiento de las muestras. Al llegar a las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, las muestras se almacenaron a -40 °C en el Laboratorio de Protección Vegetal.

4. Tabulación de datos de campo e identificación de las muestras (base de datos). Los datos tomados durante el muestreo se tabularon en una hoja de Microsoft Office Excel, con el nombre "Trips 005-2006". Esta base de datos se construyó con la información de la identificación del sitio de colecta donde se realizaron los muestreos, fecha de la colecta, números correlativos de las muestras correspondientes a cada muestreo y los síntomas de cada una de ellas partiendo de los datos de la boleta de colecta (Apéndice A). Al final del análisis se incluyeron los resultados de la detección de TSWV de cada una de las muestras para establecer un registro de las muestras positivas y negativas para la presencia de este virus.

5. Proceso de estandarización del método de RT-PCR: Esta etapa se realizó con las plantas positivas para TSWV que se sometieron a varios métodos de extracción y de amplificación del fragmento deseado con el objetivo de establecer el método más sensible y específico para la detección del virus TSWV (Figura 10). Con el método ya estandarizado se analizaron las muestras, y los resultados obtenidos se compararon con los resultados obtenidos por ELISA y se tabularon en la base de datos.

Figura 10. Diagrama de flujo de los procedimientos a seguir para la detección de TSWV en crisantemos de San Juan Sacatepéquez, Guatemala por medio de la técnica RT-PCR.



6. Extracción de ARN a partir de las muestras de crisantemo. Las muestras de crisantemo se sometieron a dos métodos de extracción de ARN diferentes para establecer cuál de ellos es el más apropiado para extraer el material genético total. Se empleó el método para extraer ARN total que se lleva a cabo según Locali, *et al.* (2003) (Apéndice B). El segundo método de extracción se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el Dr. Richard Lee (comunicación personal Palmieri 2007) (Apéndice C). Las extracciones se almacenaron precipitadas a -40 °C.

7. Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés). Las extracciones de ARN se resuspendieron en 20 µl de agua ultrapurificada y se procedió a realizar la transcripción reversa (RT) para generar ADN complementario (ADNc) utilizando tres métodos diferentes. Cabe mencionar que se realizó la detección de ARN viral de TSWV y ARN ribosomal de planta; éste último fue necesario para establecer un control interno que asegurara la extracción de ARN. Este control interno se realizó cada diez muestras procesadas para comprobar la extracción de ARN total. Al inicio de estudio se utilizaron dos oligonucleótidos, pT y pN6, pero no se logró la detección utilizándolos. Por lo que, en los tres métodos de RT se utilizó el iniciador L1 TSWV R para la detección TSWV y PLANT-UNI R para la detección de la subunidad 5S de ARN ribosomal de planta (Cuadro 3).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la detección del virus TSWV y ARN ribosomal de planta

	NOMBRE	SECUENCIA	TAMAÑO DEL FRAGMENTO
TSWV	L1 TSWV R	5'-AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC-3'	276 pb
	L2 TSWV F	5'-ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA-3'	
ARN ribosomal de planta	PLANT-UNI R	5'-TGG GAA GTC CTC GTG TTG CA-3'	Varía según la planta.
	PLANT-UNI F	5'-TTT AGT GCT GGT ATG ATC GC-3'	

(EPPO 2004)

Los procedimientos de RT empleados fueron tres, el primero fue utilizando el Kit Acces RT-PCR Systems Promega© (Madison WI, Estados Unidos) con los reactivos e instrucciones del fabricante (Apéndice D) realizando en un solo paso el RT-PCR. El segundo método se basa en las instrucciones del Boletín EPPO (2004)

utilizando las concentraciones sugeridas pero utilizando los reactivos del Kit Acces RT-PCR Systems Promega© (Apéndice E) y realizando el proceso de generación de ADNc separado del proceso de amplificación por PCR. El último método se realizó utilizando los reactivos y programa del Kit Reverse Transcription System, Promega© (Madison, Wiscconsin Estados Unidos) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante (Apéndice F).

Los productos de RT-PCR obtenidos con los últimos dos métodos se purificaron agregando a cada reacción 175 µl de agua ultrapurificada y 200 µl de cloroformo: isopentanol (24:1), se mezcló por inversión. Se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante al cual se agregaron 500 µl de isopropanol y 50 µl de acetato de amonio 7.5M y se almacenaron a -20 °C hasta el momento que se realizó el PCR. Al realizar el PCR los productos se resuspendieron al centrifugar por 10 min a 14,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de etanol al 70%. Se centrifugó por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado al aire. Se resuspendió en 20 µl de agua ultrapurificada.

8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés): El ADNc generado luego de la reacción de RT-PCR, se amplificó utilizando la técnica de PCR. La amplificación se realizó utilizando los cebadores L1 TSWVR y L2 TSWV F para la detección del ADNc viral y los iniciadores PLANT-UNIV R y PLANT-UNIV F para la detección de ARN ribosomal de planta, presentados en el Cuadro 3.

Se utilizaron dos recetas diferentes, la primera reacción se realizó según las instrucciones del Boletín EPPO (2004) (Apéndice G). El segundo método se realizó utilizando la receta que sugiere el Kit Reverse Transcription System, Promega© (Madison WI, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante (Apéndice H). La preparación de las reacciones se llevó a cabo bajo campana manteniendo las muestras y reactivos en hielo. Los productos de PCR se almacenaron a -20 °C. Se empleó como control positivo para los proceso de extracción, RT y PCR tejido vegetal de los trasplantes ubicados en los invernaderos de la UVG. (Invernadero frio), previamente diagnosticado por Inmunostrip y ELISA.

9. Electroforesis en agarosa. Se utilizó gel de agarosa (BioRad®) al 2% en Tampón TAE 1X (Apéndice I) para permitir la separación del fragmento de interés (276 pb). La agarosa se disolvió por calentamiento en microondas durante 30 segundos (hasta ebullición). La solución se vertió en la cámara de electroforesis luego de haberse enfriado a 50 °C, aproximadamente. Luego de que el gel polimerizó se agregaron aproximadamente 300 ml del tampón TAE 1X. En cada pozo se cargaron 8 µl del producto de RT y 7 µl del marcador molecular de 1 Kb, Promega© (Madison, Winsconsin Estados Unidos). Se corrió a 85 V por 70 minutos utilizando una fuente de poder Accu Power VWR Scientific Products (Modelo 500 con número de registro 920769).

10. Detección de los productos de PCR en gel de agarosa. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 3 minutos y se eliminó el exceso de bromuro de etidio al sumergir el gel en agua destilada por 2 minutos. Se colocó el gel dentro del transiluminador ultravioleta Imaging System BIODOC-IT™ (Cambridge, Reino Unido con número de registro 95-0403-01). Se hicieron los ajustes de intensidad de luz y se tomó la fotografía.

11. Purificación y secuenciación del fragmento amplificado con el método de RT-PCR implementado. Al haber logrado la detección el fragmento deseado se realizó otro proceso de amplificación de RT-PCR para la muestra 6. El producto de esta reacción se purificó utilizando el Kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System, Promega© (Madison, Winsconsin Estados Unidos). Se siguieron las instrucciones del fabricante para purificar ADN directamente de la reacción de PCR utilizando las minicolumnas Wizard®. Luego de ser purificado el producto se envió a MACROGEN USA (Maryland, Washington D.C.) para ser secuenciado. Se envió el producto purificado a una concentración de 30 ng/µl y el par de iniciadores para TSWV a una concentración de 5 pmol/µl.

12. Detección del virus TSWV por ELISA directo según el Kit DAS ELISA alkaline phosphatase Agdia© (Elkart, Indiana). Esta técnica se realizó según las indicaciones del fabricante, cubriendo cada pozo a utilizar con 100 µl del anticuerpo de cobertura. Se incubó en cámara húmeda por toda la noche a 4 °C. Se utilizó el lavador de placas automático BIORAD ImmunoWash modelo 1575, empleando emplea PBST

como solución de lavado. Las muestras se prepararon con 0.1 g de material vegetal y se agregó 1.0 ml de buffer de extracción directo (Apéndice J) para su maceración. Se colocaron 100µl de cada muestra, de control positivo de Agdia®, de control negativo de Agdia® y 100µl del buffer de extracción directo como blanco en cada pozo. Todas las muestras, blanco de reacción, controles negativos y positivos se trabajaron en duplicado. Se incubó por dos horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. El anticuerpo conjugado que se preparó de igual forma que el de cobertura agregando 100 µl a cada pozo. La placa se incubó en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se colocaron 100µl a cada pozo del sustrato de revelado (una pastilla en 5ml de buffer de revelado). Las lecturas se realizaron luego de una y dos horas de incubación en cámara oscura a 405 nm en el lector Spectracount, Packard.

13. Análisis estadístico: Uno de los pasos críticos para la detección del virus es establecer cuál de los dos métodos de extracción sugeridos en este trabajo es el más adecuado y sensible. Según la prueba de probabilidad el tamaño de la muestra se calcula siguiendo la fórmula que se presenta a continuación:

$$\phi = \sqrt{\frac{n\delta^2}{2ks^2}} \quad \text{Fórmula 5}$$

donde n corresponde al tamaño de la muestra, δ a la diferencia de las medias de la población en estudio, k al número de grupos, s a la desviación estándar de las réplicas y ϕ corresponde al poder de la prueba. La determinación del tamaño de la muestra se realizó utilizando el programa R Development Core Team (2007), con una confianza del 95% y un poder de la prueba del 80%. Se calculó que el tamaño de la muestra debería ser de 27 ($n=27$) (Apéndice K). Sin embargo, se decidió utilizar un tamaño de muestra igual a 36 para establecer que existe una diferencia significativa entre los dos métodos de extracción utilizados. Se empleó la prueba Chi cuadrado (χ^2), utilizando el programa R Development Core Team (2007), para establecer la significancia de la diferencia entre los dos métodos de extracción.

Adicionalmente, se determinó la especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA en comparación con el método de RT-PCR implementado al graficar los valores de sensibilidad contra 1-especificidad para obtener la Curva ROC, utilizando el programa R Development Core Team (2007). Esta prueba estadística permite

establecer el porcentaje de detección correcta de la técnica, su especificidad y sensibilidad en el punto de corte óptimo indicado por la Curva ROC.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Sitio y método de colecta, transporte y almacenamiento de la muestra.

Los crisantemos utilizados en este trabajo se colectaron en el Municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala ya que el cultivo de esta planta ornamental es muy alto en varias aldeas de esta región. Además, en los últimos años los agricultores han sufrido pérdidas en el cultivo de crisantemo debido a infecciones por varios patógenos, incluyendo el virus de TSWV. Los muestreos se realizaron en diferentes invernaderos, en los cuales los dos tipos de crisantemo que más se cultivan son los conocidos como: margarita o sencillo y anémona. Al realizar los viajes de campo se observó que dependiendo del tipo de crisantemo así se presentaban los síntomas por infección con TSWV. La principal diferencia observada es que para el tipo margarita o sencillo los síntomas son locales y la coloración café del tallo es más notoria y característica; mientras, que en el tipo anémona los síntomas se presentan más dispersos. Sin embargo, los síntomas principales como necrosis y coloración café en el tallo, clorosis y acolchamiento de las hojas se observaron en todos los crisantemos enfermos.

La estandarización del método de detección del virus TSWV se realizó utilizando plantas de ambos tipos de crisantemo que se replantaron y cultivaron en el invernadero de la Universidad del Valle de Guatemala. El objetivo de cultivar estas plantas fue mantener al alcance un control positivo que se pudiera utilizar para controlar todo el proceso de detección sin la necesidad de colectar periódicamente plantas infectadas. Durante el proceso de estandarización se determinó que la selección del material vegetal resulta ser un paso determinante para lograr la detección del virus TSWV. El contar con plantas completas permitió establecer que posiblemente la toma de material se debe hacer en las partes jóvenes de la planta, preferentemente en los nuevos brotes e hijuelos, hojas jóvenes y tallos jóvenes, necróticos y con coloración café. Además, se supone que en el tejido joven esté presente el virus y que se encuentra en etapa de replicación, de esta forma se aumenta la probabilidad de que la carga viral sea alta y se pueda detectar.

