

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estandarización y optimización de la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) para la detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) en los insectos vectores Thrips de la familia Thripidae (Thysanoptera).

Hector Thomas Peña Smith

Guatemala
2009

Estandarización y optimización de la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) para la detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) en los insectos vectores Thrips de la familia Thripidae (Thysanoptera).

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estandarización y optimización de la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) para la detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) en los insectos vectores Thrips de la familia Thripidae (Thysanoptera).

Trabajo de graduación presentado por:
Héctor Thomas Peña Smith

para optar al grado académico de
Licenciatura en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2009

Vo.Bo.:

(f)



Licenciada Margarita Palmieri

Tribunal Examinador:

(f)


Licenciada Margarita Palmieri

(f)


Pamela Marie Pennington Ph.D

(f)


Licenciado Elena Dardón

Fecha de aprobación del examen: Guatemala, 08 de junio 2009

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes.....	2
1. El bronceado del tomate.....	2
2. Agente causal.....	2
a. Información general.....	2
b. Descripción molecular del virus.....	3
3. Hospederos.....	4
4. Vector.....	4
a. Especies vectores.....	5
b. Interacción de TSWV con el vector trips.....	5
c. Capacidad vectorial.....	6
5. Síntomas.....	7
6. Técnicas de control.....	8
a. Selección de cultivo y resistencia en campo.....	8
b. Manejo de cultivo.....	9
c. Control de vectores.....	9
7. Técnicas de diagnóstico.....	10
a. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	10
b. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR).....	10
B. Justificación.....	12
C. Objetivos.....	14
1. Objetivo general.....	14
2. Objetivos específicos.....	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
A. Métodos.....	15
1. Obtención de las muestras.....	15
2. Obtención de trips infectados.....	15
3. Diagrama de flujo del procedimiento de estandarización de la detección de TSWV.....	16
4. Extracción de ARN.....	16
a. Extracción de Frohlich <i>et al.</i> 1999.....	16
b. Extracción de Boonham <i>et al.</i> 2001.....	17
5. Determinación de la concentración de ARN extraído por cada método.....	17
6. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR).....	18
a. RT-PCR en un paso con kit ReadyToGo RT-PCR Beads.....	18
b. Transcripción reversa (RT) con el kit Access RT-PCR Systems.....	18
c. PCR.....	19
7. Electroforesis en gel de agarosa.....	20
8. Secuenciación de los productos de PCR.....	20
a. Purificación de productos de PCR.....	20
b. Secuenciación de productos de PCR.....	20
c. Análisis de los resultados de la secuenciación de los productos de PCR.....	20
B. Diseño experimental.....	21
1. Variables.....	21
2. Unidad experimental.....	21
3. Tipo de investigación y estudio.....	21
4. Selección de muestra.....	21
5. Análisis estadístico.....	21

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
A. Estandarización y optimización del método de detección por RT-PCR de TSWV.....	22
1. Comparación de métodos de extracción de ARN.....	22
2. Estandarización y optimización del RT-PCR.....	26
B. Comparación de las secuencias obtenidas correspondientes a TSWV con GenBank.....	37
IV. CONCLUSIONES.....	39
V. RECOMENDACIONES.....	40
VI. LITERATURA CITADA.....	41
VII. APÉNDICES.....	45
Apéndice A. Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído.....	45
Apéndice B. Comparación de secuencias por BLAST.....	46
Apéndice C. Alineación de secuencia obtenida con el gen 18S de <i>Frankliniella</i> sp.	46
Apéndice D. Análisis de complementariedad de los iniciadores L1 y L2 con gen 18S.....	47
Apéndice E. Electroforesis de prueba de detección de TSWV con Ready To Go RT-PCR Beads.....	48
Apéndice F. Electroforesis de prueba con kit Access RT-PCR Systems.....	48
Apéndice G. Alineación de secuencias del fragmento de ARN S de TSWV.....	49
Apéndice H. Árbol filogenético construido con secuencias del fragmento de ARN S de TSWV reportadas en GenBank y la secuencia encontrada en Guatemala.....	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro #		Pág.
1	Tampón de lisis utilizado para la extracción de ARN (Frohlinch <i>et al.</i> 1999).	17
2	Programa para la RT-PCR.	18
3	Programa de la fase de RT.	19
4	Programa de la fase de PCR.	19
5	Secuencia de los iniciadores de PCR.	20
6	Concentración y pureza del ARN extraído a partir de trips individuales comparando cada uno de los métodos de extracción utilizado.	23
7	Desviación estándar de los resultados de concentración y pureza del ARN extraído por cada uno de los métodos de extracción utilizados, tomando en cuenta las repeticiones por cada muestra analizada.	24
8	Media y desviación estándar de los resultados de concentración y pureza del ARN extraído por cada uno de los métodos de extracción utilizados, tomando en cuenta los valores promedios de cada muestra analizada.	25
9	Secuencia del producto de RT-PCR amplificado con los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004).	28
10	Secuencia del gen 18S ribosomal de <i>Frankliniella</i> sp. y el análisis de posibles anillamientos inespecíficos de los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004)	29

LISTA DE FIGURAS

Figura #		Pág.
1	Organización genómica de TSWV.	4
2	Los trips son insectos diminutos del orden <i>Thysanoptera</i> : Thripidae.	5
3	Síntomas causados por infección por TSWV en crisantemos.	8
4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Nelson & Cox, 2005).	12
5	Jaula con planta infectada con TSWV.	15
6	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR en un solo paso con iniciadores L1TSWV y L2TSWV (antisentido y sentido respectivamente).	27
7	Pruebas de RT-PCR para descartar fuentes de contaminación de ARN.	27
8	Prueba de PCR para descartar al ADN como fuente de contaminación, sin fase de RT.	28
9	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en un solo paso con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente).	31
10	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en un solo paso con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente) y 18S920c y 18S417 (antisentido y sentido respectivamente).	32
11	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente).	33
12	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente).	34
13	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente).	35
14	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente).	36
15	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente).	37
16	Árbol filogenético de las comparaciones de secuencias de cepas de TSWV.	38

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. Al virus lo transmiten en la naturaleza los insectos diminutos pertenecientes a la familia Thripidae (Thysanoptera) comúnmente llamados trips.

Actualmente se utilizan técnicas serológicas y moleculares para detectar el TSWV en tejido vegetal correspondiente a plantaciones con posibilidad de estar infectadas, sin embargo, en muchas ocasiones es más efectiva la detección del virus en el insecto vector que se encuentra dentro de las plantaciones, ya que puede revelar información previo al desarrollo e infección generalizada del cultivo.

Con el objetivo de implementar un método de diagnóstico de TSWV en el insecto vector, se realizó la estandarización de la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés). Durante la estandarización se determinó que el par de iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPP (2004) para el diagnóstico de TSWV no eran recomendables para su utilización en la detección de TSWV en el insecto vector, ya que presentó una reacción de amplificación inespecífica de un fragmento del gen constitutivo 18S ribosomal de *Frankliniella* sp. Debido a este resultado, se estandarizó la prueba de RT-PCR con otro par de iniciadores ya reportados previamente por Naidu *et al.* (2004) para la detección de TSWV en trips.

El proceso de estandarización consistió en determinar el método de extracción más eficiente, el kit de reactivos a utilizar para la RT-PCR, concentraciones adecuadas de reactivos, establecimiento de temperatura óptima de anillamiento, así como la optimización del tiempo requerido para la detección de TSWV. Se concluyó que era mejor utilizar el método de extracción propuesto por Frohlich *et al.* (1999), y utilizar el .kit de Access RT-PCR Systems (Promega 2009) para la detección de TSWV, realizando la reacción en dos pasos.

ABSTRACT

Since its appearance in 1915, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) has caused terrible losses to several plantations, among them lettuce, tomato and several ornamental flowers, plus a great number of host plants that this virus has. The virus is transmitted in nature by diminutive insects belonging to the family Thripidae (Thysanoptera) commonly called thrips.

At the present time serological and molecular techniques are being used to diagnose TSWV in plant tissue from plants that may or may not be infected with the virus, however on many occasions it's better to detect the virus in the vector insect in the surroundings of the plantation because it can give information prior to the development and infection with the virus.

With the objective to implement a diagnostic method for TSWV in the thrips, a Reverse transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR) was standardized. During the standardization it was determined that the set of primers L1 and L2 proposed by OEPP/EPPA (2004) for the detection of TSWV are not recommended for its use in the diagnosis of TSWV in thrips, since it gives an unspecific amplification product corresponding to the house keeping gene 18S from *Frankliniella* sp. Because of this result, a set of primers proposed by Naidu *et al.* (2004) was used to standardize the RT-PCR for the detection of TSWV in thrips.

The process of standardization consisted of determining the best RNA isolation method, the best RT-PCR kit to use, proper reactive concentrations, optimal annealing temperature, as well as the optimization of the time required for the detection of TSWV. I conclude that the best RNA isolation method was that described by Frohlich *et al.* (1999) and that it was better to use the Access RT-PCR Systems kit (Promega 2009) using a two step reaction for the detection of TSWV in thrips.

I. INTRODUCCIÓN

Los tospovirus son los únicos miembros de la familia Bunyaviridae que son capaces de infectar plantas (Ullman, Whitfield y German 2005). Existe una gran variedad de tospovirus entre los cuales se pueden mencionar el virus de la mancha necrótica de *Impatiens* (*Impatiens necrotic spot virus*, *INSV* por sus siglas en inglés), el virus del moteado plateado de la sandía (*Watermelon silver mottle virus*, *WSMoV* por sus siglas en inglés) y el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, *TSWV* por sus siglas en inglés), siendo este último uno de los más importantes económicamente y con mayor distribución mundial (OEPP/EPPO 2004).

A pesar de ser posible transmitir los tospovirus mecánicamente, la supervivencia de los mismos en la naturaleza depende de la transmisión a las plantas por medio de insectos de la familia *Thripidae* (Thysanoptera) comúnmente llamados trips (Whitfield, Ullman y German 2005). Las especies de trips son importantes plagas encontradas en cultivos agrícolas y en hortalizas. Los tospovirus son transmitidos en una forma propagativa y persistente (Nagata *et al.* 2002). Existen varias especies de trips que pueden ser vectores de TSWV, incluidos *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *T. palmi*, *Frankliniella occidentalis*, *F. fusca*, *F. intonsa*, *F. schultzei*, entre otros. De las especies mencionadas anteriormente, *F. occidentalis* ha sido reportado como el vector más importante de TSWV (OEPP/EPPO 2004). Los brotes epidémicos más recientes de TSWV en los cultivos se encuentran fuertemente asociados al establecimiento y rápida infestación del vector *F. occidentalis* (EPPO/CABI 1997).

TSWV es la especie más prevalente y colectivamente más destructiva a nivel mundial de los miembros del género *Tospovirus* (Culbreath, Todd y Brown 2003). TSWV cuenta con un amplio rango de hospederos, ya que infecta cultivos de horticultura, agricultura y plantas silvestres (Stumpf y Kennedy 2007). Su rango de hospederos excede las 500 especies de plantas botánicas (Matsuura *et al.* 2004), con distribución en regiones del mundo templados, subtropicales y tropicales (Adkins 2000).

TSWV posee una amplia gama de plantas hospedero, lo que le ha permitido distribuirse mundialmente en conjunto con su vector. TSWV es un virus que ocasiona pérdidas económicas importantes en muchos cultivos alimentarios y ornamentales a nivel mundial (EPPO/CABI 1997). Los principales cultivos que son susceptibles a TSWV son tomate, pimiento, lechuga, patata, papaya, maní, tabaco y crisantemos (Adkins 2000). Varios estudios han demostrado que existen diferencias en la capacidad vectorial de las diversas especies de trips, por ejemplo algunas especies de trips son más eficientes para transmitir TSWV, mientras que otras no son capaces de transmitirlo (Chatzivassiliou *et al.* 1999; Nagata *et al.* 2002). Se ha tratado de explicar este fenómeno estudiando la capacidad vectorial de distintas especies y poblaciones de trips, y se ha sugerido que existe una co-evolución de tospovirus y trips. En el transcurso de la evolución, algunas

especies pierden la habilidad de transmitir el virus, mientras que otras se vuelven vectores más eficientes (Whitfield, Ullman y German 2005).

Es importante conocer qué especies de trips son los vectores del virus del bronceado del tomate, para poder tomar medidas de control tanto biológicas, como ecológicas y químicas para evitar o minimizar los daños a cultivos y plantaciones. Se utilizan distintas técnicas para diagnosticar TSWV. Entre estas técnicas se puede mencionar técnicas serológicas como DAS-ELISA y técnicas para detección de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR). Las técnicas moleculares presentan las ventajas de mayor sensibilidad y especificidad, además que generalmente son técnicas más sencillas de aplicar y más rápidas, siempre que el que las hace haya tenido cierta capacitación previa.

El objetivo de este trabajo es estandarizar y optimizar la detección de TSWV en insectos individuales trips de la familia Thripidae (Thysanoptera) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) bajo las condiciones con las que se cuenta en laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala.

A. Antecedentes

1. El bronceado del tomate. El bronceado del tomate es una enfermedad viral sistémica, causada por un *Tospovirus* que es capaz de afectar a una gran variedad de plantas. La enfermedad es transmitida por varias especies de trips (orden Thysanoptera). En la naturaleza únicamente los trips son capaces de transmitir la enfermedad, sin embargo se han reportado inoculaciones mecánicas en laboratorio (Adkins 2000; Whitfield, Ullman y German 2005; Granval y Gracia 1999) y por injertos.