El diagnóstico final con el método molecular implementado se realizó en muestras de tejido vegetal joven, tanto nuevos brotes como hojas nuevas. Debido a que este es un estudio preliminar para la detección del virus TSWV se colectaron treinta y seis (n=36) muestras que en su mayoría se tomaron de plantas sintomáticas para esta infección y en menor cantidad, a partir de plantas con síntomas menos notorios o ausentes (Ver fotografías del tejido vegetal muestreado en el Apéndice L). De esta forma se esperaba detectar muestras positivas y negativas para la presencia del virus. Según Bald & Pittman *et al.* la extracción del genoma viral también se puede realizar a partir de la raíz y pétalos del crisantemo. Al estandarizar el método de detección del virus se determinó que es importante mantener la integridad del material genético viral presente en la muestra. Con el fin de evitar esta degradación las muestras se mantuvieron en frío durante su transporte y se almacenaron -40 °C. Así mismo, se determinó que las muestras no deben almacenarse por más de dos días sin que se realice la extracción.

B. Estandarización del protocolo para la detección del virus TSWV en crisantemos.

El objetivo de este trabajo fue proponer un protocolo de detección del virus TSWV utilizando la técnica molecular RT-PCR. La primera etapa fue lograr la implementación del método para lo cual se utilizaron crisantemos que presentaban los síntomas característicos de infección por TSWV. Además, estas plantas se diagnosticaron como positivas para TSWV por medio de dos técnicas: Inmustrip (TSWV Invitrogen© Elkart, Indiana) realizada en el lugar de colecta y ELISA directo realizada en el Laboratorio de Protección Vegetal. Estas plantas se emplearon para implementar exitosamente la secuencia de trabajo: extracción de ARN, RT-PCR y detección de la presencia del virus.

1. Método de extracción: El primer paso de la secuencia es el método de extracción que mostró ser el paso determinante para lograr la detección de TSWV por la técnica molecular RT-PCR. En este trabajo se utilizaron dos métodos de extracción de ARN diferentes. El método Locali *et al.* se basa en una extracción fenol: cloroformo que permite la separación de dos fases, una acuosa donde se encuentra el material

genético y otra orgánica donde se depositan los demás compuestos. El método sugerido por *Lee* utiliza una matriz sólida a la cual se adhiere únicamente el ARN permitiendo eliminar los compuestos no deseados, el paso final consiste en separar el ARN puro de esta matriz. Debido a la importancia de este paso, se decidió utilizar dos métodos para lograr determinar cuál de ellos es el más adecuado para lograr la extracción del genoma del virus TSWV.

El ARN es susceptible a la degradación por enzimas llamadas ARNasas, por lo que el material de trabajo debe estar libre de ellas. Para lograr la reducción de ARNasas durante el trabajo se limpió el área y equipo de trabajo con cloro al 10% y etanol al 70% antes de ser utilizados. Se estableció un área de trabajo (área de trabajo, equipo y reactivos) exclusiva para la extracción para reducir la cantidad de ARNasas presentes y evitar la degradación del material genético extraído. Además, con estos cuidados se redujo la probabilidad de contaminación cruzada de las muestras.

Se tomaron consideraciones especiales para el almacenamiento de las muestras tanto del material vegetal y extracciones ya que el virus TSWV es considerado uno de los virus de planta más inestable físicamente y químicamente. La infectividad decae si se alcanza un pH menor a 5, por lo que las extracciones se deben mantener a un pH de 7. Se ha reportado que no se logra la eliminación completa de contaminantes celulares de la planta lo que afecta la degradación del ARN viral (Bald & Pittmal *et al.* 1970). Los productos extraídos fueron precipitados ya que las cantidades trazas de ARNasas presentes pueden alterar la integridad del ARN si se almacena en una solución acuosa. Por esto, fue necesario almacenar el ARN extraído precipitado con una sal y alcohol (Ambion, 2004). Con base en lo anterior las extracciones se almacenaron a -40 °C para promover la precipitación del ARN y evitar su degradación. Aún en estas condiciones las extracciones no deben almacenarse por más de dos semanas, por lo que la reacción de RT se debe realizar antes de este tiempo.

Durante el proceso de estandarización se logró establecer que es indispensable que las extracciones se almacenen precipitadas por 24 horas antes de realizar la transcripción reversa (RT), según lo indica cada método de extracción. En base a pruebas realizadas se determinó que al realizar la reacción de RT antes de este tiempo no se logra la detección del virus. En el caso de la detección del ARN ribosomal de

planta, que se encuentra en mayor cantidad en las extracciones, el tiempo de precipitación puede ser de una a dos horas. Esto indicó que se requiere más tiempo para lograr la precipitación completa del material genético viral y así evitar su pérdida durante los pasos de resuspensión.

2. Método para la reacción de transcripción reversa (RT): El segundo paso de la secuencia fue la reacción de RT para generar ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído. La generación de ADNc se estandarizó utilizando el iniciador «reverse» (L1 TSWVR), ya que al utilizar dos oligonucleótidos (pDT y pN₆) no se logró la detección del virus. La detección del ARN viral al utilizar el iniciador «reverse» se debe a la alta especificidad que éste presenta para unirse al segmento L del genoma viral. En el Apéndice M se presenta la secuencia completa del segmento L del material genético del virus el cual está compuesto por 8, 897 pb (Brunt *et al.* 1996); además, se muestra en gris el sitio de unión del iniciador «reverse» donde se inicia la síntesis del ADNc que posee un tamaño de 276pb.

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo tres métodos de RT diferentes. En uno de ellos la reacción de RT se hizo al mismo tiempo que la de PCR mientras que en los dos restantes, las reacciones se ejecutaron por separado (Ver Metodología). Se determinó que se obtienen mejores resultados al realizar el RT separado del PCR, haciendo uso del Kit Acces RT-PCR Systems Promega© y Kit Reverse Transcription System, Promega©, respectivamente. Sin embargo, al comparar entre estos dos métodos de RT, se obtuvieron mejores resultados al utilizar el Kit Acces RT-PCR Systems Promega©. Las principales diferencias entre estos dos métodos es que el primero utiliza volumen final de reacción de 12 µl, mientras que en el segundo el volumen final es de 20 µl. Además, la concentración final de los reactivos en cada reacción es mayor en el primer método. Entre las ventajas que ofrece el primer método están el uso de un menor volumen de cada uno de los reactivos y menor cantidad de ARN (1.00 µl) como templado, lo que representa optimización en el uso de los recursos en el método de detección del amplicón. Otro de los factores que aumenta el rendimiento de este método es que el tiempo de transcripción del ARN a ADNc es de 45 minutos a 45 °C, mientras que en el segundo método este paso únicamente se lleva a cabo por 15 minutos a 42 °C. Ambos métodos tienen un paso de degradación de la enzima AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) transcriptasa reversa para que no

interfiera con los pasos posteriores de detección. Con base a estas consideraciones se determinó que el protocolo a seguir para la realización del RT es el que se describe en el cuadro 4.

Cuadro 4. Protocolo de Transcripción Reversa con Kit Access RT-PCR Systems, Promega© para la detección del virus TSWV.

CONDICIONES DE REACCIÓN			PROGRAMA DE REACCIÓN		
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Paso	Temperatura	Tiempo
Agua UP	---	---	1	45 °C	45 min
Buffer AMV/Tfl	5X	1X	2	94 °C	2 min
MgSO4	25 mM	2.00 mM	3	4 °C	11 min
dNTP's	10 mM c/u	0.8 mM			
L1 TSWVR	25 mM	4.00 mM			
AMV <small>(transcriptasa reversa)</small>	5 U/ µl	0.6 U/ µl			
ARN		1.00 µl			
	Volumen Final:				
		25.0 µl			

Al igual que las extracciones, los productos de RT se almacenaron a -20 °C precipitados con isopropanol y acetato de amonio. El tiempo de almacenaje de los productos de RT es de 14 días aproximadamente, antes que degrade el ADNc presente.

3. Método para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La detección del virus TSWV se alcanza al lograr la amplificación de un segmento de 276 pb del fragmento L de su genoma. Esta amplificación se lleva a cabo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa haciendo uso del iniciador «reverse» L1 TSWVR y el iniciador «forward» L1 TSWVF, los sitios de unión se muestran en gris en el Apéndice M. La amplificación de este segmento se realizó por dos métodos diferentes (Ver Metodología) y con ambos se logró la detección del genoma viral. El protocolo recomendado en el Boletín EPPO (2004) se utilizó para la amplificación del fragmento deseado utilizando los productos de RT obtenidos con el Kit Access RT-PCR Systems, Promega©. Los productos de RT obtenidos con el Kit Reverse Transcription System,

Promega©, se amplificaron utilizando la receta de PCR recomendada en este kit siguiendo el programa recomendado en el boletín. En ambos procesos de amplificación se utilizó el programa sugerido en el Boletín EPPO (2004). Cabe mencionar que durante este proceso se redujo de 55 °C a 54 °C la temperatura de hibridización de los iniciadores con el fin de reducir la especificidad de unión y así lograr la detección del genoma viral.

La detección del ARN del virus TSWV se alcanzó utilizando dos métodos de PCR. Sin embargo, cuando se utilizó la combinación del producto de RT obtenido con el Kit Access RT-PCR Systems, Promega© y la receta de PCR sugerida por el Boletín EPPO (2004) las bandas fueron más definidas e intensas. Estos resultados sugirieron que este método, probablemente, es más eficiente para la detección del virus. A continuación se presenta el protocolo sugerido para la reacción de PCR (cuadro 5):

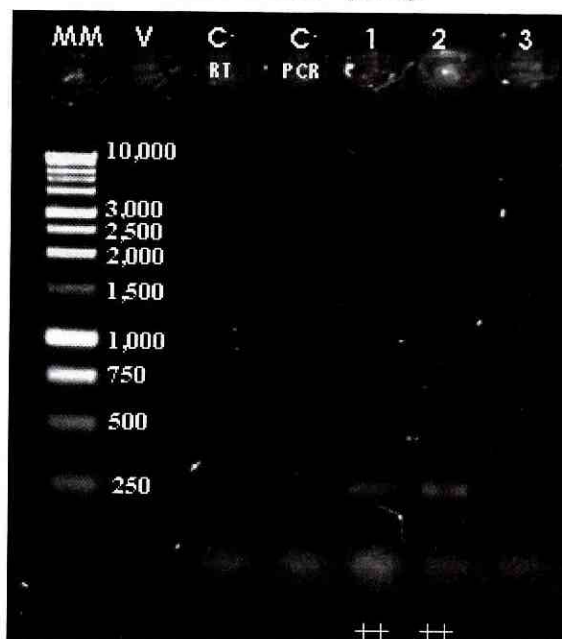
Cuadro 5. Protocolo de PCR según instrucciones del Boletín EPPO (2004) para la detección del virus TSWV.

CONDICIONES DE REACCIÓN			PROGRAMA DE REACCIÓN		
Reactivo	Concentración		Paso	Temperatura	Tiempo
	inicial	final			
Agua UP	---	---	1	94 °C	5 min
Buffer Green <small>Go Taq® Flexi</small>	5X	1X	2	94 °C	1 min
MgCl ₂	25 mM	1.80 mM	3	54 °C	1 min
dNTP's	2.5 mM c/u	1.28 mM	4	72 °C	1 min
L1 TSWVR	25 mM	1.00 mM	29 CICLOS DEL PASO 2-4		
L2 TSWVF	25 mM	1.00 mM	5	94 °C	1 min
Go Taq® Flexi	5 U/µl	0.04 U/µl	6	54 °C	1 min
ADNc		2.00 µl	7	72 °C	10 min
Volumen Final de reacción:		25.0 µl	8	4 °C	«Hold»

El fragmento del genoma viral que se debía detectar es de tamaño pequeño (276 pb), por lo tanto se visualizó en un gel de agarosa al 2.0 % por 70 minutos a 90V

para permitir la separación completa del segmento. En la Figura 11 se muestra que la intensidad de la banda que representa el fragmento que se amplificó utilizando el protocolo de reacción del Cuadro 5 es bastante alta.

Figura 11. Detección de TSWV en crisantemos (cultivados como controles positivos) utilizando receta de RT del Kit Acces RT-PCR Systems, Promega ® y receta de PCR según Boletín EPPO (2004).



Ya que la extracción de ARN es el paso determinante para la detección, se empleó un control interno que permitió determinar que el ARN había sido extraído. Este control se llevó a cabo al amplificar un segmento del gen que codifica para la subunidad 5S de ARN ribosomal de plantas (Kolchinsky *et al.* 1991). De esta forma, se pudo asegurar el funcionamiento del método de extracción y que el genoma no se había degradado durante su manipulación, almacenamiento y detección. Aunque la subunidad 5S de ARN ribosomal de plantas es un gen conservado, el tamaño del fragmento amplificado con los iniciadores utilizados en este trabajo (Cuadro 2) puede variar incluso si se utilizan dos especies diferentes de planta.

Durante el proceso de estandarización del método de detección por RT-PCR se redujo la detección de TSWV en las plantas utilizadas como control positivo. Sin embargo, sí se detectaba la subunidad 5S de ARN ribosomal de planta lo que aseguraba que el ARN se extraía. Las razones por las cuales no se lograba la detección del genoma viral pueden ser: que la carga viral en las plantas fuera tan baja que el

método implementado no lograra su detección o una alta degradación del material genético viral. Otra consideración de importancia es la variabilidad de la carga viral en los tejidos seleccionados para procesar como controles o muestras experimentales. Adicionalmente, se observó que la carga viral, en las plantas empleadas como control, traducida a la cantidad de amplicón generado se redujo con el paso del tiempo. Esto se pudo deber a que al no estar presente el vector no ocurrieran re-infecciones o que la temperatura dentro del invernadero ejerciera un efecto de termoterapia contra este virus, o simplemente que con el paso del tiempo el material genético viral sufriera degradación. La técnica de termoterapia ha demostrado ser eficaz para la eliminación de este virus en crisantemos según reportes obtenidos en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guetamala. Por esta razón fue necesario coleccionar nuevas plantas para ser utilizadas como control.

La secuencia de trabajo sugerida en esta investigación permitió la detección del genoma viral en crisantemos. Sin embargo, por tratarse de un virus de ARN, las consideraciones a tomar durante su manipulación deben ser más astringentes, en especial deben cuidarse las condiciones de trabajo durante la etapa de extracción. De igual forma los tiempos y condiciones de almacenamiento, degradación del ARN viral, la selección de la muestra y carga viral en las muestras son factores importantes.

C. Determinación del método más adecuado para la extracción del ARN del virus TSWV.

El ARN de las muestras fue extraído utilizando dos protocolos diferentes (Ver Metodología) con el fin de establecer cuál de ellos era el óptimo para la extracción del ARN viral de TSWV. Al utilizar el método Locali *et al.* como método de extracción se logró la detección del virus en dieciséis muestras crisantemos. Con el método Lee, R. el número de crisantemos que se detectaron como infectados con TSWV fueron tres, de las cuales dos también fueron detectadas como positivas (muestra 6 y 10) al utilizar el método Locali *et al.* Con base en estos datos se realizó el análisis estadístico de Chi cuadrado (χ^2) cuyos resultados se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación entre dos métodos de extracción diferentes utilizando la prueba estadística χ^2 .

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	POSITIVAS	NEGATIVAS	TOTAL
Locali <i>et al.</i> (2003)	16	14	36
Lee, R. (2003)	3	33	36
RESULTADOS DE LA PRUEBA χ^2			
$\chi^2 =$	8.502	Intervalo de Confianza al 95%	
p =	0.0035	Grados de Libertad = 1	

Los resultados del análisis estadístico sugieren que hay diferencia significativa entre la proporción de muestras en las cuales se detectó el virus al utilizar estos métodos de extracción. Por lo tanto, se puede considerar que el método de extracción más sensible es el sugerido por Locali *et al.* En el Apéndice N se presenta el gel de resultados para cada método, donde se observa que para las extracciones con el método Locali *et al.* 2003 las bandas son más definidas e intensas, sugiriendo que este método podría incrementar el rendimiento de extracción del ARN viral.

Dentro de las muestras analizadas había dos tipos de crisantemos, con lo que se logró comprobar que el tamaño del fragmento amplificado para la detección del segmento 5S ribosomal de planta difiere entre especies. Esto se comprobó al utilizar la muestra 23 (sencillo) y la muestra 20 (anémona) utilizando el método de Lee, R. para la extracción del ARN ribosomal. En consecuencia, como se observa en el gel, los fragmentos amplificados son diferentes (Apéndice N, Figura 14). Esto sugiere que aunque el gen que se amplifica se encuentra en todas las plantas del mismo género el tamaño va a variar según la especie. Los resultados también demuestran que esta variación de tamaño es independiente al método de extracción que se utilice.

Según lo indicado en el análisis estadístico con el método de Locali *et al.* se logra la extracción del ARN viral. Al visualizar los geles de los productos extraídos con el método Locali *et al.* en algunas muestras se observa una banda de menor tamaño que la banda de interés y en otras la banda de interés presenta una menor

intensidad. Debido a esto se realizó de nuevo la reacción RT-PCR a estas muestras, conjuntamente con las muestras positivas. Los resultados demostraron que las bandas de baja intensidad son muestras positivas ya que se volvió a detectar la banda y coincide con el tamaño del fragmento deseado. La banda que se observó bajo el producto principal se puede deber a la generación de productos inespecífico, generados por la inespecificidad de unión de los iniciadores con la secuencia del segmento L del genoma viral. En complemento con esta inferencia, se sabe que el iniciador «reverse» no es complementario a la secuencia del genoma de TSWV en una base y el iniciador «forward», en tres bases.

Con el fin de eliminar cualquier incertidumbre en cuanto a si el fragmento que se visualizaba correspondía al genoma viral de TSWV se llevó a cabo la secuenciación de este fragmento. A partir del producto de PCR se llevó a cabo la purificación del fragmento amplificado y se envió a secuenciar a MACROGENE (Maryland, Washington D.C.). En el Apéndice O se muestra la secuencia obtenida, la cual se analizó con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST por sus siglas en inglés) del National Center for Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés). El análisis de los nucleótidos mostró una similitud del 96% con la secuencia del gen L de la polimerasa de ARN dependiente de ARN del virus *Tomato spotted wilt virus*, tanto con el iniciador «reverse» como con el «forward». Con esto se comprueba que el método de RT-PCR implementado logra la detección del genoma viral de TSWV a partir de tejido vegetal de crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) empleando el método de extracción sugerido por Locali *et al.*

D. Parámetros de la sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA para la detección del virus TSWV en crisantemo.

La técnica utilizada actualmente para la detección del virus TSWV en el Laboratorio de Protección Vegetal es la prueba de ELISA por lo que este trabajo proponía la implementación de una técnica molecular con mayor sensibilidad y confiabilidad. Por lo que fue necesario comparar los resultados de ELISA y del protocolo de RT-PCR sugerido en este trabajo. Debido a que éste es un trabajo preliminar, la determinación de estos parámetros para el protocolo de extracción y RT-

PCR estandarizado se realizó utilizando únicamente 36 muestras de crisantemos que presentaban síntomas característicos de infección por TSWV.

Las muestras fueron diagnosticadas por ELISA, utilizando controles negativos y positivos. Se estableció que una muestra positiva sería aquella que su absorbancia fuera el promedio de los controles más-menos dos desviaciones estándar de las lecturas generadas. Bajo estas consideraciones siete fueron las muestras diagnosticadas como positivas para la presencia del virus TSWV con este método (Apéndice P). Sin embargo, la técnica molecular detectó la presencia del virus en 16 muestras (Cuadro 7).

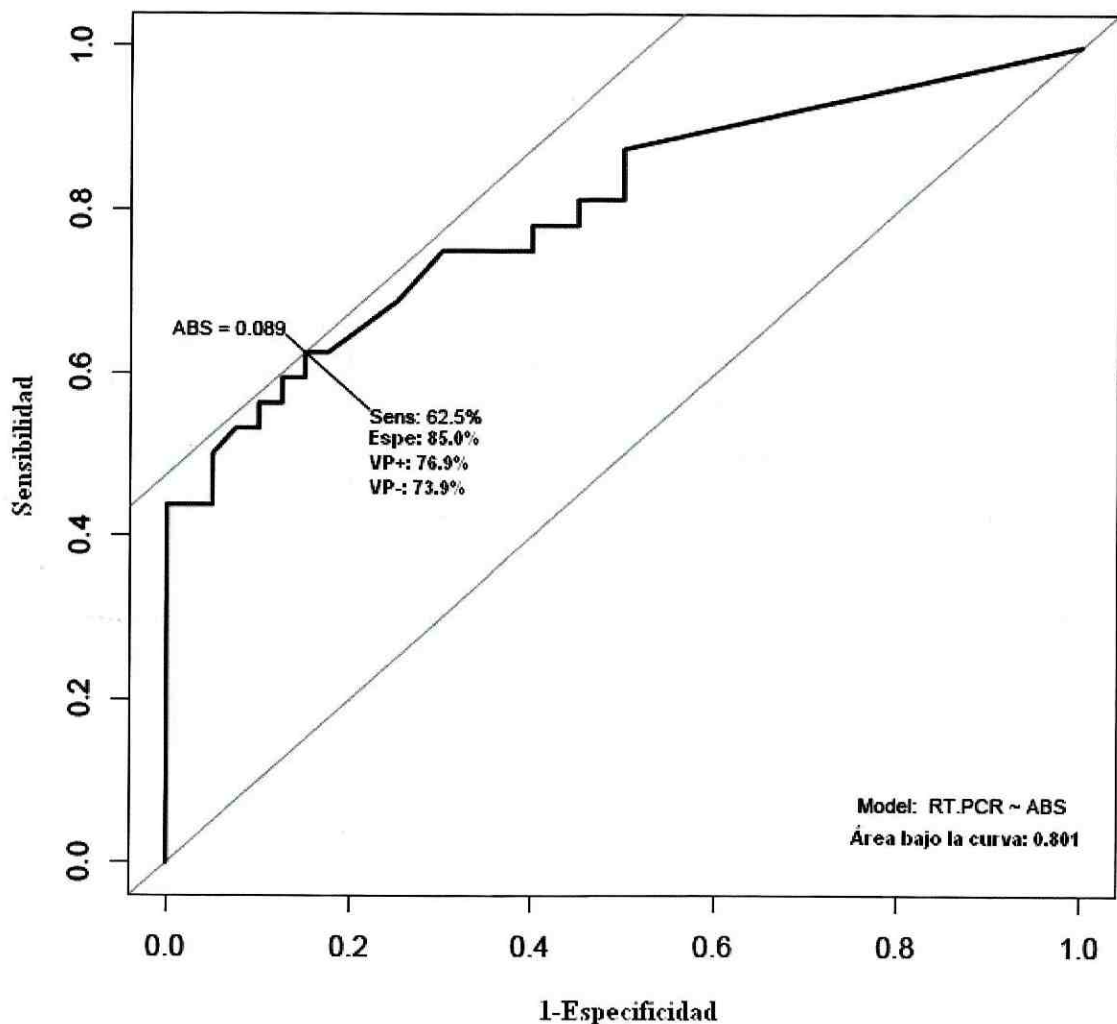
Cuadro 7. Comparación de los resultados para la detección de TSWV en Crisantemos utilizando dos métodos diferentes.

MÉTODO DE DETECCIÓN	POSITIVAS	NEGATIVAS	TOTAL
RT-PCR	16	20	36
ELISA	7	29	36

Los resultados que representan en el Cuadro 7 sugieren que el método de RT-PCR logra detectar un mayor número de muestras positivas. Sin embargo, se utilizó el análisis estadístico de la Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para comprobar esta inferencia. Esta curva permite representar los pares sensibilidad en función de 1-especificidad, para establecer los parámetros de especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA en comparación con la técnica de RT-PCR (Figura 12). La curva ROC proporciona una representación global de la exactitud diagnóstica. Además, en esta curva se puede observar cómo al aumentar la especificidad de la prueba diagnóstica se disminuye la sensibilidad de la misma. La Curva ROC generada con los datos del Cuadro 7 posee un área debajo de la curva de 0.801 lo que demuestra que la técnica de ELISA puede utilizarse para diagnosticar correctamente aproximadamente el 80.1% de las muestras. Esto significa que esta técnica permite detectar la presencia o ausencia del patógeno suficientemente bien.

En la gráfica se puede observar que en el punto de corte óptimo (0.089) para la prueba la sensibilidad es del 62.5% y la especificidad de 85.0%. Estos valores indican que la técnica de ELISA es bastante específica lo que indica que la probabilidad de dar un resultado falso positivo es baja. Sin embargo, la prueba demuestra ser poco sensible por lo que al tener un resultado negativo no se puede asegurar que el patógeno esté ausente. Esto se puede traducir a que esta técnica no logra detectar al virus cuando la carga o proteínas virales en los crisantemos es baja o que la detección depende del tejido vegetal que se seleccione y la presencia del virus en el mismo.

Figura 12. Curva ROC para la validación de la técnica RT-PCR.



Los valores de especificidad y sensibilidad se correlacionan con los valores predictivos positivos y negativos, respectivamente. En este caso el valor predictivo

positivo es del 77.0 % lo cual demuestra que la técnica de ELISA es bastante buena para identificar verdaderos positivos. En relación a los resultados obtenidos por RT-PCR, éstos presentan una especificidad del 68.7% y una sensibilidad del 100%.