La enfermedad del bronceado del tomate fue descrita por primera vez en 1915 en Australia (Adkins 2000). Aproximadamente cincuenta años después se determinó que el agente causal era un virus perteneciente al grupo de los tospovirus, al cual se le denominó virus del bronceado del tomate (TSWV, por sus siglas en inglés). El virus presenta gran variedad de hospederos, afectando principalmente a cultivos como el tomate, chile pimiento y algunas ornamentales como el crisantemo. Entre los síntomas principales de la enfermedad del bronceado del tomate se pueden mencionar lesiones necróticas, clorosis, mosaicos, decoloración de tallos, daño a los frutos, enanismo y hasta muerte (OEPP/EPPO 2004).

2. Agente causal

a. Información general. En 1930 se reportó que la enfermedad del bronceado del tomate era causada por un virus, al cual se le nombró Virus del Bronceado del Tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV por sus siglas en inglés) (Culbreath, Todd y Brown 2003). Aproximadamente 50 años después se

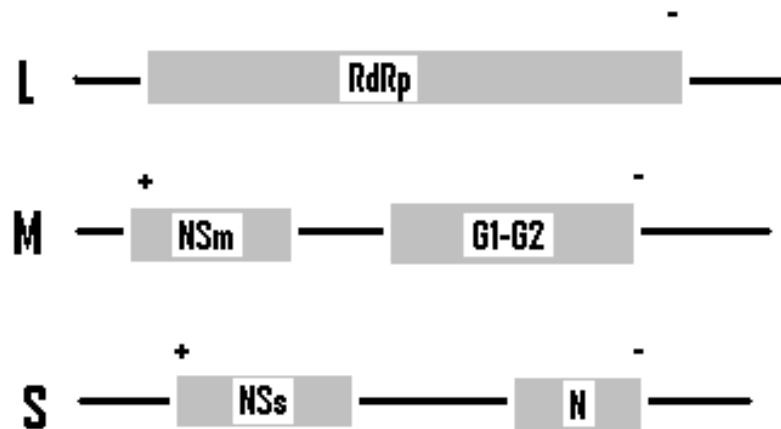
determinó que el virus pertenecía a la familia de virus Bunyaviridae, los cuales se caracterizan por ser un grupo transmitido principalmente por artrópodos, causantes de enfermedades en animales y compuestos por genomas de ARN tripartito con hebras negativas, sugiriendo que se trataba del primer virus de esta familia que infectaba a plantas (Whitfield, Ullman y German 2005). En la década de 1990, se identificó y caracterizó una gran variedad de virus similares, lo que llevó a la creación del género *Tospovirus*, siendo TSWV el tipo representativo del género (Adkins 2000).

TSWV es la especie más prevalente y colectivamente más destructiva a nivel mundial de los miembros del género *Tospovirus* (Culbreath, Todd y Brown 2003). TSWV cuenta con un amplio rango de hospederos, ya que infecta cultivos de horticultura, agricultura y plantas silvestres (Stumpf y Kennedy 2007). Su rango de hospederos excede las 500 especies de plantas botánicas (Matsuura *et al.* 2004), con distribución en regiones del mundo templadas, subtropicales y tropicales (Adkins 2000). TSWV es transmitido por varias especies de trips, orden Thysanoptera (Adkins 2000), hasta el momento únicamente ocho especies de trips, de los géneros *Thrips*, *Frankliniella* y *Schirtothrips* han sido reportados como vectores (Nagata *et al.* 2002).

b. Descripción molecular del virus. El genoma de TSWV consta de tres partículas de ARNsh, uno de polaridad negativa y dos bipolares. Los fragmentos están designados por su tamaño pequeño (2.9 kb), mediano (4.8 kb) y grande (8.9 kb) (S, M y L, por sus siglas en inglés) (ver Figura 1). La región de ARN S codifica una proteína no estructural (NSs) de aproximadamente 52.4 kDa y una proteína de nucleocápside (N). La proteína NSs está involucrada en la supresión del mecanismo de silenciamiento de ARN, mientras que la proteína N está involucrada en el ciclo de replicación del virus, en una forma tanto estructural como regulatoria (Whitfield, Ullman y German 2005).

La región de ARN M codifica una proteína no estructural (NSm) la cual se cree que es la proteína de movimiento del virus y un precursor de las glicoproteínas G1 y G2 (Granval y Gracia 1999; Whitfield, Ullman y German 2005). La región de ARN L codifica la proteína L de aproximadamente 331 kDa (Adkins 2000). La proteína L contiene clusters de motivos de polimerasa, así como otros elementos presentes en la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp, por sus siglas en inglés) (Granval y Gracia 1999; Whitfield, Ullman y German 2005).

Figura 1: Organización genómica de TSWV. El TSWV es un virus tripartito de ARNsh. Los segmentos que conforman el virus (L, M y S) codifican para diferentes proteínas del virus. ARN L codifica una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) en sentido negativo. ARN M codifica la proteína NSm en sentido positivo y los precursores de las glicoproteínas G1-G2 en sentido negativo. ARN S codifica la proteína NSs en sentido positivo y una proteína de nucleocápside N en sentido negativo (Tsompana *et al.* 2005).



3. Hospederos. TSWV cuenta con un gran rango de hospederos, los cuales consisten de más de 1090 especies de plantas, las cuales pertenecen a aproximadamente 84 distintas familias, abarcando familias de monocotiledóneas, dicotiledóneas y una de pteridofitas (Parrella *et al.* 2003). Se considera que TSWV es uno de los virus de plantas con mayor número de hospederos (Llamas *et al.*, 1998). La gran mayoría de las plantas hospederas de TSWV pertenecen a las tres familias *Asteraceae*, *Solanaceae* y *Fabaceae*, llegando a sumar hasta 479 especies de plantas hospederas (Parrella *et al.* 2003).

Los hospederos de TSWV abarcan tanto especies cultivadas como plantas silvestres. Entre las plantas de importancia agrícola se pueden mencionar el chícharo, cacahuate, chile, papa, tabaco, tomate, apio. Además también cuenta con hospederos entre las plantas ornamentales como crisantemo, dalia, gerbera e iris (De la Torre *et al.*, 20002).

Algunos estudios han reportado que las especies de malezas *Taraxacum officinale*, *Bidens* sp., *Mirabilis jalapa* y *Reseda luteola* presentan infección latente (asintomática) de TSWV. Cabe mencionar que existe una gran variedad de malezas que podrían ser hospederas de TSWV, sin embargo, éstas no han sido estudiadas (Ochoa *et al.* 1999).

4. **Vector.** TSWV es transmitido en la naturaleza únicamente por especies de trips (Thysanoptera: Thripidae) (Naidu, Sherwood y Deom 2008). Los trips son insectos diminutos de aproximadamente 1mm de largo (ver Figura 2) que se encuentran en una gran variedad de hábitats en todo el mundo (Adkins 2000). La transmisión se lleva a cabo de una manera circulativa y propagativa, es decir, la larva del insecto adquiere el virus al alimentarse de las plantas enfermas, pero no es capaz de transmitir el virus sino hasta que éste haya recorrido su sistema circulativo y se haya incorporado en las glándulas salivares del mismo (circulativa) y propagativa, porque el virus se reproduce en los tejidos del insecto dándole la capacidad de transmitirlo por el resto de su vida en su etapa adulta. Los trips adultos son capaces de transmitir la enfermedad, sólo cuando éstos adquirieron al virus en su fase larvaria (Naidu, Sherwood y Deom 2008).

a. **Especies vectores.** Se ha reportado que únicamente ocho de más de 5000 especies de trips son vectores de tospovirus (Nagata *et al.* 2004). TSWV puede ser transmitido por las especies *Trips tabaci*, *T. palmi*, *T. setosus*, *Frankliniella occidentalis*, *F. fusca*, *F. intonsa*, *F. schultzei* y *Scirtotrips* (EPPO/CABI 1997). La especie más eficiente para transmitir TSWV es *Frankliniella occidentalis* (Matsuura *et al.* 2004), además *F. occidentalis* es una de las especies con mayor distribución mundial, lo que la ha convertido en la especie más peligrosa (Ávila *et al.* 2006). El trips de la cebolla (*Trips tabaci*) y el *Trips palmi* son especies que se han distribuido ampliamente causando serias pérdidas económicas (Salas 2003).

Figura 2: Los trips son insectos diminutos del orden Thysanoptera: Thripidae. Son los vectores en la naturaleza del virus del bronceado del tomate (TSWV). Izquierda: *Frankliniella occidentalis* vista al microscopio con una magnificación de 100X. Derecha: *Trips tabaci* vista al microscopio con una magnificación de 100X. (Peña 2008)



b. **Interacción de TSWV con el vector trips.** El insecto trips ingiere las partículas virales al alimentarse de una planta infectada; los viriones deben llegar a su sitio de unión primario en el intestino

medio para luego ingresar a las células del insecto. En el intestino medio se encuentra la primera barrera que debe pasar el virus, ya que en esta área se encuentra un conjunto de microvellosidades. Las partículas virales se mueven a través de las microvellosidades, hasta llegar a la superficie basal de las células epiteliales del intestino medio, en este punto el virus encuentra su segunda barrera, ya que el tejido epitelial de las células está cubierto por una membrana basal. El virus debe atravesar la membrana basal que soporta al tejido epitelial, la cual presenta otras dos barreras más, provocadas por series longitudinales y circulares de células musculares (Whitfield, Ullman y German 2005).

El TSWV posee glicoproteínas (G1 y G2) que interactúan con proteínas específicas del trips de aproximadamente 50 kDa. Estas proteínas se encuentran en altas concentraciones en la fase larvaria. Las glicoproteínas de TSWV juegan un papel importante en la adhesión viral por medio del reconocimiento de receptores celulares en el intestino medio del trips. En otros estudios se descubrió que existe una proteína de trips de 94 kDa, con la cual interactúa la G2. La proteína de 94 kDa, no se encuentra en el intestino medio, sin embargo se encuentra en otras partes del cuerpo del trips (Adkins 2000).

Para que el TSWV pueda llegar a las glándulas salivares, convirtiéndose en transmisor al trips, éste tiene que atravesar la membrana de la glándula salivar. Las microvellosidades de las células de la glándula salivar del insecto, representan la última barrera que el virus debe sobrepasar para poder ser transmitido por su vector (Filho *et al.* 2002).

c. Capacidad vectorial. Se cree que existe una co-evolución entre los tospovirus y sus vectores. La gran diversidad morfológica en las especies sugiere la existencia de una gran diversidad de poblaciones funcionales. *Trips palmi* es un ejemplo de esto, ya que es conocido por ser capaz de transmitir nuevos tospovirus emergentes (Ananthakrishnan y Annadurai 2007).

A medida que surgen mutaciones de las cepas de TSWV, se observa en la mayoría de casos una disminución en la transmisibilidad del virus por las especies de trips (Hoon Sin *et al.* 2005). *Trips tabaci* fue la primera especie en ser reconocida como vector de TSWV y fue considerada por mucho tiempo como uno de los vectores más importantes; sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado su capacidad vectorial, debido a que no es capaz de transmitir algunas cepas de TSWV (Chatzivassiliou *et al.* 1999). Existen varios factores que influyen en la eficiencia de la transmisión de TSWV, entre los cuales se pueden mencionar: las distintas poblaciones de trips, el sexo del trips, las distintas cepas de virus, la cantidad de virus en el cuerpo del trips y la especie de hospedero del cual el trips adquiere o transmite el virus (Chatzivassiliou *et al.* 1999; Nagata *et al.* 2002).

La acumulación del virus depende de la cantidad que invade y la tasa de replicación en los tejidos del insecto, además depende también de la capacidad del virus para atravesar las barreras que separan los

tejidos que debe atravesar para llegar hasta las glándulas salivares (Nagata *et al.* 2002). La capacidad vectorial de distintas especies de trips es variable, ya que a pesar de que *T. palmi* es considerado un vector eficiente de TSWV, algunos estudios experimentales han determinado que poblaciones de esta especie no son capaces de transmitir TSWV (Nagata *et al.* 2004; Chatzivassiliou *et al.* 1999).

Estudios comparativos han demostrado que el tejido epitelial del intestino medio es infectado en larvas de *F. occidentalis* transmisoras y en larvas de poblaciones de *T. tabaci* no transmisoras. La acumulación de partículas virales en el epitelio del intestino medio alcanza niveles más altos en larvas de *F. occidentalis*. La diferencia en la acumulación del virus en *T. tabaci* no competentes se puede explicar por una menor tasa de replicación y el movimiento del virus dentro del insecto, significando que tiene una menor tasa de ingreso a través de los tejidos del intestino medio hacia las células y por último hacia las glándulas salivares. En estudios de competencia vectorial, se encontró que las glándulas salivares de *T. tabaci* analizadas no eran infectadas con TSWV, lo cual sugiere que el virus tiene un movimiento muy limitado en el insecto, dificultándosele el paso desde el intestino medio hasta las glándulas salivares del insecto (Nagata *et al.* 2002).

Diversas especies de trips pueden transmitir las mismas cepas de tospovirus con diferentes niveles de eficiencia. La importancia epidemiológica de las especies de trips difiere en diferentes ecosistemas. Por ejemplo, mientras que en Grecia, *T. tabaci* es uno de los vectores de TSWV más importantes en cultivos de tabaco, *F. occidentalis* juega un papel importante en plantas ornamentales y cultivos de invernadero (De Borbón, Gracia y Piccolo 2006).

5. **Síntomas.** TSWV puede inducir una gran variedad de síntomas en las plantas que infecta, lo que representa pérdida de plantas ornamentales, vegetales y cultivos industriales, que son económicamente importantes. Los síntomas incluyen: lesiones necróticas o cloróticas locales, manchas anulares, manchas anulares concéntricas, mosaico de la isla verde, decoloración de tallo, patrones lineares, bronceado, enanismo, entre otros (OEPP/EPPO 2004). También se han reportado líneas negras o moradas en los tallos, distorsión y deformación de las hojas y pérdidas de hojas y brotes (Broughton, Jones y Coutts 2004).