Estos resultados sugieren que la utilización de la técnica de ELISA no es aconsejada para realizar un monitoreo del virus TSWV, por lo que se sugiere que para lograr una detección confiable del virus TSWV es necesario implementar una secuencia de trabajo. El tamizaje inicial se debe realizar por medio de la técnica de ELISA la que indicará cuáles muestras contienen al virus. Luego, se debe utilizar el protocolo de RT-PCR implementado para confirmar los resultados positivos; pero más que nada para detectar posibles muestras positivas que por ELISA se detectan como negativos para la infección con TSWV. Esta secuencia de trabajo es la que se recomienda en el boletín EPPO, 2004 (Apéndice Q).

Además, se espera ofrecer eventualmente este protocolo de diagnóstico como servicio a cooperativas, agricultores, etc. para la detección de Tospovirus en general, TSWV e INSV detección más específica. Así mismo, se debe incrementar el número de muestras procesadas para poder iniciar el proceso de validación de la técnica molecular; sin embargo para ello la comparación se debe hacer versus la prueba estándar de oro: plantas indicadoras según el EPPO (2004). Como parte del proyecto AGROCYT 05-2006 se intentará determinar la presencia de este patógeno en los insectos reportados como vectores del TSWV, para aportar elementos al conocimiento del ciclo infeccioso de este virus en ornamentales y otros cultivos de hortalizas en Guatemala.

VIII. CONCLUSIONES

1. La técnica molecular transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) sí permite detectar el virus TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*) en crisantemos colectados en San Juan Sacatepéquez, Guatemala.
2. Se optimizó el protocolo de detección de TSWV empleando el método de extracción de Localli *et al.*, el Kit de Transcripción Reversa Access RT-PCR Systems Promega© (Madison, WI Estados Unidos) y los parámetros para RT-PCR indicados por el boletín EPPO (2004).
3. El método de diagnóstico sugerido en este trabajo fue optimizado con el fin de establecerlo como un método de detección del virus TSWV que se pueda prestar como un servicio.
4. El diagnóstico del virus utilizando la técnica de ELISA posee una alta especificidad (85.0%) pero una sensibilidad baja (62.5%), con valores predictivos positivos y negativos del 77% y 74%, respectivamente. Por lo tanto, al obtener un resultado positivo muestra que la planta está enferma, es decir, que la probabilidad de que el virus esté presente en el crisantemo es alta. Sin embargo, un resultado negativo no implican necesariamente la ausencia del virus en el crisantemo. Lo cual indica que es necesario realizar el diagnóstico tanto con la técnica de ELISA como con el método implementado de RT-PCR para generar resultados confiables.
5. En comparación con la técnica ELISA, la prueba RT-PCR tiene un 100% de sensibilidad y un 68.97% de especificidad.
6. Aunque es un estudio preliminar, los resultados ponen en evidencia la circulación del virus TSWV en los crisantemos del municipio San Juan Sacatepéquez, Guatemala.

IX. RECOMENDACIONES

A. METODOLÓGICAS:

1. Se recomienda, con base en las pruebas y resultados obtenidos durante este trabajo, aumentar las condiciones de amplificación para eliminar productos inespecíficos. Además, se deben estudiar qué modificaciones se pueden realizar al protocolo que se sugiere en este trabajo para aumentar su sensibilidad en la detección del virus. Por ejemplo, monitoreando las concentraciones y pureza de ARN y ADNc para establecer si se requiere mejorar el rendimiento de extracción o si existe la presencia de inhibidores.
2. Con el fin de optimizar recursos y tiempo del diagnóstico de este virus se recomienda hacer pruebas para determinar si el virus puede ser detectado al realizar la reacción de transcripción reversa y la amplificación en un solo paso y no de forma separada como se sugiere en este trabajo.

B. NO METODOLÓGICAS:

1. Se sugiere continuar con los trabajos de detección del virus TSWV en otras plantas de cultivo (ornamentales u hortalizas) con el fin de evaluar la aplicación del método para diagnóstico que se establece en este trabajo. De igual forma, es importante que se realicen trabajos para detectar la circulación del virus en diferentes regiones de Guatemala y realizar un monitoreo para determinar las cepas de TSWV que se encuentran en el país. Estos resultados darán información sobre la ecología del virus en términos de estacionalidad, hospederos y clima que podrán ser empleados en un futuro para estimar el impacto de este virus en cultivos susceptibles.
2. Al conocer los cultivos y áreas afectadas es importante que se identifique la(s) especie(s) del vector con mayor competencia para la transmisión de TSWV. De esta forma se podría sugerir e implementar métodos de control y prevención dirigidos al vector y reservorios naturales del virus. Con esta información se podrían reducir las pérdidas que este virus representa a los agricultores.

X. LITERATURA CITADA

- Adkins, S. y T. Momol. 2005. Tospoviruses (Family *Bunyaviridae*, Genus *Tospovirus*). Universidad de Florida. Fact Sheet PP-212. 1-5pp.
- Antignus, L., M. Lapidot, N. Ganaim, J. Cohen, O. Lachman, M. Pearlsman, B. Raccach y A. Gera. 1997. Biological and molecular characterization of *Tomato Spotted Wilt Virus* in Israel. *Phytoparasitica* 25(4):319-330.
- Bezerra, I., R. Resende, L. Pozzer, T. Nagata, R. Kormelink, y A. De Ávila. 1989. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *Chrysanthemum* and one from *Zucchini*. *Phytopathology Brasil* 89 (9): 823-83.
- Brown, T.A. 2001. Gene cloning and DNA analysis. Cuarta Edición. Editorial Blackwell Science. Osney Mead, Oxford. United Kingdom. 363 pp.
- Brunt, A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A. Gibbs, L. Watson y E. Zurcher. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database. (Última revisión: 18 de octubre del 2007). Disponible en: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Büchen-Osmond, C. 2003. *Tospovirus*. *International Committee on Taxonomy of Viruses-Data Base (ICTVdB)*. Nueva York, Estados Unidos. (Última revisión: 2 de agosto del 2007). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- Cordeiro, L., N. Viboon, F. De Assis, G. Pio-Ribeiro, C. Deom y J. Sherwood. 2006. Evaluation of peanut genotypes for resistance to *Tomato spotted wilt virus* by mechanical and trips inoculation. *Pesquisa agropecuária*. Brasil 41(6): 937-942.

- Cranshaw, W. 1988. Western flower thrips/*Tomato Spotted Wilt Virus*. Greenhouse insect pest management sheet (3).
- EPPO/CABI. 1997. *Tomato Spotted Wilt Tospovirus*. Quarantine pests for Europe (Wallingford) (2nd ed). CAB International, Wallingford (GB). 1379-1387 pp.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. *Tomato Spotted Wilt Tospovirus, Impatiens Necrotic Spot Tospovirus and Watermelon Silver Mottle Tospovirus*. Bulletin OEPP/EPPO 34:271-279.
- Francki R., R. Milne and T. Hatta. 1985. *Tomato Spotted Wilt Virus*. Boca Raton. Atlas of Plant Viruses 1:101-10.
- Hadidi, A., R. Khetarpal y H. Koganezawa. 2005. Plant virus disease control. Segunda Edición. The American Phytopathological Society Press. Minnesota, Estados Unidos. 683 pp.
- Inouei, T. y T. Sakurai. 2006. Infection of *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) shortens the life span of thelytokous *Trips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). Japón. Applied Entomology and Zoology. Marioka. 41 (2):239-246.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport y M. Schlomchick. 2001. Immunobiology: The immune system in health and disease. Quinta Edición. Garland Publishing. New York. Estados Unidos. 732 pp.
- Kolchinsky A., M. Kolesnikova, y E. Ananiev. 1991. Portraying of plant genomes using polymerase chain reaction amplification of ribosomal 5S genes. *Genome*, 34:1028-1031.
- Lanciotti, R. 2003. Molecular amplification of assays for the detection of Flaviviruses. *Advances in Virus Research* 61:67-98.
- Lehninger, A., D. Nelson y M. Cox. 2005. Principles of Biochemistry. Worth Publishers Inc. New York. Estados Unidos. 1119 pp.

Lewin, B. 2006. *Essential genes*. Prentice Hall. Estados Unidos. 608 pp.

Mejía, L. 2006. Distribución e importancia de royas en *Chrysanthemum morifolium* Ramat, San Juan Sacatepéquez. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. 48 pp. Trabajo de tesis para la obtención del título de la Licenciatura en Agronomía de la Universidad San Carlos de Guatemala.

Nagata, T., A. K. Inoue-Nagata, H. M. Smid, R. Goldbach y D. Peters. 1999. Tissue tropism related to vector competence and specificity for transmission of *Tomato Spotted Wilt Virus*. *Journal of General Virology* (80):507-515.

Parrella, G., P. Gognalons, K. Gebre-Selassie, C. Vovlas³ y G. Marchoux. 2003. An Update of the host range of *Tomato Spotted Wilt Virus*. North Carolina. Estado Unidos. *Journal of Plant Pathology* 85:227-264.

Promega Corporation. 2006. Reverse transcription system technical bulletin. Madison, WI Estados Unidos. (Última revisión: 2 de agosto del 2007). Disponible en: <http://www.promega.com/tbs/tb099/tb099.pdf>

_____. 2007. Access transcription system technical bulletin. Madison, WI Estados Unidos. (Última revisión: 2 de agosto del 2007). Disponible en: <http://www.promega.com/tbs/tb220/tb220.pdf>

_____. 2007. SV 96 total RNA isolation system technical bulletin. Madison, WI Estados Unidos. (Última revisión: 2 de agosto del 2007). Disponible en: <http://www.promega.com/tbs/tb294/tb294.pdf>

R Development Core Team. 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. (Última revisión: 2 de agosto del 2007). Disponible en: <http://www.R-project.org>.

- Reitz, S. R. 2005. Biology and ecology of flower trips in relation to *Tomato Spotted Wilt Virus*. First International Symposium on Tomato Diseases. *Acta Horticulturae* .(ISHS) 695:75-84
- Reyes, L. 2007. Detección de *Pythium* y *Phytophthora* patógenos de flores de corte en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Departamento de Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. 58 pp. Trabajo de tesis para la obtención del título de la Licenciatura en Agronomía de la Universidad San Carlos de Guatemala.
- Samuel, G., J. Bald y H. Pttman. 1930. Investigations on “spotted wilt” of tomatoes. Australia. *Commonwealth Council of Scientific and Industrial Research Organization Bulletin*.. 44:8–11.
- Sieczkarski, S.B. y G.R. Whittaker. 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. Estados Unidos. *Journal of General Virology*. 83:1535–45.
- Tsuda, S, I. Fujisawa, J. Ohnishi, D. Hosokawa y K. Tomaru. 1996. Localization of *Tomato Spotted Wilt* Tospovirus in larvae and pupae of the insect vector *Trips setosus*. *Phytopatology* 86(11):199-2003.
- Whitfield, A., D. Ullman y T. Germani. 2005. Tospovirus-trips interactions. Wisconsin, Estados Unidos. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:459–89.
- Zar, J. 1984. Biostatistical analysis. Tercera Edición. Editorial Prentice Hall-Inc. New Jersey. Estados Unidos. 662 pp.

XI. APÉNDICE

Apéndice A. Boleta de colecta.

Tejido	Sintomas/ No. de Crisantemo	C0001	C0002	C0003	C0004	C0005	C0006	C0007	C0008
Planta	Enanismo								
	Necrosis								
	Cambio de Coloración								
	Producción (Abundancia)								
	Floración (coloración, aborto)								
Hojas	Pérdida de turgencia o rigidez								
	Tamaño reducido								
	Asimetría o distorsión								
	Enaciones								
	Epinastia								
	Necrosis o manchas necróticas								
	Bronceado								
	Anillo Cloróticos								
	Doblez de hojas								
	Mosaico amarillo								
	Mosaico morado								
Flor	Enrollamiento hacia arriba								
	Enrollamiento hacia abajo								
	Decoloración de pétalos								
Venas deformes	Distorsión de la flor								
	Anillos en pétalos								
	Pronunciadas								
Tallo	Color anormal								
	Distorsionadas								
	Nudos cercanos								
	Manchas necróticas								
	Mosaico								
	Clorosis								

Apéndice B. Método de extracción según Locali *et al.* (2003).