Figura 3: Síntomas causados por infección por TSWV en crisantemos. (A) Clorosis en hojas, (B) coloración café en tallos, (C) enanismo de la planta, (D) acolochamiento de las hojas. Fotografías tomadas en la finca de la comunidad de Zet de San Juan Sacatepéquez, Guatemala



6. **Técnicas de control.** Actualmente no se conoce una técnica adecuada para el control de las enfermedades causadas por *Tospovirus*. La estrategia más efectiva es la aplicación multidisciplinaria de técnicas preventivas, como la disminución de afluencia de vectores, cultivar plantas libres de virus genéticamente resistentes, evitar fuentes de infección y cambiar estrategias de cultivo. La utilización de distintos factores combinados para el control, han probado ser los más efectivos para controlar al TSWV (Culbreath, Todd y Brown 2003; Granval y Gracia 1999).

a. **Selección del cultivo y resistencia en campo.** Uno de los factores más importantes en el control del bronceado del tomate es la selección del cultivo. En la actualidad existe una variedad de cultivos que presentan cierto grado de resistencia a TSWV (Culbreath, Todd y Brown 2003). En el mercado se han comercializado plantas de tomate con el gen de resistencia Sw-5, igualmente se han creado plantas transgénicas con resistencia al gen N de TSWV (Adkins 2000). Los cultivos nuevos (cultivos

modificados genéticamente) y líneas cultivadas (cultivo de plantas que han presentado resistencia natural al virus) presentan un potencial muy grande para reducir pérdidas en los cultivos. Uno de los problemas más grandes en el desarrollo de cultivos resistentes es la lentitud del proceso, por esto, se deben tener en mente otros factores además de la resistencia a TSWV. Deben tenerse en cuenta las características agronómicas deseables en el cultivo, así como el desarrollo de resistencias múltiples (Culbreath, Todd y Brown 2003).

b. Manejo del cultivo. Cuando se encuentran plantas infectadas, es importante reconocer la o las fuentes de inóculo para eliminarlas. Cuando se encuentran con plantaciones abandonadas debido a extensas pérdidas de cultivos por infección, es importante levantar y eliminar las plántulas, para evitar que sirvan de fuente de inóculo para los vectores. Es también de suma importancia, limpiar y mantener limpias las plantaciones, para evitar que las malezas puedan servir de fuente de inóculo para los vectores (Granval y Gracia 1999).

Algunos autores proponen la idea de realizar la menor cantidad de labranza de las tierras de cultivo, para evitar por impedimento visual, el reconocimiento de las plantas hospederas de los insectos vectores, ya que al verse obstaculizada su visión, los trips inmigrantes no podrán reconocer a sus plantas hospederas. También se recomienda realizar un control de las malezas de la plantación para evitar la presencia de plantas hospederas de virus y es vector en las cercanías de las plantaciones (Culbreath, Todd y Brown 2003).

c. Control de vectores. Las aplicaciones de insecticidas y químicos en cultivos no han sido eficaces para el control vectorial para el TSWV. Esto se debe a que los insecticidas que existen hasta el momento pueden matar a las larvas de trips, evitando el daño ocasionado por éstas, sin embargo no son capaces de evitar los daños ocasionados por los trips adultos que migran de áreas vecinas a los cultivos. En estudios realizados con *F. occidentalis* en *Petunia* y *Datura*, se descubrió que únicamente cinco minutos de alimentación eran suficientes para que los trips pudieran transmitir TSWV, mientras que se requería de períodos más largos de tiempo para que los insecticidas tuvieran efecto (Culbreath, Todd y Brown 2003).

Los insecticidas que han presentado mayor eficiencia en el control de TSWV son los organofosforados. La aplicación de Ditiófosfato de o,o-dietilo (Isoforato) en surcos, resultó en la disminución de TSWV en plantaciones de maní (Baldwin *et al.* 2001). Se ha propuesto que la eficiencia de estos insecticidas fosforados, se debe a que al aplicarlos en plantas jóvenes estos inducen algún tipo de daño en las mismas. Estos daños pueden activar algunos mecanismos de defensa en las plantas, los cuales a su vez pueden interferir en el movimiento y replicación del virus dentro de la planta (Baldwin *et al.* 2001; Culbreath, Todd y Brown 2003).

Para el control vectorial también se utiliza el control biológico. Las especies más empleadas para el control de trips son las especies *Orius* sp., *Chrysoperla carnea* y *Amblyseius* sp. Éstos presentan una alternativa eficiente y de preferencia ambiental y ecológica (Granval y Gracia 1999). Igualmente se han utilizado algunos hongos entomopatógenos para el control de trips, de los cuales *Beauveria bassiana* ha demostrado ser eficiente para el control de distintos trips (Culbreath, Todd y Brown 2003).

7. Técnicas de diagnóstico. Durante varios años, los únicos métodos utilizados para diagnosticar virosis fue el análisis de los síntomas, transmisión mecánica y por ácaros y análisis por microscopía electrónica de tejidos infectados. Estos métodos presentan ciertas desventajas, como: poca o nula especificidad, poca confiabilidad, alto costo y mucho tiempo para obtener resultados. Recientemente se han utilizado métodos moleculares para el diagnóstico de la enfermedad (Bastianel *et al.* 2006).

a. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Es un ensayo de unión directa a anticuerpos o antígenos. Los ensayos de ELISA son usados con frecuencia para el diagnóstico de virus, por ejemplo para la detección de casos de infección de VIH. Para realizar el ensayo, se requiere de una preparación pura de antígeno o anticuerpo conocida, o ambos, para poder estandarizar el ensayo. Cuando se trata de un ensayo con anticuerpos purificados, se une químicamente una enzima al anticuerpo, mientras que el antígeno se inmoviliza en un soporte sólido (Janeway *et al.* 2005).

El anticuerpo marcado se une al antígeno y todo el anticuerpo no unido y otras proteínas son lavadas. La unión se detecta por una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción con color. El cambio de color puede medirse en el mismo plato, haciendo al ensayo muy fácil, además presenta la ventaja que no utiliza radioactividad (Janeway *et al.* 2005).

El ELISA es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de TSWV. Para el diagnóstico en plantas, es importante recolectar material vegetal sintomático y preferiblemente tejido reciente (OEPP/EPPO 2004). Varios estudios reportan el uso de ELISA para la detección de la proteína no estructural (NS) de TSWV (Stumpf y Kennedy 2007).

b. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR). La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), permite que una plantilla de ARN sea utilizada como plantilla para una PCR (Watson *et al.* 1996). Esta técnica es de gran importancia en el diagnóstico de virus como los rhabdovirus, cuyo material genético está constituido por ARN.

El primer paso en una RT-PCR es convertir las moléculas de ARN en ADNc de hebra simple por medio de la transcriptasa reversa. Una vez concluido este paso, se agregan los iniciadores para el PCR y la enzima Taq ADN polimerasa, y el proceso ocurre exactamente igual que la PCR. El producto de RT-PCR

son muchas copias de la región de interés del transcrito de ARN en forma de ADNc de doble hebra (Watson *et al.* 1996).

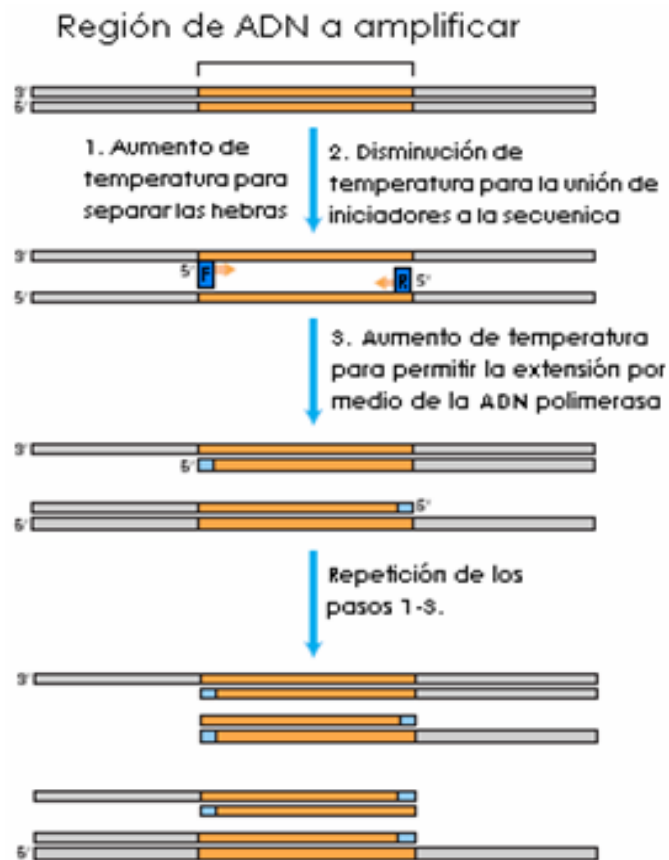
La PCR permite amplificar selectivamente una región específica de ADN. Su importancia radica en la habilidad para amplificar segmentos de ADN *in vitro* a partir de cantidades mínimas de ADN molde. La base de la reacción es la hibridización y extensión enzimática, catalizada por una enzima ADN polimerasa, deoxinucleósidos trifosfatos (dNTP's por sus siglas en inglés) y dos iniciadores oligonucleótidos que delimitan la región de ADN que se desea amplificar. Es crítico tener el conocimiento de la secuencia de los bordes que delimitan la región que se desea amplificar (Brown 2001).

La amplificación se inicia después de agregar la enzima al molde de ADN y se incuba para que se logre la síntesis de la hebra complementaria. Para que esto ocurra es necesario elevar la temperatura a 94° C para que las dos hebras de ADN se separen (desnaturalización). A continuación se lleva la mezcla de reacción a una temperatura a la cual los iniciadores seleccionados se pueden unir a la secuencia de ADN complementario (hibridización). Luego cada uno de los iniciadores son extendidos enzimáticamente por la ADN polimerasa (extensión), permitiendo la síntesis de un segmento específico de ADN. Las fases de desnaturalización, hibridización y extensión son los tres pasos básicos en una reacción de PCR y constituyen un ciclo de la reacción. Al final estos pasos se repiten un número (n) de veces y se obtiene como resultado 2ⁿ moléculas de ADN doble hebra que son copias de la secuencia que se deseaba amplificar (Figura 4) (Lewin 2006).

La técnica de PCR es altamente sensible. Permite detectar y amplificar tan poco como una molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra (Nelson y Cox 2005). En la actualidad se ha reportado el uso de RT-PCR para la detección de TSWV tanto en plantas como en los insectos vectores trips (OEPP/EPPO 2004; Naidu, R.A, J.L. Sherwood y C.M. Deom 2007; Matsuura *et al.*, 2004). Estudios previos han utilizado iniciadores con secuencias correspondientes a las regiones de ARN L y ARN S de TSWV.

OEPP/EPPO (2004) recomiendan la utilización de los iniciadores con secuencias de la región ARN L de TSWV, los cuales amplifican un fragmento de ADNc de 276 pb, mientras que Naidu *et al.* (2004) reporta la utilización de iniciadores con secuencias correspondientes a la región ARN S de TSWV, los cuales dan un producto final de PCR de 790 pb. En este estudio se utilizó dos pares de iniciadores específicos para TSWV, un par correspondiente a la región ARN L (L1TSWV y L2TSWV) y un par correspondiente a la región ARN S (S1986 y S2767 para TSWV) con productos de amplificación de 276 pb y 790 pb respectivamente.

Figura 4: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Nelson & Cox, 2005).



B. Justificación

El impacto económico de los *Tospovirus* en la agricultura es muy grande, considerando su distribución mundial y la diversidad de hospedantes afectados. Se estima que las pérdidas anuales que provocan en el mundo superan los mil millones de dólares, además se considera que TSWV está entre las diez virosis más devastadoras del mundo (Granval y Gracia 1999).

Mundialmente, TSWV es el miembro más prevalente y destructivo del género *Tospovirus*. Las tasas de infección son de 50-90%, y en algunos casos ocasionando la pérdida total de los cultivos (Culbreath, Todd y Brown 2003; Adkins 2000).

La agricultura es una de las principales actividades económicas en Guatemala. El sector agrícola reportó exportaciones de US\$655 millones en el año 2006. Actualmente la exportación de productos agrícolas representa un 28% del total de las exportaciones totales del país y genera más de un millón de empleos en el país. Guatemala produce una amplia variedad de arveja china, brócoli, espárragos, coliflor, ejotes, tomate, chile pimiento, haba, papaya, sandía, melón, rosas, crisantemos, claveles, entre otros (AGEXPORT 2008).

Solamente la industria de ornamentales, follajes y flores producen alrededor de 80 especies y 200 variedades diferentes. Esta industria genera alrededor de 60,000 fuentes de trabajo en Guatemala. Sobre la base de las ornamentales se ha desarrollado una actividad exportadora con una tasa de crecimiento del 12%, que contribuye al ingreso de divisas del país, con alrededor de US\$67 millones (AGEXPORT 2008). Similarmente, el cultivo del tomate ha generado fuentes de empleo directo en campo que excede los 2.6 millones por año (MAGA 2008). En Guatemala, se han visto afectadas las plantaciones de ornamentales, sobre todo crisantemos en el área de San Juan Sacatepéquez, donde estos cultivos se han visto atacados por los insectos trips y en gran parte por enfermedades virales transmitidas, específicamente TSWV. En estos lugares, han llegado a tener pérdidas de hasta un 60% de la plantación (Argueta 2007).

En estudios previos, se ha determinado que en Guatemala se encuentran la mayoría de las especies de trips que se sabe, son vectores de virus del género *Tospovirus*. Las especies que se han encontrado en mayor abundancia son *F. occidentalis*, *T. palmi*, *T. tabaci* y *F. schultzei*. De estas cuatro especies con mayor abundancia, las primeras tres son conocidas como vectores altamente eficientes de tospovirus en el mundo, sin embargo, en Guatemala no se han hecho estudios que involucren a la especie de trips y el virus que puede transmitir, ni se han hecho estudios de capacidad vectorial para calcular la eficiencia de transmisión viral que poseen las especies de trips que están circulando en el país. Además, debido a que el TSWV es uno de los tospovirus más ampliamente distribuidos y de los más devastadores en cultivos agrícolas, es importante conocer cuáles especies de trips son las que presentan mayor incidencia de TSWV, para utilizarlo como análisis de riesgo e implementar técnicas de manejo integrado de plagas.

La utilización de métodos moleculares para el diagnóstico de virus es muy importante, ya que éstos presentan la ventaja de tener mayor sensibilidad que otras técnicas de diagnóstico como las serológicas, mayor rapidez para la obtención de resultados y mayor especificidad, ya que es posible obtener la secuencia de ADN del producto de amplificación para determinar exactamente qué cepa del virus es la que está circulando en las plantaciones.

En este estudio se aplicó la técnica del RT-PCR para la amplificación de regiones específicas del genoma viral como método de diagnóstico del TSWV en insectos individuales trips. El diagnóstico temprano y certero del virus en los insectos que se encuentran dentro de las plantaciones, puede brindar

información útil a los agricultores para que tomen las medidas necesarias antes de que la enfermedad sea transmitida y diseminada a toda la plantación.

C. Objetivos

1. Objetivo general

Estandarizar y optimizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus del bronceado del tomate (TSWV por sus siglas en inglés) en el insecto vector *trips*, Thripidae (Thysanoptera).

2. Objetivos específicos

- Establecer un método de extracción de ARN eficiente que permita la detección del TSWV en insectos trips individuales.
- Estandarizar y optimizar el método de diagnóstico molecular RT-PCR para la detección de TSWV en trips individuales.
- Comparar la secuencia de ADN del producto de amplificación de TSWV que circula en Guatemala con secuencias reportadas en el mundo en GenBank para determinar la posible procedencia del mismo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Métodos

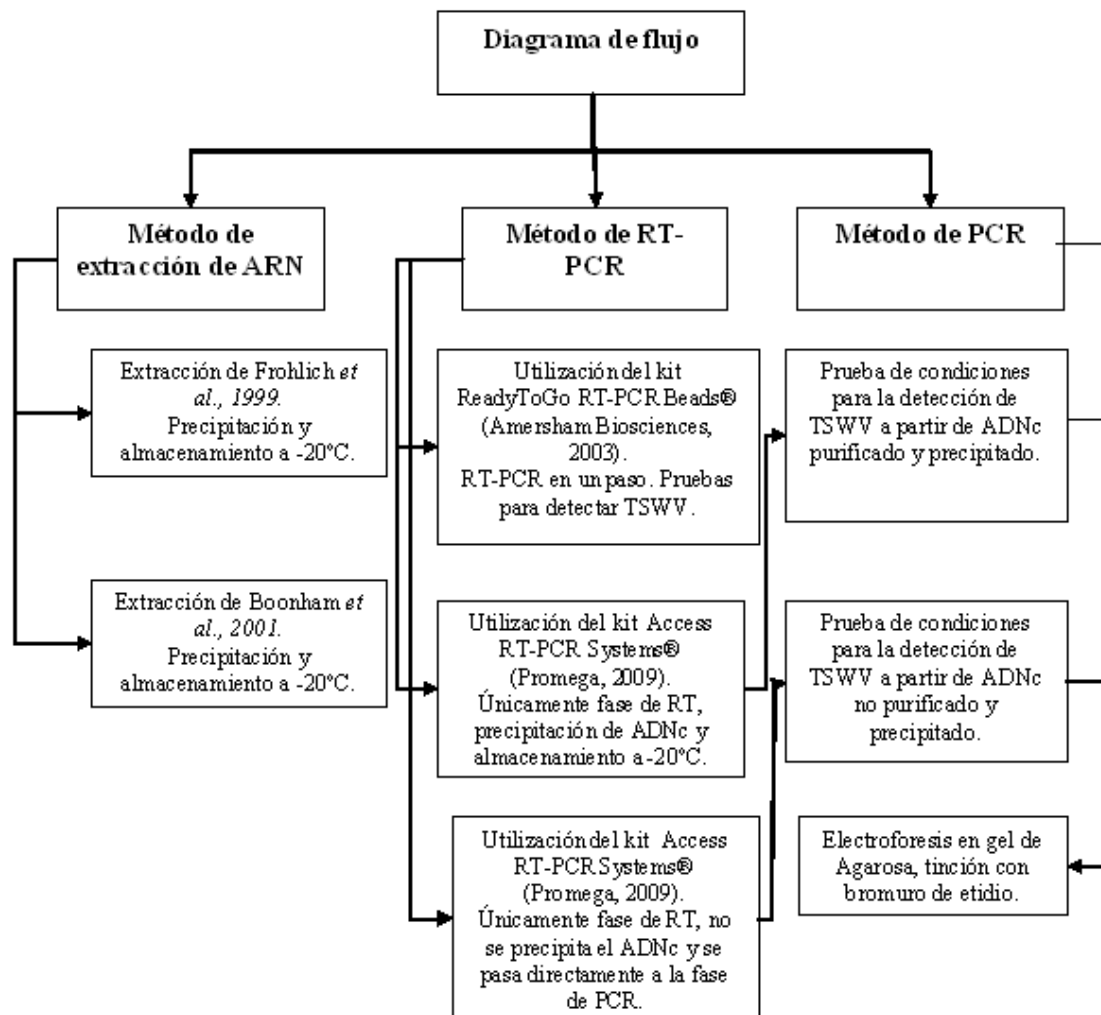
1. Obtención de las muestras. Se recolectó trips vivos y muertos en plantaciones de crisantemo en la región de los municipios de San Juan Sacatepéquez y San Pedro Sacatepéquez del departamento de Guatemala. Los trips vivos se recolectaron arrancando flores de crisantemo y colocándolas en bolsas Ziplock. Los trips muertos se recolectaron sacudiendo flores de crisantemo dentro de un recipiente con alcohol etílico al 80%. Las muestras se transportaron dentro de una hielera con hielo (aproximadamente 9° C) hacia el laboratorio. Una vez en el laboratorio, se almacenó las muestras de trips muertos a 4° C y se sacudió las flores con trips vivos, para recolectarlos y luego fueron colocados dentro de una jaula como se describe a continuación.

2. Obtención de trips infectados. Se colocó una planta infectada con TSWV dentro de una jaula para insectos. Dentro de la jaula se colocaron trips vivos y se esperó hasta que estos se reprodujeran y las larvas llegaran a su estado adulto. Se recolectó trips de la planta infectada 35 días después de haber introducido los trips iniciales. Se realizó extracción de ARN de los trips recolectados.

Figura 5: Jaula con planta infectada con TSWV



3. Diagrama de flujo del procedimiento de estandarización de la detección de TSWV



4. Extracción de ARN

a. Extracción de Frohlich *et al.* 1999. Se extrajo ARN de trips individuales utilizando el método propuesto por Frohlich *et al.* (1999), con algunas modificaciones según se describe a continuación. Se extrajo también ARN de trips en grupos de 3, 5 y 10.

Se preparó una caja de Petri forrada con servilletas, papel aluminio y parafilm limpio, luego se hicieron pequeños pozos. Se maceró trips individuales en 5 ul de tampón de lisis (ver Cuadro 1), a continuación se tomó el macerado con una micropipeta de 20 ul y se colocó en un tubo cónico Eppendorf de 0.2 ml con 15 ul de tampón de lisis. Se realizó lavados con 5 ul del mismo tampón, para recuperar una mayor cantidad de extracto. Se incubaron las muestras en un bloque térmico a 70° C durante 10 minutos, luego inmediatamente en hielo durante 5 minutos. Se procedió a almacenar las muestras a -20° C hasta su procesamiento.

Cuadro 1: Tampón de lisis utilizado para la extracción de ARN (Frohlinch *et al.* 1999)

Reactivo	Concentración final
Tris (pH 8.0)	5.0mM
EDTA (pH 8.0)	0.5mM
Nonidet P-40	0.5%
Proteinasa K	1.0mg/mL

b. Extracción de Boonham *et al.* 2001. Se preparó una caja de Petri forrada con servilletas, papel aluminio y parafilm limpio, luego se hicieron pequeños pozos. Se maceró trips individuales en 5 ul de agua ultrapura tratada con DEPC, a continuación se tomó el macerado con una micropipeta de 20 ul, y se colocó en un tubo cónico Eppendorf de 1.5 ml con 15 ul de agua ultrapura tratada con DEPC. Se realizó lavados con 5 ul de la misma agua, para recuperar una mayor cantidad de extracto. Se agregó 20 ul de resina Chelex 100 (50%v/v en agua tratada con DEPC), se calentó a 95° C durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. Luego se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo cónico eppendorf de 1.5 ml, se agregó 2.5 volúmenes de isopropanol al 100% y 0.1 volumen de acetato de amonio 7.0M y se almacenó a -20° C hasta su procesamiento.

5. Determinación de la concentración de ARN extraído por cada uno de los tres métodos. Se extrajo tres trips individualmente con cada método. Trabajando en triplicado, se analizó por medio de espectrofotometría ultravioleta (Espectrofotómetro Genesys 10UV, Thermo Spectronic, cat. 335902, Rochester, NY, USA). La medición espectrofotométrica se llevó a cabo colocando en una celda de cuarzo 493 ul de agua ultrapura y 7 ul del ARN extraído, se homogenizó por inversión y se midió la absorbancia a 260 nm, 280 nm y 320 nm. Se calculó la concentración de ARN utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{ARN}] \text{ ng/uL} = (A_{260} - A_{320}) (\text{factor de conversión ARNss}) (\text{factor de dilución})$$

$$[\text{ARN}] \text{ ng/ul} = (A_{260} - A_{320}) (40 \text{ ng/ul}) (493/7)$$

Se calculó, además la pureza del ARN. Se considera que el ARN tiene una alta pureza si presenta valores entre 1.9 y 2.1. El cálculo se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Pureza ARN} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

6. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR)

a. RT-PCR en un paso con el kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences, 2003). Se utilizó el kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences 2003), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se trabajó con un volumen final de 12.5 ul con una concentración final de 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 2.0 unidades de Taq DNA polymerase, 60 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 uM de cada dNTP, transcriptasa reversa del virus de la leucemia del murino molónico (M-MuLV, por sus siglas en inglés), 1.0 uM de iniciador antisentido y 1.0 uM de iniciador sentido. En el Cuadro 2 se muestra el programa para el RT-PCR, el cual se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, Germany, No. 533202407.

Se utilizó dos pares de iniciadores específicos para TSWV, un par propuesto por la OEPP/EPPO (2004) que amplifica un fragmento del segmento de ARN L de TSWV (aproximadamente 257 pb) y otro propuesto por Naidu *et al.* (2004) que amplifica un fragmento del segmento de ARN S de TSWV (aproximadamente 790 pb) (ver secuencias de iniciadores en cuadro 5).

Se amplificó además, el gen 18S ARNr, el cual fue seleccionado como gen constitutivo para el control interno de RT-PCR y extracción de ARN. Se siguió el mismo procedimiento y las mismas concentraciones anteriormente descritas, utilizando un iniciador general propuesto por Hoffmann *et al.* (2004) para amplificar un fragmento del gen 18S ARNr de aproximadamente 504 pb. Como control positivo de TSWV, se utilizó extracciones de ARN de plantas, las cuales fueron diagnosticadas como positivas para TSWV por medio de ELISA y RT-PCR.

Cuadro 2: Programa para la RT-PCR

Etapas de la reacción	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Transcripción reversa	42° C	25 minutos	1
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	1
Desnaturalización	95° C	1 minutos	32
Anillamiento	54° C	1 minutos	
Extensión	72° C	2 minutos	
Desnaturalización final	95° C	1 minutos	1
Anillamiento final	54° C	1 minutos	1
Extensión final	72° C	10 minutos	1

b. Transcripción reversa (RT) con el kit de RT-PCR, Access RT-PCR Systems® (Promega, 2009). Se utilizó el kit Access RT-PCR Systems® (Promega, 2009). Siguiendo las especificaciones del fabricante, se realizó la RT-PCR en dos pasos. La transcripción reversa se llevó a cabo

en un volumen final de 12 μ l con una concentración final de tampón de reacción de 1X, 1.04 mM MgSO_4 , 0.21 mM de dNTP, 0.10 U/ μ l de enzima transcriptasa reversa (AMV), 1.04 μ M de iniciador antisentido. En el Cuadro 3 se muestra el programa para la RT, el cual fue llevado a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, Germany, No. 533202407.

Cuadro 3: Programa para la fase de RT.

Etapas de la reacción	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Transcripción reversa	42° C	25 minutos	1
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	1

c. PCR. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ l con una concentración final de tampón de reacción 1X, 0.5 mM de cada dNTP, 0.04U/ μ l de Go Taq Flexi ADN polimerasa (Promega corp.). Se agregó 1.0 μ M de cada iniciador (sentido y antisentido). Para la estandarización y optimización del método de detección de TSWV, se utilizaron distintas concentraciones de MgCl_2 y distintas temperaturas de anillamiento, esto con el propósito de obtener las condiciones óptimas con la mayor astringencia posible. Se varió la concentración de MgCl_2 en un rango desde 1.8 mM hasta 0.16 mM y la temperatura de anillamiento desde 54° C hasta 59° C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, Germany, No. 533202407 bajo las condiciones del programa descrito en el cuadro 4. Los controles de PCR (positivos e internos) utilizados en esta sección, así como los iniciadores son los mismos mencionados anteriormente en el inciso (a) RT-PCR en un paso con el kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences 2003).