La extracción se realizó a partir de 0.1 g de tejido vegetal fresco de crisantemos el cual se maceró en presencia de nitrógeno líquido. Luego se agregaron 500µl de tampón de lavado (Tris-HCL pH 8 10mM, EDTA 1mM, NaCl 2M y BSA 0.05% p/v) y se agitó con vórtex. Se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 600 µl de tampón de extracción (CTAB 2 % p/v, NaCl 1.4 M, Tris HCl pH 8 y 2-mercaptoetanol 0.5 % p/v) y se agitaron con vórtex. Luego de una incubación de 20 minutos a 55 °C se agregaron 400 µl de fenol:cloroformo:isopentanol (25:24:1), se agitó con vórtex y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. La fase acuosa (superior) se transfirió y se agregó 1.0 volumen de isopropanol frío y 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5M. Se incubaron por 24 horas a -20 °C o hasta realizar el RT-PCR. Al momento de utilizar el RT-PCR y se centrifugaron por 5 minutos a 14,000 rpm. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 100 µl etanol al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm. Se decantó el

sobrenadante, se secó el precipitado al aire y se resuspendió en 20 μ l agua ultrapurificada (Locali *et al.* 2003).

Apéndice C. Método de extracción según Lee (2003).

Se realizó partiendo de 0.2 g de material vegetal fresco de crisantemos. Se maceraron las muestras en presencia de nitrógeno líquido y se pesaron 0.2 g del tejido vegetal pulverizado. Se agregaron 400 μ l del Tampón STE 1X (Tris-HCL pH 8 0.1 M, NaCl 1.0 M y EDTA 0.01 M), 500 μ l de fenol:cloroformo:isopentanol (25:24:1) y 90 μ l de SDS al 10% (p/v). Se agitó con vórtex brevemente y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 10 min. Se transfirieron 333 μ l del sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 0.02 g de polvo CF-11 y 80 μ l de etanol al 95 %. Se mantuvo en hielo con agitación constante por 30 min. Se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 400 μ l de Tampón STE 18% (STE 10X, etanol 95% y agua ultrapurificada). Se agitó con vórtex brevemente y se mantuvo en hielo con agitación constante por 3 min. Estos pasos de centrifugación por 1 min a 14,000 rpm a 4 °C, decantar el sobrenadante, agregar 400 μ l de Tampón STE 18% e incubar por tres minutos se repiten cuatro veces en total. Luego se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 400 μ l de Tampón STE 1X. Se mantuvo con agitación constante por 5 min y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol al 95% frío y 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3 M (pH 5.2). Se mezcló bien y se almacenó 24 horas a -20°C o hasta que se realice el RT-PCR. Al momento de realizar el RT-PCR se centrifugó por 25 min a 14,000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l de etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo por 10 min a 14,000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante, se secó el precipitado al aire y se resuspendió en 20 μ l de agua ultrapurificada.

Apéndice D. Método de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés) según el kit Access RT-PCR Systems Promega© (Madison, Winsconsin Estados Unidos).

Se preparó la reacción según los reactivos e indicaciones del fabricante utilizando 25 μ l como volumen final de reacción. Las concentraciones finales en la reacción fueron: Buffer MLV-Tfl 1X, MgSO₄ 1.00 mM, iniciador «reverse» 1.00 μ M, 1.00 μ l iniciador «forward» 1.00 μ M, dNTP's 2.5 mM de cada uno, enzima

«reverse» AMV 0.10 μM , enzima polimerasa Tfl 0.10 μM y 2.00 μl del ARN de la extracción. El programa que se utilizó es el indicado en el Kit: 45 minutos a 45 °C, 2 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 2 minutos a 68 °C y un ciclo opcional de 7 minutos a 68 °C para luego mantener a 4 °C. Se utilizó el termociclador Mascercycler Personal, Eppendorf (Alemania, No. de registro 533202407) del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala.

Apéndice E. Método de RT según Boletín EPPO (2004).

En este método se siguieron las instrucciones de la preparación de la reacción de RT-PCR, utilizando los reactivos del Kit Acces RT-PCR Systems Promega®. El volumen final de reacción fue de 12 μl y la concentración de cada uno de los reactivos fue la siguiente: Buffer MLV-Tfl 1X, MgSO_4 2.00 mM, iniciador «reverse» 4.00 μM , dNTP's 0.8 mM de cada uno, enzima «reverse» AMV 0.6 U μl^{-1} y 1.00 μl del ARN de la extracción. Debido a que se trabaja con la enzima del Kit se empleó el programa indicado en el Kit: 45 minutos a 45 °C, 2 minutos a 94 °C y 11 minutos a 4 °C. Se empleó el mismo termociclador descrito en el Apéndice D. En este método la generación de ADNc (transcripción reversa) se realiza separada de la amplificación del ADN (PCR).

Apéndice F. Método de RT según el Kit Reverse Transcription System, Promega® (Madison WI, Estados Unidos).

La reacción se llevó a cabo utilizando los reactivos y según las instrucciones del fabricante. El volumen final de reacción fue de 20 μl , con las siguientes concentraciones finales de reactivos: Buffer AMV 1X, MgCl_2 5 mM, iniciador «reverse» 1.25 μM , dNTP's 1.0 mM cada uno, inhibidor de ribonucleasas RNasin® 1.00U μl^{-1} , enzima «reverse» AMV 0.75 U μl^{-1} y 2.00 μl del ARN de la extracción. El programa de reacción utilizado fue el indicado en el kit: 15 minutos a 42 °C, 5 minutos a 95 °C y 5 minutos a 4 °C; se llevó a cabo utilizando el termociclador descrito en el Apéndice D. En este método la reacción de PCR se realiza posteriormente a la generación del ADNc.

Apéndice G. Método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) según Boletín EPPO (2004).

Se preparó un volumen final de reacción de 25 μl , con los reactivos a las siguientes concentraciones finales: Buffer Green GoTaq® Flexi Promega ® (Madison WI, Estados Unidos) 1X, MgCl_2 Promega ® (Madison WI, Estados Unidos) 1.8 mM, dNTP's 1.28 mM, iniciador «forward» 1.0 μM , iniciador «reverse» 1.0 μM , Polimerasa GoTaq ® Flexi Promega ® (Madison WI, Estados Unidos) 0.04U μl^{-1} y 2 μl de ADNc. El programa utilizado consta de los siguientes pasos: 5 min a 94 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C, 29 ciclos (del paso 2-4) 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 10 min a 72 °C. Se utilizó el termociclador descrito en el Apéndice D.

Apéndice H. Método de PCR según kit Reverse Transcription System, Promega®.

Se realizó según las concentraciones de reacción del fabricante, utilizando un volumen final de 25 μl . Cabe mencionar que este es un kit para realizar la reacción reversa, por lo tanto no provee los reactivos para PCR como *Taq* polimerasa, buffer y cloruro de magnesio. A continuación se presenta la concentración final de cada reactivo: Buffer Green GoTaq® Flexi Promega ® (Madison WI, Estados Unidos) 1.0 X, MgCl_2 Promega ® (Madison WI, Estados Unidos) 2.5 mM, iniciador «reverse» 0.8 μM , iniciador «forward» 0.8 mM, dNTP's 25.0 mM, Polimerasa GoTaq ® Flexi Promega ® (Madison WI, Estados Unidos) 0.1 U μl^{-1} y 2.00 μl del ARN de la extracción. Se empleó el mismo programa y termociclador indicados en el Apéndice G.

Apéndice I. Preparación del buffer TAE 1X.

Se preparó a partir del buffer TAE 50X (Tris-Base 2.0 M, Ácido Acético 5.7% y EDTA 0.5 M pH 8.0).

Apéndice J. Preparación de Buffer de Extracción Directo para ELISA.

Este buffer se prepara a partir de 1000 ml de PBST y 20.0 g de Polivinilpirrolidona (PVP-40). A su vez el PBST está compuesto por 1000 ml de PBS (pH 7.2- 7.4) y 0.5 ml de Tween 20. Para la preparación de 1000ml PBS se utilizó 8.0g el NaCl, 0.2g KHPO_4 , 1.15g Na_2HPO_4 , 0.2g de KCl y 0.2g de NaN_3 .

Apéndice K. Cálculo del tamaño de muestra utilizando el programa R Development Core Team (2007).

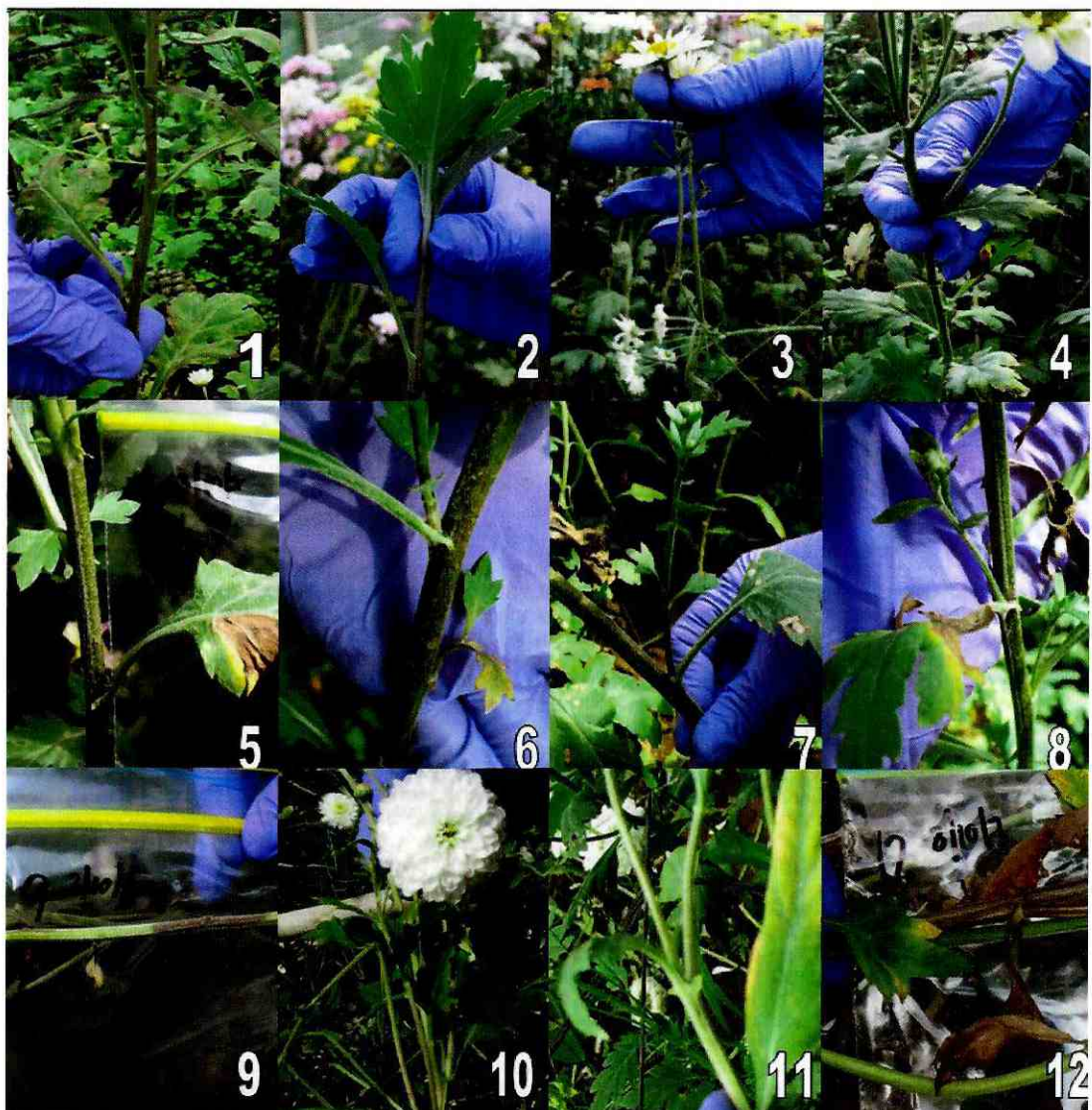
α	0.05	β	0.8	
Trat	n	+	p	q
1	20	11	0.55	0.45
2	20	3	0.15	0.85