Cuadro 4: Programa para la fase de PCR.

Etapas de la reacción	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	1
Desnaturalización	95° C	1 minutos	
Anillamiento	54° C	1 minutos	32
Extensión	72° C	2 minutos	
Desnaturalización final	95° C	1 minutos	1
Anillamiento final	54° C	1 minutos	1
Extensión final	72° C	10 minutos	1

Cuadro 5: Secuencia de los iniciadores de PCR.

Iniciador	Nombre	Genoma	Long.	Producto	Secuencia
Sentido	18S417	Insecto	24 pb	504 pb	5'-ACGGGGAGGTAGTGACGAGAAATA-3'
Antisentido	18S920c	Insecto	24 pb		5'-TAATACTAATGCCCCCACTACTT-3'
Sentido	L2TSWV	TSWV	20 pb	257 pb	5'-ATCAGTCGAAATGGTCGGCA-3'
Antisentido	L1TSWV	TSWV	20 pb		5'- AATTGCCTTGCAACCAATTC -3'
Sentido	S1983	TSWV	24 pb	790 pb	5'-CAGCTGCTTTCAAGCAAGTTCTGC-3'
Antisentido	S2767	TSWV	24 pb		5'-CATCATGTCTAAGGTTAAGCTCAC-3'

7. Electroforesis en gel de agarosa. Se armó la cámara electroforética horizontal marca Apollo, se preparó una solución de agarosa (Promega) al 2% en tampón TAE 1X y se disolvió calentando en microondas durante 30 segundos. Se esperó hasta que la agarosa bajara la temperatura a aproximadamente 50° C. A continuación se vertió la solución de agarosa en la cámara y se colocó los peines. Una vez polimerizado el gel, se cubrió con aproximadamente 300 ml de tampón TAE 1X. Se cargó 7 ul de producto de PCR mezclado con 1 ul de tampón de carga. Luego se corrió la electroforesis a 85V por 40 minutos. Se tiñó el gel sumergiéndolo durante 2 minutos en una solución de bromuro de etidio, y el exceso fue removido sumergiendo el gel en agua. Por último se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se tomó una fotografía.

8. Secuenciación de los productos de PCR. Se purificó el producto de PCR obtenido a partir de la amplificación con los pares de iniciadores para el gen 18S de insectos y los dos productos de PCR obtenidos con los pares de iniciadores del segmento de ARN S de TSWV. Estos productos de PCR fueron enviados a la Universidad de Washington State, al departamento de Patología de plantas, para que fueran secuenciados.

a. Purificación de productos de PCR. Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corporation 2009). Se siguió las indicaciones del fabricante para la purificación directa a partir de geles de agarosa.

b. Secuenciación de productos de PCR. Los productos de PCR del segmento de ARN S de TSWV, fueron secuenciados por el método de secuenciación automática, en el laboratorio de patología de plantas, de la Universidad de Washington State.

c. Análisis de los resultados de la secuenciación de los productos de PCR y comparación con secuencias publicadas en GenBank. Se utilizó el programa DNASTar Lasergen, para la edición, alineación y construcción de árboles filogenéticos. Se buscó todas las secuencias disponibles del segmento

de ARN S de TSWV publicadas en GenBank. Estas secuencias fueron comparadas con la secuencia de dicho segmento del virus encontrada en Guatemala. A partir de estas secuencias se construyó un árbol filogenético, utilizando como out-group, la secuencia del segmento de ARN S de otro tospovirus, el INSV.

B. Diseño experimental

1. **Variables.** Las condiciones como concentraciones, temperaturas que permitan detectar de una manera óptima la presencia del virus TSWV en insectos individuales.

2. **Unidad experimental.** Presencia de un fragmento de ADNc de aproximadamente 257 pb o 790 pb correspondientes al segmento de ARN L o ARN S de TSWV, respectivamente.

3. **Tipo de investigación y estudio.** Se trata de un estudio cualitativo transeccional, con una investigación del tipo no experimental.

4. **Selección de muestra.** Para la estandarización y optimización del método de detección de TSWV por RT-PCR, se seleccionaron trips aleatoriamente que se encontraban dentro de la jaula con planta infectada.

5. **Análisis estadístico.** Se realizó un análisis estadístico descriptivo utilizando el paquete estadístico Análisis Toolpack, del programa Excel, de Microsoft Corporation.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Estandarización y optimización del método de detección por RT-PCR de TSWV en el insecto trips.

Uno de los objetivos de este trabajo fue la estandarización del método de detección por RT-PCR de TSWV en el insecto vector trips. Para cumplir este objetivo, primero fue necesario establecer un protocolo de extracción de ARN eficaz a partir de insectos individuales trips. A continuación, fue necesario establecer las condiciones de reacción óptimas que permitieran la detección del virus a partir de la extracción de trips individuales. Con estos fines, se siguió la metodología que fue descrita en la sección anterior. A continuación se describen los resultados que se obtuvieron en el proceso de estandarización de la detección de TSWV.

1. Comparación de métodos de extracción de ARN. Se realizó la comparación de dos métodos de extracción de ARN con el propósito de determinar un método que permitiera la obtención de una mayor concentración de ARN a partir de la extracción de insectos individuales. Una mayor recuperación de ARN permitiría aumentar las probabilidades de contar con ARN molde para la amplificación por RT-PCR.

Los métodos que fueron comparados son los siguientes: Extracción modificada de Frohlich *et al.* (1999) y extracción modificada de Boonham *et al.* (2001). La extracción de Frohlich *et al.* (1999) fue seleccionada debido a que es una extracción ampliamente utilizada para la detección de virus y patógenos en insectos como la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). La extracción de Boonham *et al.* (2001) fue seleccionada debido a que fue reportada para la detección de tospovirus en trips individuales. Cabe mencionar que la detección en este caso, fue llevada a cabo por RT-PCR en tiempo real, técnica que es mucho más sensible que el RT-PCR convencional.

La eficacia del método de extracción fue evaluada tomando en cuenta la concentración de ARN recuperado por cada trip individual y, hasta cierto punto, la pureza promedio obtenida con cada método de extracción. Los resultados de pureza y concentración de ARN se presentan a continuación en el Cuadro 6. Los valores de absorbancia a partir de las cuales se calcularon los valores de pureza y concentración se reportan en el apéndice A de la sección Apéndice.

Cuadro 6: Concentración y pureza del ARN extraído a partir de trips individuales comparando cada uno de los métodos de extracción utilizado.

Método de extracción	No. de muestra *	Concentración de ARN (ng/ul)	Media de concentración por método (ng/ul)	Pureza de ARN	Media de pureza por método
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1.1	377.50		0.65	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1.2	383.14		0.65	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1.3	287.35		0.65	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2.1	377.50		0.65	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2.2	371.87	349.64	0.64	0.64
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2.3	335.25		0.63	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3.1	349.33		0.63	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3.2	354.97		0.64	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3.3	309.89		0.63	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1.1	2.82		1.00	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1.2	5.63		1.50	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1.3	5.63		1.33	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2.1	0.00		1.00	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2.2	2.82	7.2	1.00	1.13
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2.3	0.00		1.00	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3.1	16.90		1.13	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3.2	16.90		1.00	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3.3	14.09		1.17	

* Donde el último número (derecha) representa el número de repetición de lectura de cada muestra, el número de en medio representa el número de muestra de cada método de extracción y el primer número (izquierda) representa el método de extracción (1: Frohlich *et al.* (1999), 2: Boonham *et al.* (2001)).

Como se puede ver en el Cuadro 6, la extracción de Frohlich *et al.* (1999) presenta valores altos de concentración de ARN (cercano a 350 ng/ul), sin embargo, los valores de pureza indican que se trata de una extracción con demasiadas impurezas (valor de pureza cercano a 0.60). Estas impurezas pueden estar afectando los valores de concentración, dando la apariencia de que se tiene más ARN de lo que en realidad hay. Además, un exceso de impurezas en el ARN puede causar interferencia en la RT-PCR. Los valores ideales para considerar un ARN puro son valores cercanos a 2 (1.9 a 2.1). La extracción de Boonham *et al.* (2001) presentó valores muy bajos de concentración de ARN (cercano a 7 ug/ul) y valores de pureza más altos que los obtenidos con la extracción de Frohlich *et al.* (1999) (cercanos a 1.15), sin embargo no lo suficientemente altos para considerar que el ARN extraído es puro.

A partir de estos resultados, se puede decir que ambas extracciones son sucias, ya que brindan un ARN con demasiadas impurezas. En ambos casos las impurezas provienen de proteínas, ya que los valores de absorbancia a 280 nm son muy elevadas, resultado que implica una alta concentración de proteínas contaminantes.

Se utilizó estadística descriptiva para validar los resultados de pureza y concentración obtenidos. Para lo cual, se calculó la desviación estándar de los resultados obtenidos por triplicado de cada muestra, así como la media y desviación estándar de los resultados obtenidos entre cada una de las tres muestras en cada uno de los métodos de extracción. En los Cuadros 7 y 8 se muestran los resultados de la estadística descriptiva.

Cuadro 7: Desviación estándar de los resultados de concentración y pureza del ARN extraído por cada uno de los métodos de extracción utilizados, tomando en cuenta las repeticiones por cada muestra analizada.

Método de Extracción	No. de muestra *	Desviación Estándar de pureza	Desviación estándar de concentración (ng/ul)
Frohlich <i>et al.</i> 1999	2.1	0.00	53.75
Frohlich <i>et al.</i> 1999	2.2	0.01	22.94
Frohlich <i>et al.</i> 1999	2.3	0.00	24.56
Boonham <i>et al.</i> 2001	3.1	0.25	1.63
Boonham <i>et al.</i> 2001	3.2	0.00	1.63
Boonham <i>et al.</i> 2001	3.3	0.09	1.63

* Donde el primer número (izquierda) representa el método de extracción (1: Frohlich *et al.* (1999), 2: Boonham *et al.* (2001)) y el último número (derecha) representa el número de muestra por método de extracción.

Como se puede ver en el Cuadro 7 las repeticiones por cada muestra fueron bastante constantes en lo que respecta a los valores de pureza, ya que se obtuvieron desviaciones estándar cercanas a cero sin importar el método de extracción. Sin embargo, en lo que respecta a los valores de concentración de ARN, sí hubo variaciones un poco más grandes en las repeticiones entre muestras. Se obtuvieron desviaciones estándar de 22.94 a 53.75 ng/ul con la extracción de Frohlich *et al.* (1999), mientras que con la extracción de Boonham *et al.* (2001) se obtuvieron desviaciones estándar de 1.63 ng/ul. Estos valores significan que con la extracción de Frohlich *et al.* (1999) no se obtiene repetibilidad en concentración de ARN, lo cual puede presentar el problema que no siempre se obtenga ARN molde al momento de tomar un volumen determinado de la extracción para la RT-PCR. Si se le agrega a esta falta de repetibilidad, la cantidad de impurezas presentes en la extracción, se podría inferir que la extracción de Frohlich *et al.* (1999) no es la extracción ideal para su utilización en detección por métodos moleculares. En contraste, la extracción de

Boonham *et al.* (2001) presentó una desviación estándar menor, pudiendo implicar una mayor repetibilidad al momento de tomar muestras a partir de la extracción. Cabe mencionar que las variaciones presentes en concentración por medio de la extracción de Frohlich *et al.* (1999) son respecto a un mayor valor de concentración inicial. En ambos casos, la variación respecto a muestra representa aproximadamente a un séptimo de la concentración total de las muestras.

Cuadro 8: Media y desviación estándar de los resultados de concentración y pureza del ARN extraído por cada uno de los métodos de extracción utilizados, tomando en cuenta los valores promedios de cada muestra analizada.

Método de extracción	No. de muestra *	Media pureza	Desviación Estándar de pureza	Media concentración (ng/ul)	Desviación estándar de concentración (ng/ul)
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1	0.65		349.33	
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2	0.64	0.01	361.54	11.74
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3	0.63		338.06	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1	1.28		4.70	
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2	1.00	0.14	0.94	7.82
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3	1.10		15.96	

* Donde el primer número (izquierda) representa el método de extracción (1: Frohlich *et al.* (1999), 2: Boonham *et al.* (2001)) y el último número (derecha) representa el número de muestra por método de extracción.

En el Cuadro 8 se puede ver cómo la variación entre cada muestra no es tan elevada, ya que la desviación estándar para la pureza es cercana a cero, mientras que para la concentración de ARN se obtuvo una desviación estándar de 11.74 ng/ul para la extracción de Frohlich *et al.* (1999) y 7.82 ng/ul para la extracción de Boonham *et al.* (2001). Existe repetibilidad entre muestras en lo que respecta a pureza y concentración de ARN obtenido. Las variaciones radican hasta cierto punto, dentro de cada muestra, no entre muestras, como se pudo ver en el Cuadro 5.

Basándose en los resultados obtenidos para la comparación de los dos métodos de extracción, se puede concluir que el método más aplicable para la detección de TSWV por RT-PCR es el método de Frohlich *et al.* (1999), ya que a pesar de no tener una alta pureza, presenta una concentración más elevada de ARN.

Este resultado se pudo comprobar al momento de realizar las pruebas de estandarización del RT-PCR con muestras de ARN extraído por ambos métodos, estos resultados serán discutidos en la siguiente sección.

2. Estandarización y optimización del RT-PCR. El objetivo general de este trabajo fue la estandarización y optimización de la técnica de RT-PCR para la detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) en el insecto vector trips, Thripidae (Thysanoptera). Se hizo la detección en trips individuales, utilizando el par de iniciadores propuestos por la OEPP/EPPO (2004) para la detección de TSWV. Este par de iniciadores amplifica un fragmento de aproximadamente 257 pb perteneciente al segmento de ARN L de TSWV. Su utilización ha sido estandarizada y optimizada en la detección de TSWV en plantas hospederas e indicadoras del virus.

No fue posible realizar la estandarización del RT-PCR para la detección de TSWV en el insecto utilizando el par de iniciadores propuestos por la OEPP/EPPO (2004), ya que se obtuvo un producto de PCR de diferente tamaño al que es reportado en la literatura. El producto esperado es de aproximadamente 257 pb, mientras que en el laboratorio se obtuvo un producto de aproximadamente 450 pb. En la Figura 6 se muestra la fotografía del gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, en la cual se muestra el producto de RT-PCR obtenido a partir de la amplificación en muestras de trips (aproximadamente 450 pb), comparado con el control positivo, detectado en muestra de planta infectada con TSWV, utilizando el mismo par de iniciadores y las mismas condiciones de reacción.

Como se puede ver en la Figura 6, el producto de amplificación en muestras de ARN extraído de trips es mayor al esperado, reportado en la literatura y mayor que el control positivo obtenido a partir de la amplificación de ARN extraído de tejido vegetal infectado con TSWV. A partir de este resultado se empezó a pensar en posibles fuentes de contaminación. Para descartar que se tratara del agua y reactivos del RT-PCR, se realizó pruebas de RT-PCR con reacciones blanco (sin molde de ARN), no se obtuvo amplificación de ningún fragmento.

A continuación, se realizaron pruebas para determinar si la contaminación provenía del proceso de extracción o del mismo tampón de extracción de Frohlich *et al.* (1999), para lo cual se realizó una reacción de RT-PCR utilizando una muestra control de extracción, es decir, una muestra de tampón que pasó por todos los pasos de la extracción, pero que no tenía muestra de trips (control negativo de extracción). Debido a que no se obtuvo ningún producto de RT-PCR, se descartó que la contaminación proviniera de la extracción o de los reactivos en uso para la RT-PCR (ver Figura 7).

Debido a que la extracción de Frohlich *et al.* (1999) es una extracción sucia, que no cuenta con una fase de eliminación de proteínas, ni de ácido desoxiribonucleico (ADN), se tuvo sospechas que la contaminación provenía del ADN del insecto. Así que fue necesario realizar una prueba para determinar

que los iniciadores no se estuvieran anillando inespecíficamente con algún fragmento de ADN. Para descartar esta posibilidad, se realizó una PCR sin la fase de transcripción reversa (RT). Si se hubiera obtenido algún producto de amplificación en esta prueba, se habría podido concluir que la fuente de la contaminación era el ADN presente en la extracción, muy seguramente ADN del mismo trips. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 8, no se obtuvo ningún producto de amplificación de PCR, lo cual descarta la posibilidad de que la contaminación proviniera del ADN presente en la extracción.

Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR en un solo paso con iniciadores L1TSWV y L2TSWV (antisentido y sentido respectivamente). Carriles 1 y 2: fragmento de aproximadamente 450 pb obtenido a partir de ARN extraído de insectos trips. Carril 3: vacío. Carril 4: Control positivo, fragmento de aproximadamente 270 pb obtenido a partir de ARN extraído de una planta infectada con TSWV. Carril 5: escalera de marcador molecular de 100pb.

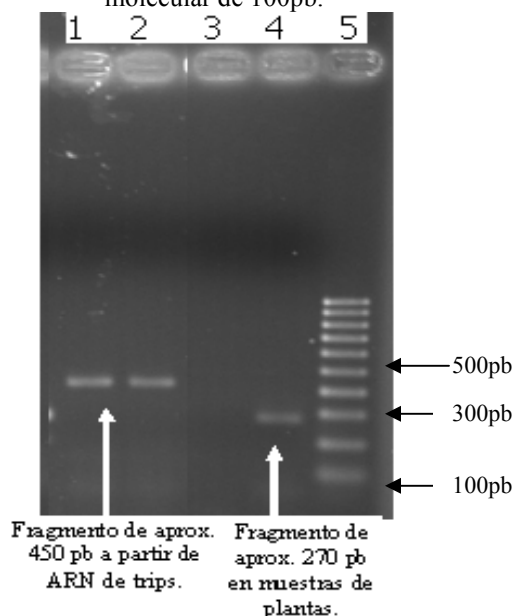


Figura 7: Pruebas de RT-PCR para descartar fuentes de contaminación de ARN. Carril 1: Producto de amplificación de muestra de trips (aproximadamente 450pb). Carril 2: Control negativo de extracción. Carril 3: Control negativo de RT-PCR. MM: escalera de marcador molecular de 100pb.

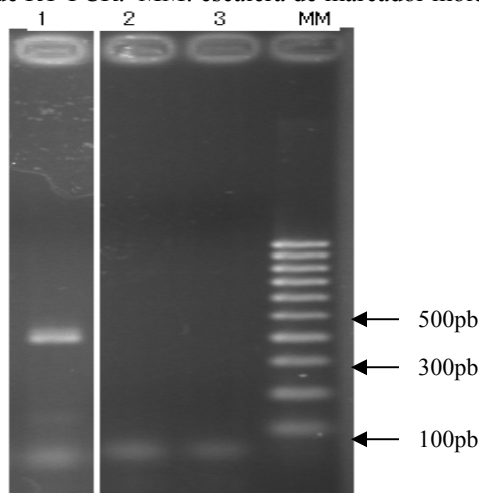
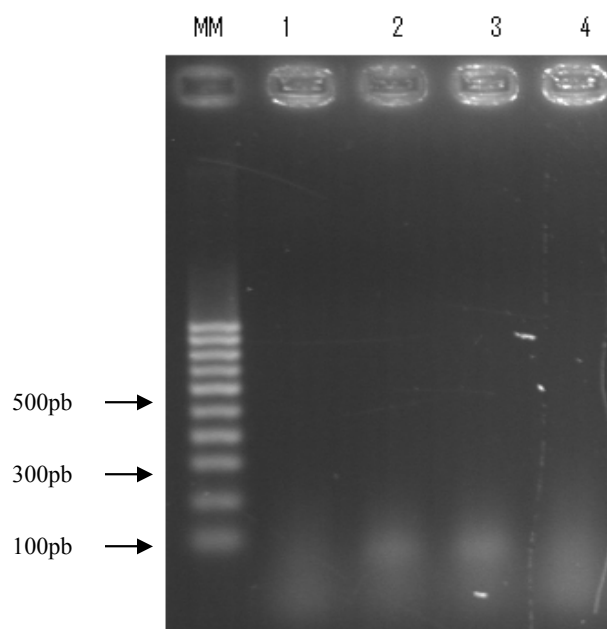


Figura 8: Prueba de PCR para descartar al ADN como fuente de contaminación, sin fase de RT.
MM: escalera de marcador molecular de 100pb. Carril 1-4: muestras de extracción de trips.



Después de haber descartado todas las posibles fuentes de contaminación, se consideró que los iniciadores estaban presentando una reacción cruzada con el ARN del insecto. Es decir, que los iniciadores se anillan y amplifican inespecíficamente un fragmento del ARN del mismo trips. Para corroborar esta hipótesis, fue necesario mandar a secuenciar el producto de RT-PCR. La secuenciación fue llevada a cabo en un secuenciador automático 3730xl (Applied Biosystems). Se obtuvo una secuencia de 369 nucleótidos, la cual fue analizada por análisis de alineación de secuencia local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) y se determinó que correspondía en un 98% a un fragmento del gen 18S de *Frankliniella* sp. En el Cuadro 9 se presenta la secuencia del producto de la RT-PCR amplificado con los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004) para la detección de TSWV.

Cuadro 9: Secuencia del producto de RT-PCR amplificado con los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004).

Longitud	369 pb
Secuencia	5'-CAGCTGCCCGATAAGGCATAAAAAGAACCTTTATCGGATGGCTAGCTCAACATCG TTTTATGGTTAGAACTAGGGCGGTATCTGATCGCCTTCGAACCATCATAACTTTTCGTT CTTGATCAACGAGAACATCCTTGGCAAATGCTTTCGCTTCGGTCCGTCTTGCGACGAT CCAAGAATTTACCTCTAACGTCGCAATACGAATGCCCCGCCTGTCTCCATTAATCA TTACCTCTGGTTCTGAAAACCAACAAAATAGAACCGAGGTCTATTCCATTATTCCAT GCACTAGCATTTCAGGCAATATCCAGCCTGCTTGAAGCACTCTAATTTGTTCAAAGTAA AAGTGCCGACCATTTGACTGATA-3'

En los apéndices B y C de la sección de apéndices se muestra el cuadro de resultados del análisis de la alineación de secuencia local básica (BLAST, por sus siglas en inglés), con los respectivos porcentajes de correspondencia de la secuencia con todas las posibilidades disponibles con las que presenta similitud, así como la secuencia alineada con la cual tuvo un 98% de correspondencia. Como se puede ver, todas las correspondencias son con el gen 18S de insectos, esto debido a que el gen 18S es un gen constitutivo, es decir, está expresado en todas las células porque provee funciones básicas para el mantenimiento de las células. Debido que se trata de un gen constitutivo la expresión de su ARN es abundante, siendo un gen que se encuentra en todas las células del insecto. La competencia que presenta el ARN del gen 18S con el ARN correspondiente a TSWV es demasiado fuerte, así que si los iniciadores presentan un anillamiento inespecífico, es muy probable que se amplifiquen más copias del fragmento correspondiente al gen 18S que el fragmento correspondiente al virus.

Con base en este análisis, se pudo concluir que el par de iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004) no son adecuados para su uso en la detección de TSWV en el insecto vector Trips, Thripidae (Thysanoptera), ya que presentan un anillamiento y amplificación inespecífica con un fragmento de ARN correspondiente a un gen constitutivo del insecto, el gen 18S.

Se utilizó el programa de computadora FastPCR para realizar el análisis de la predicción de posibles productos de PCR a partir de los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004) en el gen 18S ribosomal de *Frankliniella* sp. En el cuadro 10 se puede ver el resultado de los sitios donde era posible que se anillaran los iniciadores y sus respectivos productos de PCR.

Cuadro 10: Secuencia del gen 18S ribosomal de *Frankliniella* sp. y el análisis de posibles anillamientos inespecíficos de los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004).

Número de acceso a secuencia en GenBank: gi54399805

```

agtccgaagacctcactaaatcattcaatcggtagtagcgacggcggtgtgtacaaggcgaggacgtaatcaaggcgtgctaatgacacgcctttactg
ggaattcctcgttcatggggaacaattcaagcccaatccaagcacgaaggtgttcagcgggttaccggacctttcgccaggaggacacgctgata
ccttcattgtagcgcgctgcggccagaacatctaaggcattcacagacctgtattgtcaatctcgtcggcctaagccgcctgtccctctaagaagatt
tgtcttcgccggatgcaacaaaggaatccggaacgactagttagcaggctagagtctcgttcgttatcgaattaagcagacaaatgctccaccaactaag
aacggccatgcaccaccaccactgaatcaagaaagagctctcaatctgtcaatcctccagtgccggcctggtgaggttcccggttgtagtcaaatgaag
ccgagggctccactcctggtggtgccTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAACCATACTtccccggaa
tcaaaaactttggttcccggaagctgcccgataaggcataaaaagaacctttatcggatggctagtcaacatcgtttatggttagaactaggcggatctgat
cgcttcgaacctetaacttctgttctgateaacgagaacatccttgcaaatgcttfcgcttcggctcgttctgcgacgatccaagaattcaccttaacgtcg
caatacgaatgccccgcctgtctccattaatcattacctctggttctgaaaaccaaaaaatagaaccgaggtcctattccatttccatgcactagcattcag
gcaatatccagcctgcttgaagcactcTAATTTGTTCAAAGTAAACGtgccggcccacctcgacactcaatgaagagcaccgagacg
gattgaatggcgccccaacgctccgaagaacgacgtagacacgccaccggcaggacgtccgcacgcgtcagtttgacaccgtcggcggtga
accgacggtgcgggacacagatccaactacgagcttttaaccgcaacaactttatatacgtattggagctggaattaccgcgctgctggcaccagacT
GCCCTCAATTGATACTCCttaaaggattaaagttagtattccgattaccgggacctcggatagctccgctatcgttatcttctgactactc
ccccgagccggagtggtgaattgctgcgctgctgctccttcttgatgtgtagccgttctcaggctccctcctccggaatcgaacctgattccccgttacc
cgttacaacatggtaggcgcagaacctaccatcgacagttgataaggcagacatttgaagatgctcgcggcaccgagggcgtcgtcagcccaaa
gttattcagagtcaccaagtagacgatggccgaaccaccgattggtttgatctaataaaagcgtccctccgtcggcggactcgttggcatgtatta
gctccagatttccgagttatccatgtaactgaagtacgatctattgaaccataactgatataatgagccttcggggttacccttaattggctgacttagac
atgcatggcttaattcttg