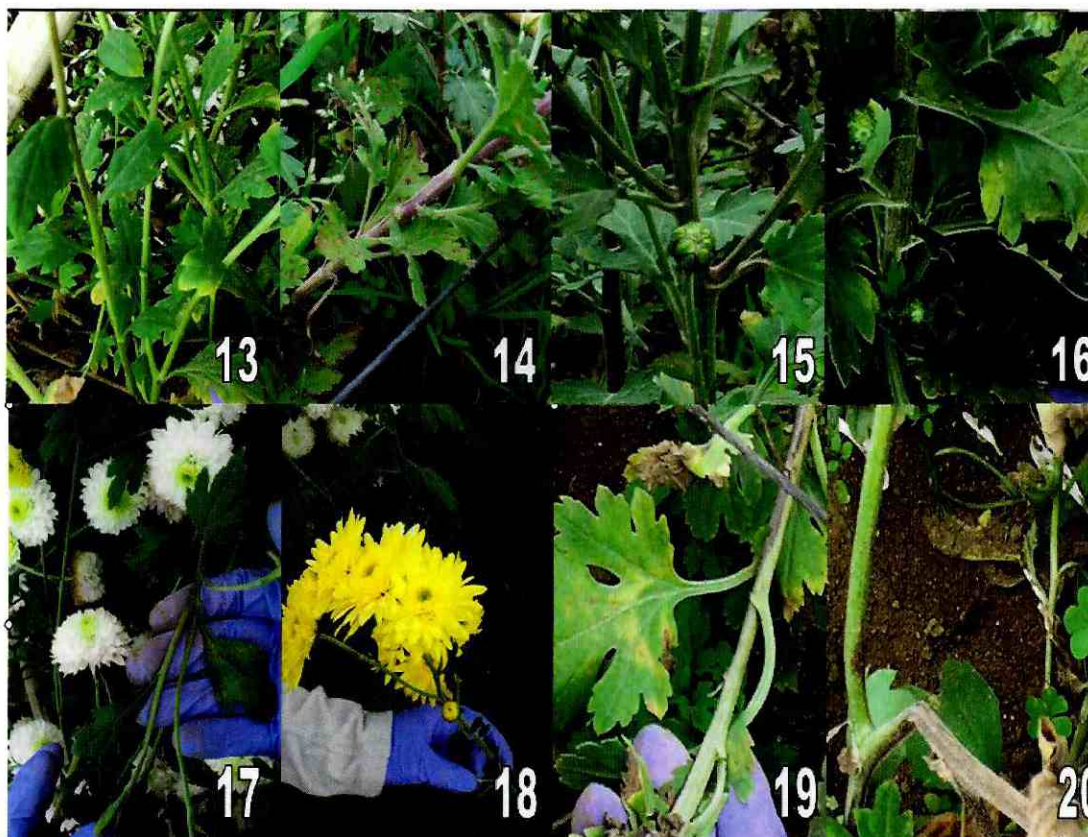
δ 0.4

$n = 27$

Apéndice L. Fotografía del tejido vegetal muestreado.

Figura 13. Muestras colectadas para la detección del virus TSWV fotografías tomadas en los invernaderos del municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Los números corresponden al número de identificación de la muestra.





Apéndice M. Secuencia del fragmento L del genoma del virus TSWV y los sitios de unión de los iniciadores utilizados para la detección.

Secuencia de iniciador reverse (L1 TSWVR): 5'-AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC-3'

Secuencia de iniciador forward (L2 TSWVF): 5'-ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA-3'

AGAGCAATCAGGTACAACATAAATCTCTCCATAACCAGACTTTACAAATAAATATATAAGAATCCCTCCAGTGAAACT
 ATACCGGGACTCTACATTTACATGCACATATAGATTTGGTTCCACAAATGTCTTTAGGCTAATCAGATCTAACCTAATTTCAAATAA
 CAAAAAATTTGTATTCTAAGTTCTATCTAATCCATATCCATGCATTGTTGGGCATTACTATTAATTTAATCTGTGTCTTCTTCTTC
 ATCAATTTTCATCTTCATCAAAGGCATCTTCTTCTCCTCTTAGATAAATAAGCAAGAAATCGTCTCATCTGTTTCAACAACCTTCATC
 CAACTCACTTATTTACTCAAATAATCTCTTGTGTCATGATATAATCATTGATATCAGAGTAGGTGTATCTTCCATACAAGGT
 TTTCTCTGACAAAACATAGTGGATGTCTGGAAAGAAAATTTGCAATATCTTTATAAAACCCCTAATTTTTTAGTTCGTGATTTGTTTCATC
 TCTTAATTTGATCAAGGCTTTCTTGACTCTTCCATACAAGAAAATGCTCCTTAGACTTGTCTTTTGTGACGTTTAGATAACCTTCCAA
 GCTGTGAGTATCTCATTAAAGGGACAATTTACATTTCTTATATCCATATAAACAGTTGCATAAACTTTGAGTGCAGGTACACTGGA
 ACTTAACCTACCCCAATCTGTGAGTGAATAATGTCTGGTCTAAAACCTGTTCCGCAACAATGTCTCTATATCAAACCTGGTTCCCTT
 TATCCCTCCAATCAAGAAATTTATCAACTCACTTAGTAGAAGTGTATTTGCCGGGAATAAAAAACCCCTTCTTTTTCTTTAATCTT
 CATTTCCTTTGATCAAACCTTTCATACATTTCTTCCCTCATCTAGCCTCAACACATTAATACTAGCAAGCCCTCAAATTTCTTCATCAGA
 CCTATCCATTTTAGATTCTCTCCAGATATAACAAACCCATTTCTTTCAGTATTTCTCTAGATAGTTCTGATAATTTTATGTCTGG
 TAAAACCCAGCGTCTGAAATCATAACTTTTTTCCATTAATTTGTTTTGCAAGTCCAGATCATGGTTCAATCTTATTTCTCTCCCGAA
 TGTGGCATAATGTCCTGCTAAGAACATTTCTCAAACCTGCTAAGTTTAAATATAGAGTCATTGTTGTGGCATTGTTTCAAGCTTTAAT
 CAGTTGGATCATTCTAACAAGTTGAATTTCCCTATCTCTATGTGTTTTTTTTGCCATTAGTTCAACAGCATGCATTCCAGTGGCTCT
 ATAGCTTTTTAATCCTGATGCATCATTGATCAGGGAATATTTAAGCATGAGCAGTATTTCTTTGAAACCTTCCAAATCTCTAGTGTA
 CTGTTTTGCTTTATCAACAATCTCTGAAAACAGAGACTATACTATCTCAAAGTTATCATGTCTTTAGCAAGTTTTCGAATGTTTCAAGT
 TTCCACTGTGTCATTAACCACTTTTCATCAAGATAAATATCATATCTTCTACACTTTTGGAGTTTTCCAAACCTTCAAGCAGGT
 ATCCCGGATGTTCAATAAGAAATCATCCATCGTTTCTCTGATATCATCGTCTACAATCTCTTTGATCTGCTGTGATAAGTTTCCAAA
 GGCTTCTATGAAAGTTAAAGAGGTCATGAGCCTGTTTTTATGGTTTTGATTGTTTCAGTTTCAGAGTCTGCGATTTTGTACATATC
 AGAAAACATTTCCCTACTTCCAGGAAGCTCAAGACTAGAGACTTTTGGCCCTCTATAAATATCCCATACATCCGGAGTTCAACATTTT
 ATATTTTATCTTCAACAATAATTTTACATTTCTAGTCTTATTTGTCTTGATGTGGCATTAAACCTTGACAATCATTTTGTTTTCTGT
 AGTCATTTCTAATGCAGGCATCTCTGGTTCTAAGAAAACAATCTGTGGTTGTTTTGACTTTTATATGTTTCACTTTTCAACATAAAA
 TTTCTGCAACAATTTCTCTATACTTCTCTGTATGTATCAAAAAGATACTCTCTTTTCATTCAATCTCGAATGGTGTCTCAAGA
 AACTGTACATCTCTGATCAGAAGCTATCAATGAACATAACAGCTTCTGTGATGATCCCAATTTTGTACATTTGTTCCAGAGACATA
 ATTTCTGATTCGTCTTGTCTTCTCAGTTTTCATATCTTACATCACTTCTTCTAATATATCTGATAACAAAATCTAATGTTCTATG
 AGAACAAAACCCATGTTCCACATCCAGACAATTTGTTTTCTGGATTTGTGTTCAATTCAGTGTATGTGATAGGATCACATTTGATAC
 TGTGAAGCCACTTGTCTGAGTTGTTAATCCGTTTCATTTGTCTTAAACTCTGCCATATTTGGCTTGTCTATCAAGGCACACAT

TTGTAATATCAAACATATGCTCTTCTCTGTAATGTTGGGAAAAGTGACTGCAATTTATCTGATATGTATACAGCAGTGTCCAGTAT
TTTCTCTAAGTTCATGCTTGTCTGAGGCGCTTATCACAGTCTTGATGGTTTTGTCTAGTTTATAACTAGCTGTAGAAACAAAATGATA
GGATTCCTCTTGTCTGTAGATGGTGGATAGGAGAGCTAGTGTGTTTGAATAAATCCCTCTCCCTAGATTGAACCTTGAATAGAAAAG
AAGCTTTTCCCTAGTAAAGCATGTTTAAAGAGCTGTTTGTGCTGCTATCATATAGTTCATGCTTCCACCAATCTTTG
ACATTCATTAGAATTACTAAAAGCCTCTGTTTCAAAGCTGCTTTTACCTTTAACTAGGGATTTCCATCTCCATGATTAAGCCTGT
TCCAAATGTGCTGTTTAAACATTAATGCTATCGTCTGTTAGAGGGATGTTTTTAAACCTAAAATTTCTATATAAATTTGATCCATA
AACAGCATGCATCACTACTCCCGCCGGAGAGCCTTCAACAACAGGATCCATTTTTCAGTCTGAACCACCTGAAATTTGTAATTTATC
TCTTTTCTAGATTACAAAGGGTACAGAAATCCAATATTGGAATTAAGCATGCTGAAATTTAACATCTTTGATTAACAGATTACACA
TGTTTTAAATGAGCAATACGAATCTAAATCAAATTTTAGCATTCTAAGATTTTCTTTCCATGTTTTCTTCATAGGTCATCTTCCAC
AGTGGAAAGAAATGTCCACAAATGTTCTAGCTTTTGACCTTAATACCCTATCTAAAGCAAGTTTCTCTGTAGATTGGTTCGATAAATG
ATTCCTTTTGGGAAGGCTTGTGTACATAAACAGCTGACTAAGTAAAAAATCCCTATCAATCAAGTGTCTATCAGAATTTTCTCAGG
ATTTTTTATCATTATGTCATGGACAGACTCCATTTCTAAGCTAGACGCAATCTTCTCATATAACTCATCTTCTCCAAAACAGCATC
CTCGTCTATCTTCAAGTCTTGTGACTTTTATATAGATCTTCAATCTTTTTTAGATTAGGGTAAAGTTTTGAAAAATCCTTATAACT
TGACATCTTGTTTAAAGCATCTCATTTTATAAATTAGCAATTTTATAATCTGAGTTAAACATGGTTGAAATTTTCATCCCGATTGT
TAGAACGCTGGAATCTCGGACACTGATGCTTTCTCAAACAAAATTAATAAGAAATATCATTTTTTGTCTTTTCTCCAGATTTCC
TCTTTACACTTTTTCTTTAACTCTCTAAATCTCATCTGTAGATAACTAGAGAAGAGACACTATCTTTGACCTCTTCTAAACTTTTT
TTTGTCAA AAAATCTCTTATCACTGTAATAGATGATTTGATCATTGATGATGGACCTAAATAGACAACGGCTCTATAGGAGA
AGTTAAACAGCCCCCATGTTCTGTGGGAATCTCAITTTGATTTTAAACTTACCCAAGTTTTTAAAGATCCTAATGTATCATTTAC
TTCCACGGAAGCATTGAATAGATGCTTAATGCTTGTACTTGCACAGCCCCATAAGCAAAGGTATTACTTCATTGGGACAGCCCTT
CCTCAAAGCATTGTAACATGTATACCTGAGTGACATCAAATCAATCAAATAACTTATATGTGAAGATTCCGTGCAACAGTGTGCTAA
ATGCTCTGCAATAGAGAGGAATAATGCTCCATTTACAATCTTTCAGATATAAACTTACCTCTGATGAAGAAGCAATACTTTTT
AGGGTTCAAAGTTATGCAAAGCTTTTGAATGAGCTTCAATGCTTCAAACAACATTTCTGGCAGAGATGGGCTTGA AAAATCTGT
TAGCATTTTATCGACTCTCCACTGGCTATCAATGATGTGCAATGTGCATCAGAGTGCACAATCCATCTAGTTTGA AAATCGCAGCT
TTGTAACATTTCTAGACTTGTGATAAGCTTTTCATCGCAAGAATGATAAACAGACGACAGATAATTTAATTTGCTTGCACAG
CGCCATGCTTAACCGGGTATGTGTTTTCGCTCAAACCTTTAGTCAAAGTCTTATGCGCATTTTCTTTGCTCAAAAGTCTTGTG
AGCTTTTTCTTAGGTTCAA AAAAATATCCGTTGGTATACAACCTTTTTCAATTTAACATACATTAGAATGCATTCTATCATCAGCT
AGCTTCCACGATGTTAAAATTGGATTTAATATGATAGCTAAAACATATTTATAGGTGAGGCTCGA
CGCCAGATAAAGAAAGCAATCTTGACTTCCCTTGAATTTTTGTTCAA AAAATATCATTGTAAGATGTGATTTGTGTC
AAAGTGTCTCTTATTTTATTTGTCTCACTTATAGATAGCTTCCGATGGATCACTCTGTGCATGTTGAATGTGTCTCTATA
AAGTAAAGCATCATTTTCACTTTCATGCTCATCAAGTATATTTCTCTGTCTGTTTGTAGTTCTCTGCATTTTTCAA AAAACAGAACT
AAAAAATCTACAGACCCCGGTGACATTTTTTACGCTTGGACATGACAAAATCAAAGCATCTGCAAGAATGTGTGTTTTCTCCCTCTGTGA
CCTTTACCAAGTTCCATAACAGATTTAGGTCATTTCCATCATGTTATGAACTGTTTTACAAGGTCAA AAAGCTCTCTGACACT
TTTTTAGACTTTAAAAGTGTACATTAATTTCTATAATATAGTTTTGTTTTGAGATATGTTTCCACTGTTAATGGATGTTATTTCTT
ATGAATTTGGATGTTACAGATTTCCCTACAGTTATGATCCACTATTAATATCTCTTTAAGCTTTTCTACAGATACAACGAATG
ACACAAATTTCTCAAAGAAATCCACTAGTCGATTTCTCTCCATTTGTAAGTTCTTATAAGCCCTTTTATAATAGCCAAATTTATC
CCTTTCCAGTTTTCTATATCCTGAATCTTTCGCTTCTGAAGCACTCTATATCTCATAGTACTATAAATGTTGATTTGTGAGCAC
TTTTTGAAGATTTAAGGTAGATATCTTGTAAACAGGGCTTAGAAAATCTCTTTATTTTCTATTTCTGACCTCATCAAACCAACA
TCTTTCTATATTTCCCTAGATAGTAAATCGGATAATGCTTTCAAGTTAAGAGCTCCATTTATAGAGAATAGGCTTTGTGCTCAAACAT
GGTTTTTAAAGGTATATGCTCTCAAATATGTTGAAACCTAACTCTCTTCTGAACCTTTAGCTCCCACTCAGCAGGACATTTAACAAA
CTTGTAGATTTGTGGACATGATTGTGCAATGATTTAGGCATCATATAAATAGCCAAAATAAACATATTTGTAACAAATCCTCAAGTGTG
AGTAGAGTCGATCCTGTTATTTGACATTTTTATATCAAGTTTGTATACTCTCTATAATATCGTTTTCTGTGCTACGACAACAGGC
TGGCATTTTGTGCTTAAATGAGATTTCCATCTGCAACAATAGTTTTTGATTTCCATTAACAAAATATATATCTGCCACATAGTT
ATATCAGGATCGAATTTATCTCTAATGTAATTTCTTTATATTTAGAAATAACAGACAGTGGTAAAAACCTGCATACCGCATGAAATCA
AAAATTTCCATCCCTGCTGAGCTTTGTGCACAGTTCCTATCATGACAGACGAGAACAATAATTTATTAATATCTGTTTAAACAGTCAAT
GTCAAGAAAAGACATTTCACTTTTTCTATATCTTTGTTTTCTGACCCATTTTTCCATTTGCTTAGCTTTTTTGA AAATTTGTGCAAAA
CATACAGGAACCTTTACTAGCGGTTTTGAAAAGGCTCAGCAGCCTCACTGGTTGAGTCTCTGCGCTCATTAATAAATGTAATA
CTACCACTTCGGAATAGCTATAAATTTCTTTAGTATAACATATGTTAAATGATCCGACATATCTTCATCCACTATGTGCAATGCT
ATGTAAGGAACTCCCGATCTCCCGGTTTCACTCCATCTCTTTGAAATGCCAGTAGCATCATGCTAGTATTTGTGTTAGTTAGTATC
TGAAAACCTTTCTTTAGTCTATATACCTGTCTGCCACATCAAACCTTTGGAGAATTGCATCATGCTTTCCAGGTAATGGTAAATGGCT
AGGTCATTGCATAAATTTGTTTATCTTTTTACAAGTCTCCAGTTCCAGCTTTCCAGTCTTGAATGTAACAGCATTCCAGGATTT
TTAGCATAAATATTTGAAACAGATGTGATCTTGCTTCTCTTTATATCACCATATGAAGAACAACAAGAATCCTTAATTTCTT
TCACACAGCTTAAAGCTGCTCCTCATTGCTATGCCAATAGTTTTTTCTATGAGTCAGAGAAGACATGTCTATACTGGAATAATCA
TCATTTGGGTCAAGCTGCTTTCTGAGGTATCATTTCCAGGCTTTAGAAAATCCTTTGTTTTATTTCTTTTGTAGAAATCTT
TTCTTAGAGCTCATTTCTATATTTCACTGCTAAACCTTTAAAATAGGTAGTCTTGTCTCTCTGCTGCTCTCTCATGCAAAAAT
TCATTTTTGTTCTCGTCAAACATGAAACCTGCTTACTCCATCTTTAGATTTCTTTGTTCTCTCAACTTTGATGCTCCAGGTTT
ATATCTATTTCACTCAAGTTCCGTTTTTCCATTTTTGTTGATGATCAACAATAGCTCTGTGTAACACAGCTCAACCAAGTTTGT
ATATCTCTGCTTTGTTGTTGTTGTTATTTATGCTACTATATGGGTTATTTGTA AAATAATCTTGAAGAACCTTTGGAAGCTTTCCCGA
AATTTGTTTATGATTTGCATTTATGTAATCTACTTCTGAGCTCAATTTCAATTTTTTCAA AAACCTTGGGACCAAGTCATGGA AAAGTTA
GTTTTAGTTTCAGAAAGATCGTTTGTAAAACAGTTGAGTACTTTTTCTCATATTTCTGTGGCATCTTGGTTAAAAGCTGTGATTTAG
TCAGGTATTTCTTTCTCTTTTTCTTTTTCTCTAATTTCAAGCATGATCTTCTCAAGGTGTTCCGGTAAAGATTTCCCATATTT
TGCTGTTTTTGGATTAAAGTGTCTTTCAAATCAGCTAGATCAGCTTTGGCTCTATTTTTAAATTAATGCAAGAGTTTTGGTACCCT
TTAAATTTGTGCAAAATATGCTGGTCAATCATCGTTTTCAATGTGGAACAGAAATTTCCAAAACAAAATGTAATTTCTCCCTA
GGGATTTCTCTGTAAACAAGTGAGTTAATTTCTTTCAATATCTTCAGAATAGGCTATTTCAAGTAGATTCTCTCTTTGATTTG
CTGGTCCAGTGACTAAAACACATCTTTGGATCCAAAATCATCACCTAAGATCCCTCTGACTTCAGATTTGATTTTCTGAGTGT
CGGTAATAGTTTCTCACCCTGTTGGGTGTTGCTTCTACGATTTGTGCCAACAATAAGAAATTTAGCAGTTTGGCATTCTGATCATG
TTAATCTTTCTCCATGCAAGTCTGATGAGAGTCTTCAAATTTTCCAAAACCTGCTGTAGTAGAACAGTGTGATTTGGCATCCAGCA
ATAGGTTTCAATATAACAATAGAAAACGAAAACAGGGTGTCTTCTAGGAATGGCTTTCCATTTCACTTTTATATTTTGAAGATTTT
CAGATATTTTGTAGTATTTTCCATGTTTTGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTG
TCACGTTTTTTGATCTTTATATATTACATAGTTATCAGGGTGGGCTTAGTTGCTACATATCTTTGTTTTATTTCTCAAACTCA
TCATCAGAGAGCTTGTAAACAGAGACTTTTTGTTGAGCTCACAGATATTTCCCTGAGTGATGCTCTATCTCACTCCCTCTCTT
TGTTTGGGTTTTATTTCTCAGGTGCTGGAGATCAGCTCTCCGAAAATATCATGCTTTGCTAATCTGTTTCTAGGATTTTTGCTCA
AACAGAGAGACCATCTCACCTAGCTTTTGCATCCACAGTTGCCATCCCTTTGTTTGGCTTCCCTCAGGCTGATTTTTGACG
ATTAATCTCTCATGCTCATAGTTTTTGCATTAATTAATAATCACATCTTCTGGAATCTCATCACTATTTCTCTATGATAA
TCCAAAGCCAGATCATGTTTGAACCTACACAATCTCAATAGATAACAATAAAGTGGTTCCATTTCTATAAATTTCTGATTTTT
TGGATGTTTCATGTTTGCCTTAAAATCGTTGTTACTGATTGCTCT - 8.9kb

Apéndice N. Resultados de la detección del virus TSWV en crisantemos utilizando dos métodos de extracción diferentes.

Figura 14. Detección del genoma viral en productos extraídos utilizando método Lee (2003). MM= marcador molecular 1kb Promega®; controles negativos de PCR, RT y extracción; control interno positivo para la detección del segmento 5S ribosomal de planta aplicado a la muestra 10 y 20 (23 y 24 respectivamente); muestras 1-20. Se detectó la presencia del genoma viral en tres muestras (6, 10 y 20)

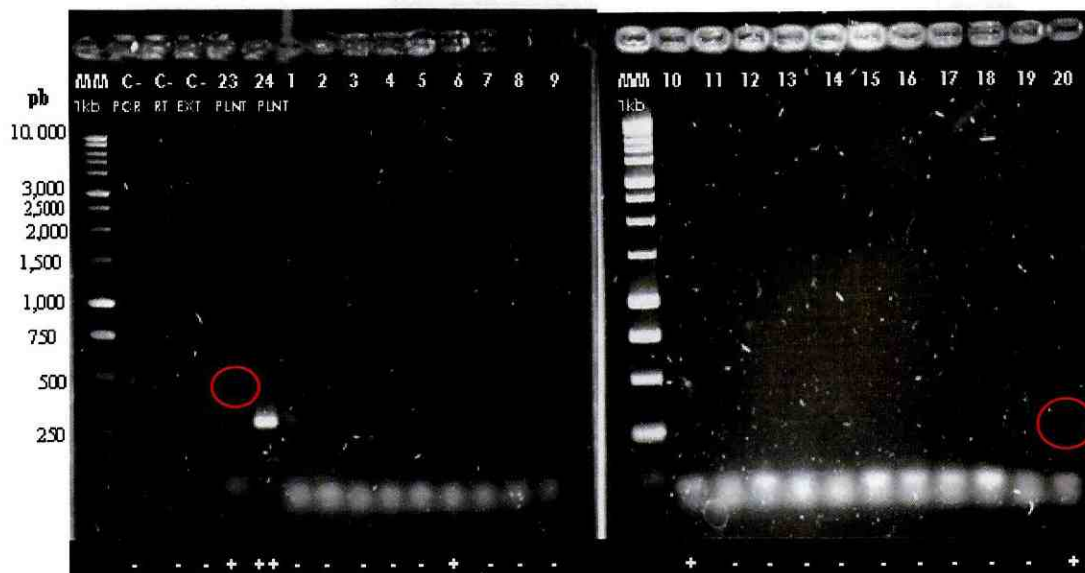


Figura 15. Detección del genoma viral en productos extraídos utilizando método Locali *et al.* (2003). MM= marcador molecular 1kb Promega®; controles negativos de PCR, RT y extracción; control interno positivo para la detección del segmento 5S ribosomal de planta aplicado a la muestra 10 (23); Muestras 1-20. Se detectó la presencia del genoma viral en trece muestras (3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18).