```

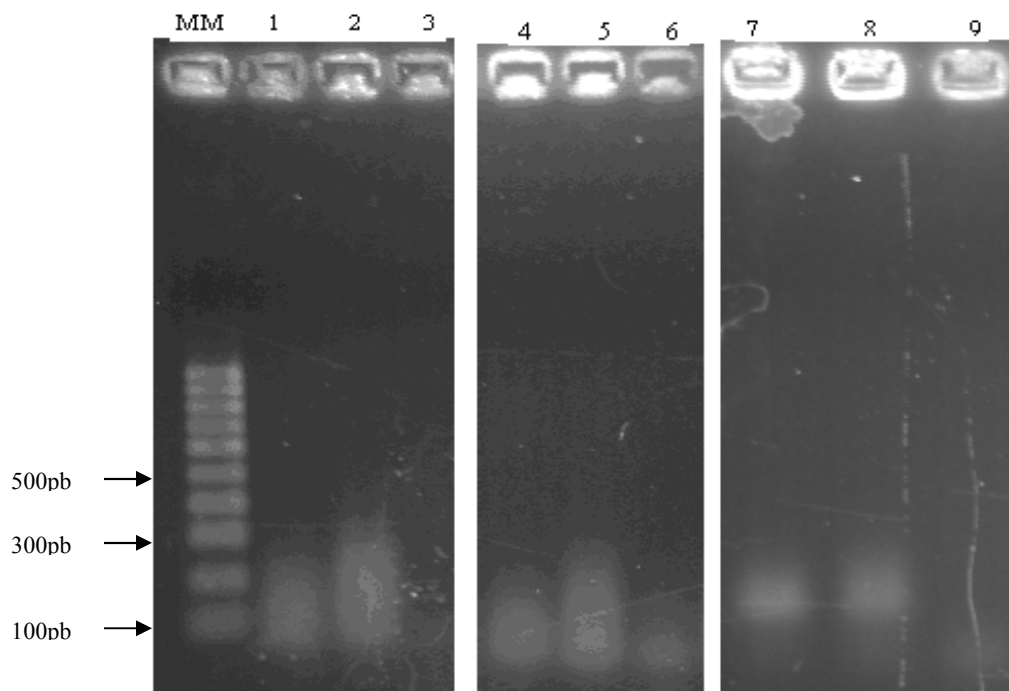
Como se puede ver en el cuadro 10, los iniciadores se pueden unir en varios sitios de la secuencia. Estos sitios están marcados con letras mayúsculas dentro de la secuencia. A su vez, se encuentra resaltado el fragmento de amplificación, producto de la RT-PCR que fue secuenciado y que se mostró anteriormente en el cuadro 9. Franqueando esa región se encuentran tres posibles sitios de anillamiento de los iniciadores, sin embargo, según el análisis por FastPCR, los sitios que han sido resaltados con negrita presentan un mayor porcentaje de complementariedad (ver apéndice D de la sección de apéndices) con los iniciadores L1 y L2. La primera región resaltada en negrita presenta un 50% de complementariedad con el iniciador L2, mientras que la segunda región resaltada en negrita presenta un 60% de complementariedad con el iniciador L1. Basándose en dicho análisis, se puede decir con bastante certeza, que los iniciadores se anillan inespecíficamente al gen 18S ribosomal de insecto en las regiones que fueron resaltadas con negrita en el Cuadro 10, y que el producto de amplificación de la RT-PCR es por consiguiente el producto correspondiente al que está resaltado en la secuencia del Cuadro 10 y que corresponde al producto que se obtuvo y fue secuenciado en el laboratorio.

A partir de los resultados que se obtuvieron con el par de iniciadores L1 y L2 para TSWV en insectos, se decidió realizar la estandarización del RT-PCR con otro par de iniciadores específicos para TSWV. Se realizaron pruebas para estandarizar el RT-PCR utilizando los iniciadores S1983 y S2767 (sentido y antisentido, respectivamente) propuestos por Naidu *et al.* (2004) que amplifican un fragmento del segmento de ARN S de TSWV (aproximadamente 790pb). Estas pruebas consistieron en la utilización del kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences, 2003) para llevar a cabo la reacción en un paso y la utilización del kit RT-PCR Systems® (Promega, 2009) para realizar la reacción en dos pasos.

Las pruebas para estandarizar la RT-PCR en un paso, únicamente consistieron en la utilización de distintas concentraciones de ARN molde extraído de trips infectados en el laboratorio, debido a que el kit contiene una mezcla de reacción estándar con los reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-PCR. Después de llevar a cabo varias pruebas, se determinó que no era posible detectar el TSWV en el insecto, bajo las condiciones del laboratorio. En la Figura 9 se muestra un gel de agarosa mostrando los resultados de las pruebas de RT-PCR en un paso, utilizando el kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences 2003) con distintas concentraciones de ARN molde.

Como se puede ver en la Figura 9, no se obtuvo ningún producto de amplificación de RT-PCR con ninguna de las concentraciones de ARN (55.8, 83.8 y 139.6 ng/ul) que se probaron. Se esperaba obtener un producto de aproximadamente 790pb, sin embargo, no se obtuvo ningún fragmento amplificado.

Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en un solo paso con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100 pb. Carril 1-3: Resultado de prueba con 55.8 ng/ul de ARN. Carril 4-6: Resultado de prueba con 83.8 ng/ul de ARN. Carril 7-9: Resultado de prueba con 139.6 ng/ul de ARN.

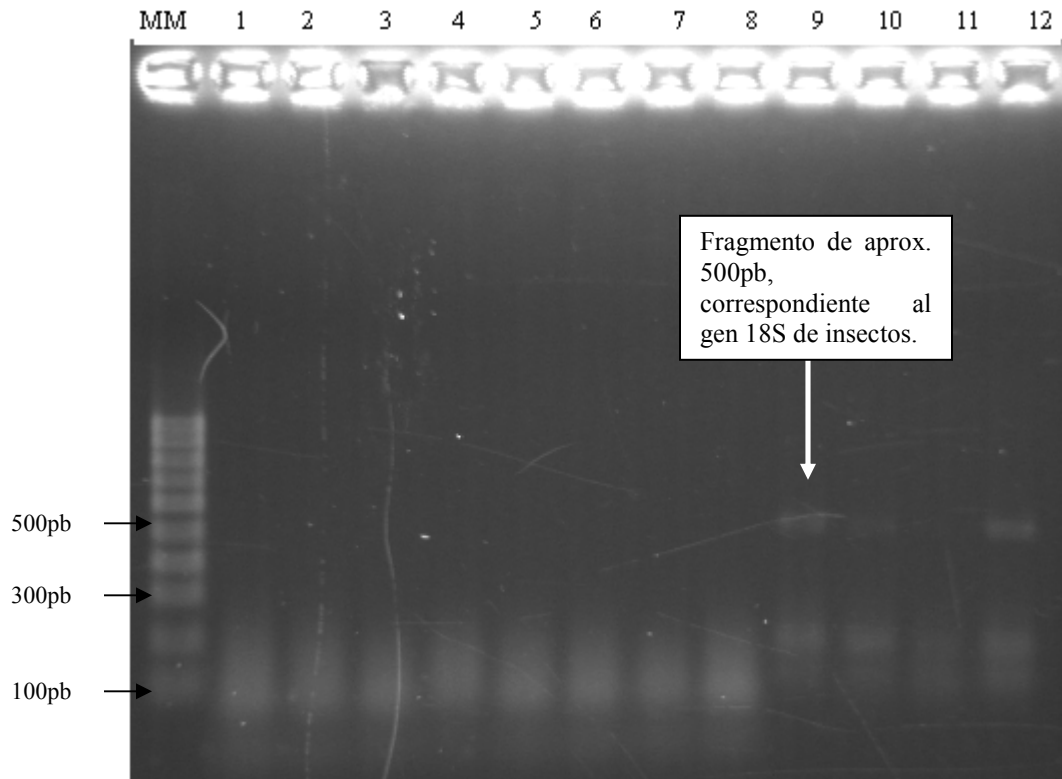


En algunas ocasiones, las altas concentraciones de ARN molde, interfieren en la amplificación por PCR provocando una inhibición de la misma. Generalmente se utilizan concentraciones de 20 a 50 ng/ul de ARN molde, mientras que en este caso se utilizaron concentraciones de 55 a 140 ng/ul de ARN, por lo que los resultados negativos, pueden estar relacionados a una inhibición por exceso de ARN molde en la reacción. Por esta razón se probó concentraciones menores de ARN y además, se realizó una verificación de integridad de ARN, por medio de la utilización de iniciadores para control interno de extracción (18S417 y 18S920c, sentido y antisentido respectivamente) el cual amplifica un fragmento de aproximadamente 450 a 504 pb correspondiente al gen constitutivo de insectos 18S de ARNr. En la Figura 10 se muestra un gel de agarosa, donde se muestran los resultados de estas pruebas de RT-PCR en un paso.

Como se puede ver en la Figura 10, no se obtuvo ningún producto de amplificación por RT-PCR correspondiente a TSWV (aproximadamente 790 pb). Sin embargo, sí se obtuvo un fragmento de aproximadamente 500 pb correspondiente al producto esperado por la amplificación del fragmento del gen constitutivo 18S que es el control interno y sirve para verificar integridad y presencia de ARN en la

extracción. Este resultado significa que las extracciones sí contienen ARN en condiciones bastante íntegras, ya que es posible amplificar y obtener fragmentos específicos de ADNc por medio de la RT-PCR.

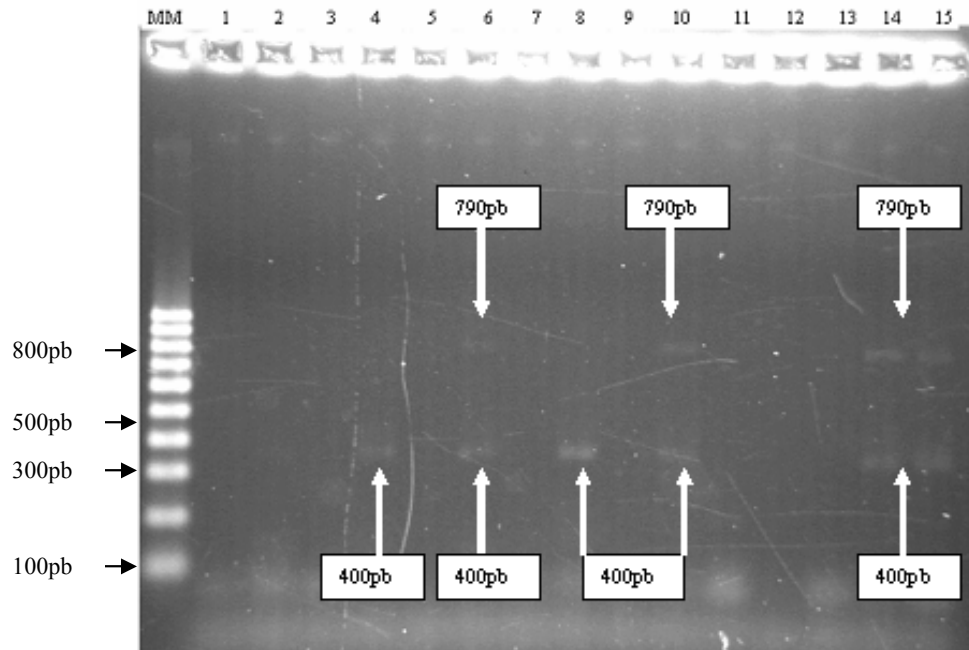
Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en un solo paso con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente) y 18S920c y 18S417 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100 pb. Carril 1-4: Resultado de prueba con 17.5 ng/ul de ARN. Carril 5-8: Resultado de prueba con 23 ng/ul de ARN. Carril 9-12: Resultado de prueba con control interno 18S.



Con base a los resultados anteriores, se concluyó que no era posible realizar la detección de TSWV por medio de una RT-PCR en un paso, bajo las condiciones del laboratorio. Por lo cual, se procedió a realizar pruebas para estandarizar la detección del virus utilizando el kit RT-PCR Systems® (Promega, 2009) por una reacción en dos pasos.

Se utilizaron condiciones poco astringentes para la reacción de transcripción reversa (RT) y PCR, para promover la amplificación, para luego cambiar las condiciones y volver la reacción más específica. La reacción inicial de PCR contenía una concentración de 2.5 mM de $MgCl_2$, lo cual es una concentración bastante alta y genera una condición de reacción poco astringente. En la Figura 11 se muestra la fotografía del gel de agarosa, mostrando el resultado de esta prueba.

Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100 pb. Carril 1: Muestra negativa. Carril 2: Muestra negativa. Carril 3: Muestra negativa. Carril 4: Muestra negativa. Carril 5: Muestra negativa. Carril 6: Muestra positiva. Carril 7: Muestra negativa. Carril 8: Muestra negativa. Carril 9: Muestra negativa. Carril 10: Muestra positiva. Carril 11: Muestra negativa. Carril 12: Muestra negativa. Carril 13: Muestra negativa. Carril 14: Muestra positiva. Carril 15: Muestra positiva.

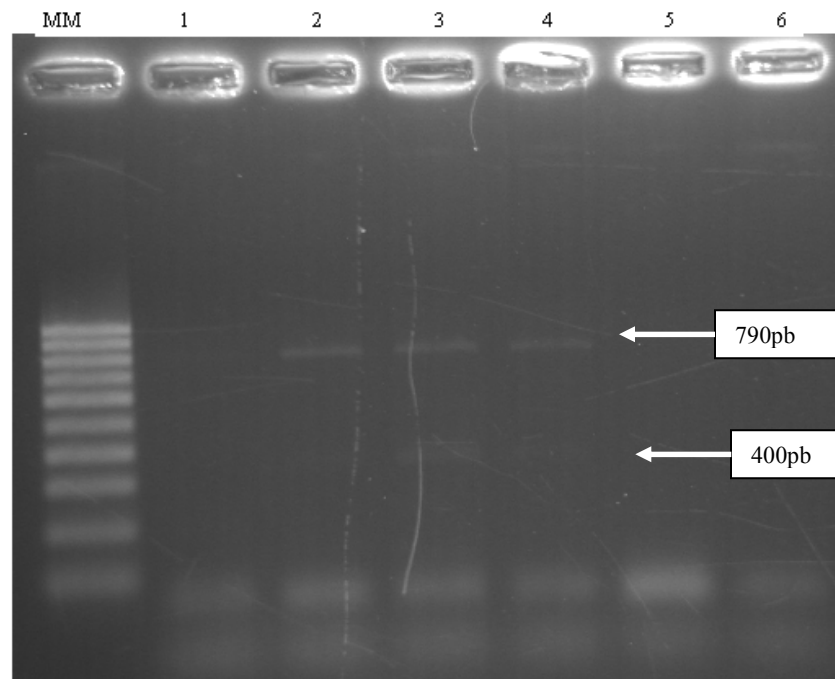


Como se puede ver en la Figura 11, se obtuvieron cuatro muestras que presentaron un producto de amplificación de aproximadamente 790 pb el cual es el tamaño de producto reportado por la literatura para el par de iniciadores utilizados en la detección de TSWV. Sin embargo, se obtuvo un producto adicional de aproximadamente 400 pb. Este producto no es esperado, y se puede deber a una amplificación inespecífica. La razón por la cual pudo haberse dado una amplificación inespecífica es la concentración de $MgCl_2$ que se utilizó en la reacción, ya que el magnesio (Mg^{++}) es un cofactor de la enzima Taq polimerasa, al estar en altas concentraciones se promueve en mayor grado la actividad de la enzima y, por consiguiente la posibilidad de obtener productos de amplificación inespecíficos.