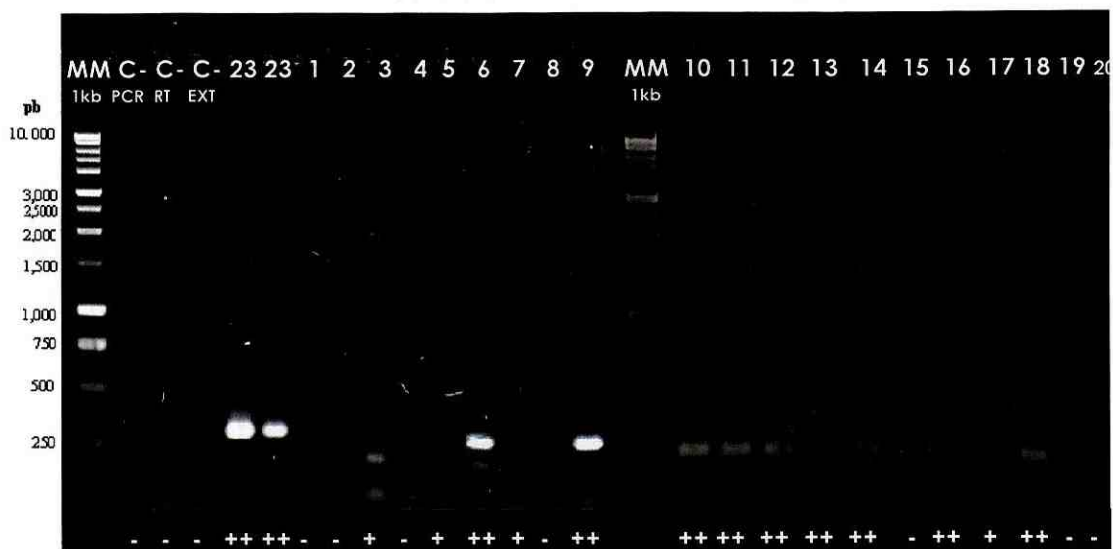
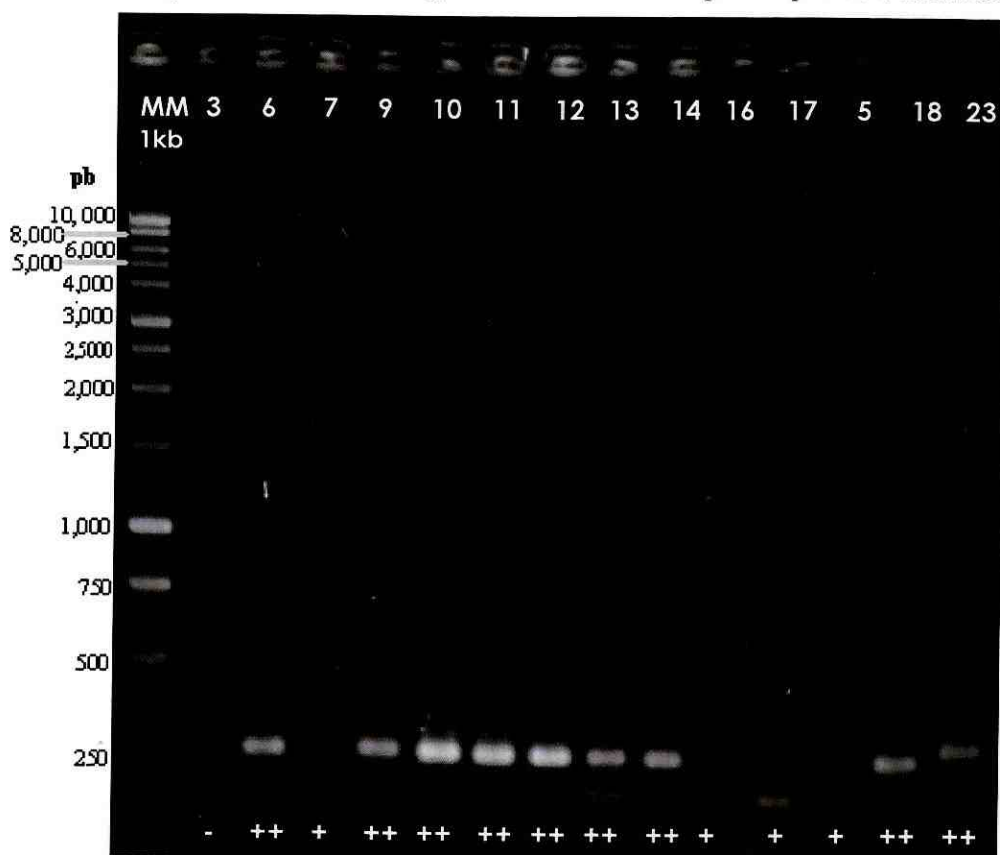


Figura 16. Productos positivos extraídos según método Locali *et al.* (2003). MM= marcador molecular 1kb Promega©; productos ya detectados como positivos correspondientes a las muestras 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18; control interno positivo para la detección del segmento 5S ribosomal de planta aplicado a la muestra 10



Apéndice O. Secuenciación del fragmento amplificado utilizando la técnica RT-PCR.

Iniciador «reverse» L1 TSWV R

Similitud con la secuencia: >gb|AY070218.1| del gen L de la polimerasa de ARN dependiente de ARN del virus *Tomato spotted wilt virus*.

Porcentaje de similitud: 96 %

Porcentaje de cobertura: 76 %

Tamaño: 8640 pb.

```

Query 47  TTAGTCAAAAAGTCCATATGGCAGTCTCGTTTTGCCAAAAGTTCTTGAGCTTTCCTTAGA 106
          |||
Sbjct 4313 TTACTCAAAAAGTCCATATGGCAGTCTCGTTTTGCCAAAAGTTCTTGAGCTTTCCTTAGA 4260
Query 117  TTCAAAAAATATCTGGTGGTATACAAAACNCITCTTCAATTAAACATACATTAATAATGC 166
          |||
Sbjct 4259  TTCAAAAAATATCCG-TTGGTATGCAAACT-TTCTTCAATTAAACATACATTAATAATGC 4202
Query 157  ATTCTATCATTAAACTACC TTCACCACACTACTTAAAAATCCATTTAATATCATACCTAATA 226
          |||
Sbjct 4201  ATTCTATCATTAAACTAGCTTCCACCACACTACTTAAAAATCCGCTTTAATATGATAGCTAATA 4142
Query 227  CATATTTATAGCTAAGATCTGATGCCGACCATTTCCACTGAT 268
          |||
Sbjct 4141  CATATTTATAGCTAAGATCTGATGCCGACCATTTCCACTGAT 4100

```

Similitud con la secuencia: >dbj|AB190813.1| Secuencia completa del segmento L del ARN del virus *Tomato spotted wilt virus*.

Porcentaje de similitud: 93 %
 Porcentaje de cobertura: 76 %
 Tamaño: 8917 pb.

```

Query 47  TTAGTCAAAAGTCCATGGCAGTCTCGTTTTGCCCAAAGTTCCTTGAGCTTTCCTTAGA 106
          |||
Sbjct 355  TTAGTCAAAAGTCCATGGCAGTTCATTTGCCCAAAGTTCCTTGAGCTTTCCTTAGG 4296
Query 07  TTCAAAAAATATCTGGTTGCTATACAAACNCTTCTTCAATTAAACAACATAAAAATGC 166
          |||
Sbjct 295  TTCAAAAAATATCTG-TTGGTATACAAAC-CTTTTCAATTAAACAACATAGAAATGC 4238
Query 67  ATTCTATCATTAAACTAGCTTCACCAGTAGTTAAAAATGGATTTAATATGATAGCTAAAA 226
          |||
Sbjct 237  ATTCTATCATCAAGCTAGCTTCACCAGTAGTTAAAAATGGATTTAATATGATAGCTAAAA 4178
Query 227  CATATTTATA---GGTAAGATCTGATGCCGACCATTTGACTGAT 268
          |||
Sbjct 4177  CATATTTATAGGTGCTAAGGCTGATGCCGACCATTTGACTGAT 4133
  
```

Similitud con la secuencia: >dbj|D10066.1|TSWLRPOLM Secuencia del segmento L de ARN del virus *Tomato spotted wilt virus* que codifica para la polimerasa de ARN.

Porcentaje de similitud: 93 %
 Porcentaje de cobertura: 75 %
 Tamaño: 8897 pb.

```

Query 50  GTCAAAAGTCCATGGCAGTCTCGTTTTGCCCAAAGTTCCTTGAGCTTTCCTTAGATTC 109
          |||
Sbjct 4340  GTCAAAAGTCCATGGCAGTTTCATTTGCCCAAAGTTGTTGAGCTTTCCTTAGATTC 4281
Query 110  AAAAAAATATCTGGTTGCTATACAAACNCTTCTTCAATTAAACAACATAAAAATGCATT 169
          |||
Sbjct 4280  AAAAAAATATCTG-TTGGTATACAAAC-CTTTTCAATTAAACAACATTAAGATGCATT 4223
Query 170  CTATCATTAAACTAGCTTCACCAGTAGTTAAAAATGGATTTAATATGATAGCTAAAAACAT 229
          |||
Sbjct 4222  CTATCATTAACTAGCTTCACCAGTAGTTAAAAATGGATTTAATATGATAGCTAAAAACAT 4163

Query 230  ATTTATA---GGTAAGATCTGATGCCGACCATTTGACTGAT 268
          |||
Sbjct 4162  ATTTATAGGTGCTAAGGCTGATGCCGACCATTTGACTGAT 4121
  
```

Similitud con la secuencia: >dbj|AB198742.1| Gen para la proteína L del virus *Tomato spotted wilt virus*

Porcentaje de similitud: 92 %
 Porcentaje de cobertura: 76 %
 Tamaño: 8913 pb.

```

Query 47  TTAGTCAAAAGTCCATGGCAGTCTCGTTTTGCCCAAAGTTCCTTGAGCTTTCCTTAGA 106
          |||
Sbjct 4562  TTAGTCAAAAGTCCATGGCAGTTTCATTTGCCCAAAGTTCCTTGAGCTTTCCTTAGC 4621
Query 107  TTCAAAAAATATCTGGTTGCTATACAAACNCTTCTTCAATTAAACAACATAAAAATGC 166
          |||
Sbjct 4622  TTCAAAAAATATCCG-TTGGTATACAAAC-CTTTTCAATTAAACAACATAGAAATGC 4679
Query 167  ATTCTATCATTAAACTAGCTTCACCAGTAGTTAAAAATGGATTTAATATGATAGCTAAAA 226
          |||
Sbjct 4680  ATTCTATCATCAAGCTAGCTTCACCAGTAGTTAAAAATGGATTTAATATGATAGCTAAAA 4739
Query 227  CATATTTATAGGTAAAGATCTGATGCCGACCATTTGACTGAT 268
          |||
Sbjct 4740  CATATTTATAGGTGAGGCTGATGCCGACCATTTGACTGAT 4781
  
```


Similitud con la secuencia: >dbj|AB198742.1| Gen para la proteína L del virus
Tomato spotted wilt virus

Porcentaje de similitud: 93 %
Porcentaje de cobertura: 75 %
Tamaño: 8913 pb.

```

Query 48  TAAATCCAATTT-AACTACAGGTGAAGCTACTTTAATGATAGAAATGCATTTTAAATGTATG 106
          |||
Sbjct 4724 TAAATCCAATTTTAACTACTGGTGAAGCTAGCTTGATGATAGAAATGCATTTCTAAATGTATG 4665
Query 107  TTAATTTGAGGAGGTTTGTATACCAACAGATATTTTTTGAATCTAAGGAAAGCTCAAG 166
          |||
Sbjct 4664  TTAATTTGAAAAAGGTTTGTATACCAACAGATATTTTTTGAACCTAAGAAAAGCTCAAG 4605
Query 167  GAACTTTTGGCCAAAACGAGACTGCCATAGGACTTTTGACTAAAAGGCTTGACGACAAAACA 226
          |||
Sbjct 4604  GAACTTTTGGCCAAAATGAAAC TGCCATAGGACTTTTGACTAAAAGCTTTGACGACAAAACA 4545
Query 227  CATACCCGTGTAGCATGAATTGGTTGCAAGGCAATT 262
          |||
Sbjct 4544  CATACCCGGTTAGCATGAATGGTTGCAAGGCAATT 4509

```

Apéndice P. Resultados de la detección del virus TSWV en crisantemos utilizando la técnica ELISA.

Figura 17. Resultados para la prueba de ELISA. Se muestran los valores de absorbancias para las muestras (n=36), blanco, control negativo y control positivo. En gris se presentan las muestras positivas (n=7).

M1	0.074 0.076	M10	0.126 0.109	M19	0.074 0.090	M28	0.296 0.164	Blanco	0.018 0.009
M2	0.121 0.077	M11	0.101 0.118	M20	0.107 0.102	M29	0.000 0.000	Control negativo	0.016 0.035
M3	0.066 0.075	M12	0.129 0.120	M21	0.000 0.000	M30	0.000 0.000	Control positivo	0.170 0.123
M4	0.075 0.074	M13	0.149 0.144	M22	0.259 0.550	M31	0.021 0.000		
M5	0.121 0.109	M14	0.076 0.076	M23	0.000 0.000	M32	0.000 0.000		
M6	0.188 0.167	M15	0.064 0.076	M24	0.000 0.000	M33	0.018 0.000		
M7	0.063 0.073	M16	0.075 0.075	M25	0.001 0.016	M34	0.000 0.000		
M8	0.076 0.074	M17	0.165 0.150	M26	0.000 0.000	M35	0.000 0.000		
M9	0.172 0.158	M18	0.103 0.089	M27	0.000 0.000	M36	0.000 0.000		

Apéndice Q. Secuencia de trabajo recomendado por el Boletín EPPO, 2004.