Es importante notar que el producto de PCR no esperado, se obtuvo tanto en muestras positivas (con producto de 790 pb) como en muestras negativas, lo cual indica que la amplificación inespecífica se da tanto en muestras con TSWV como en muestras sin TSWV. Este resultado se puede explicar como una amplificación de un fragmento de ARN del insecto, debido a la baja astringencia de la reacción.

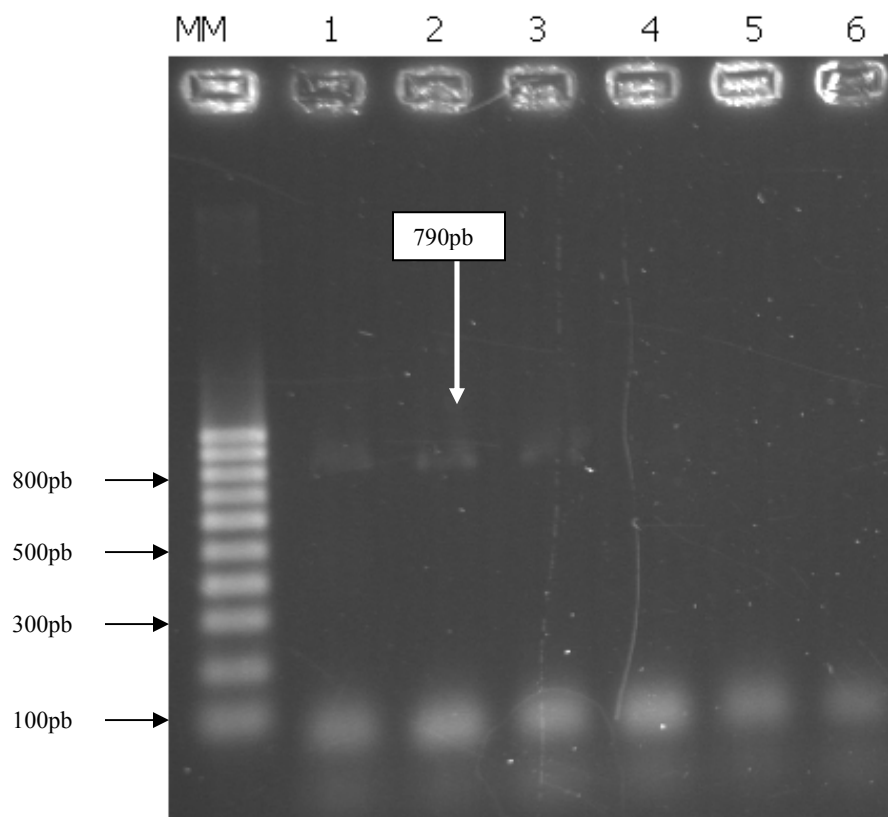
Para tener una reacción más astringente, se modificó la concentración de $MgCl_2$ de 2.5 mM a 1.8 mM, utilizando las cuatro muestras que habían dado un resultado positivo (producto de 790 pb) en la reacción anterior. En la Figura 12 se muestra el resultado de esta prueba de PCR.

Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100 pb. Carril 1: Muestra positiva (6). Carril 2: Muestra positiva (10). Carril 3: Muestra positiva (14). Carril 4: Muestra positiva (15). Carril 5: Control negativo de RT. Carril 6: Control negativo de PCR.



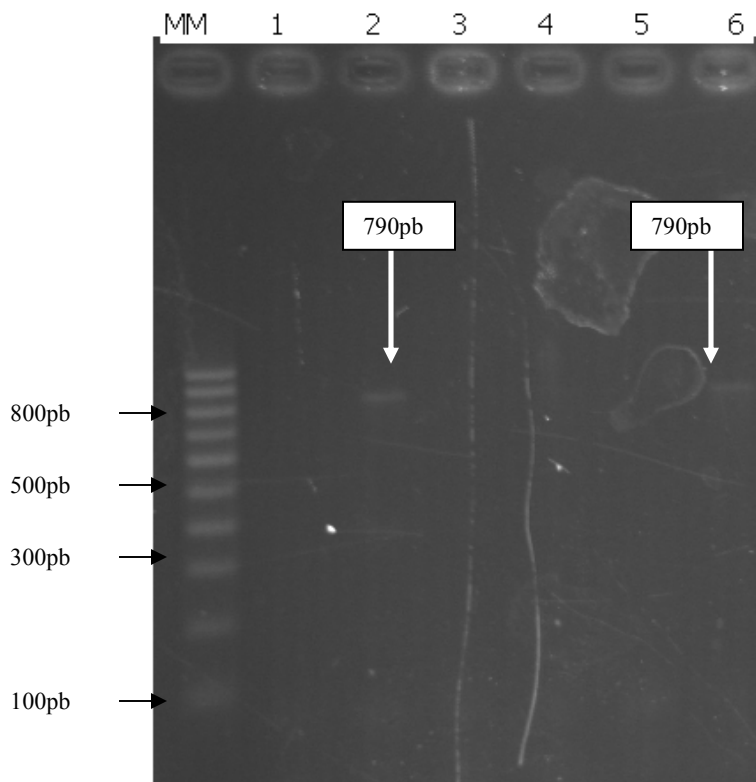
Como se puede ver en la Figura 12, únicamente tres de las cuatro muestras que habían dado un resultado positivo para TSWV brindaron un fragmento de 790 pb en la reacción de PCR con 1.8 mM de $MgCl_2$. Es probable que no se haya amplificado debido a una degradación del ADNc correspondiente a la muestra, o a una baja concentración del ADNc molde. La disminución de la concentración de Mg^{++} en la reacción, logró disminuir la cantidad de muestras con amplificación inespecífica, ya que de las cuatro muestras que habían presentado un fragmento inespecífico de 400 pb, únicamente una presentó amplificación de dicho fragmento. Así que con base en este resultado, se decidió realizar reacciones de PCR disminuyendo la concentración de Mg^{++} . En la Figura 13 se muestra el resultado de la PCR con concentraciones de 1.16, 0.83, 0.66, 0.50, 0.33 y 0.16 mM de $MgCl_2$.

Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100pb. Carril 1: Concentración de 1.16 mM MgCl₂. Carril 2: Concentración de 0.83 mM MgCl₂. Carril 3: Concentración de 0.66 mM MgCl₂. Carril 4: Concentración de 0.50 mM MgCl₂. Carril 5: Concentración de 0.33 mM MgCl₂. Carril 6: Concentración de 0.16mM MgCl₂.



Como se puede ver en la Figura 13, no se obtuvo ningún producto de amplificación inespecífico de 400 pb con concentraciones de Mg⁺⁺ de 1.16 a 0.16 mM. Sin embargo, el fragmento de interés de 790pb, correspondiente a TSWV, únicamente se obtiene con 1.16, 0.83 y 0.66 mM de MgCl₂. Se decidió generar una condición más astringente, por lo que se realizaron pruebas para detectar el virus con una concentración de 0.55 mM de MgCl₂. En la Figura 14 se puede ver el resultado de dos muestras positivas, donde se obtuvo únicamente el producto de amplificación de 790pb. Con este resultado se pudo concluir que la estandarización de la RT-PCR había sido completada para la detección de TSWV en el insecto vector trips, Thripidae (Thysanoptera).

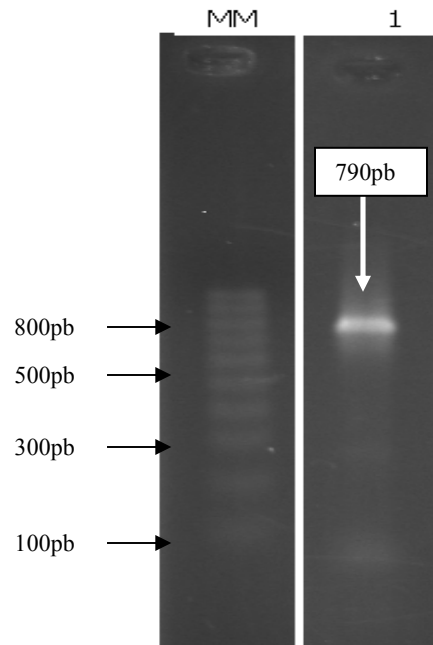
Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100pb. Carril 1: Muestra negativa. Carril 2: Muestra positiva. Carril 3: Muestra negativa. Carril 4: Muestra negativa. Carril 5: Muestra negativa. Carril 6: Muestra positiva.



Una vez estandarizada la técnica, se realizaron pruebas para optimizar la técnica de detección. Se prestó mayor interés a la optimización del tiempo requerido para la detección del virus, ya que requería mucho tiempo debido a que la reacción se realiza en dos pasos. Después de la fase de RT el ADNc era purificado y precipitado a -20°C durante más de dos horas. Por esta razón se probó realizar la fase de PCR a partir de ADNc sin purificar, extraído a partir de la misma mezcla de reacción de la RT. En la Figura 15 se muestra una fotografía de la prueba realizada para optimizar el tiempo de la detección de TSWV por medio de la RT-PCR.

La Figura 15 demuestra que sí es posible realizar la detección del virus a partir de 2 μl de la mezcla de reacción de la RT. Se obtuvo un producto de amplificación de 790 pb correspondiente a TSWV. Con este resultado se pudo optimizar el tiempo requerido para la detección, ya que no es necesario esperar más de dos horas para purificar y precipitar el ADNc.

Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de la prueba de la RT-PCR en dos pasos con iniciadores S2767 y S1983 (antisentido y sentido respectivamente). MM: escalera de marcador molecular de 100 pb. Carril 1: Fragmento de 790 pb a partir de ADNc no purificado.



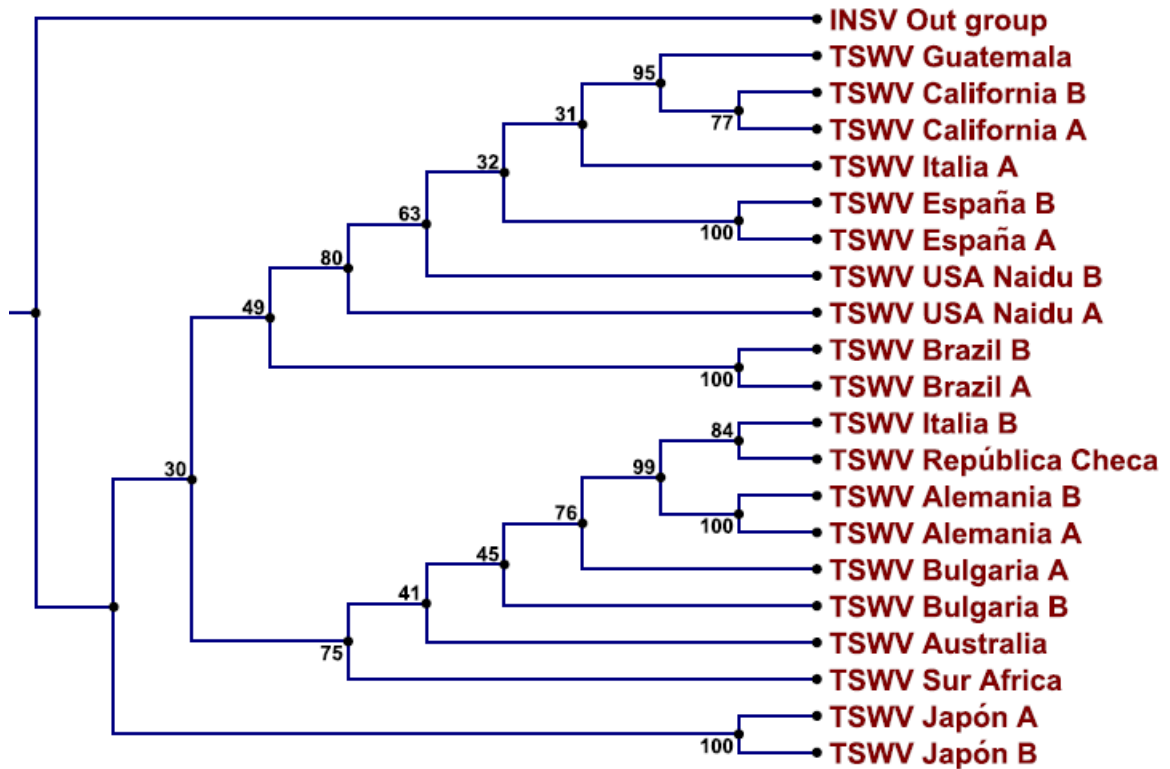
Como se puede ver en la Figura 15, al realizar la PCR directamente después de la fase de RT sin purificar el ADNc, se obtuvo un producto de amplificación de 790 pb. El tamaño de este producto es exactamente del tamaño reportado por la literatura para el par de iniciadores utilizados. Con este procedimiento fue posible optimizar el tiempo de corrida de las muestras, ya que se ahorran más de dos horas de purificación y precipitación del ADNc, previo a la corrida de la PCR.

B. Comparación de las secuencias obtenidas correspondientes a TSWV con otras secuencias reportadas en GenBank.

Como se puede ver en la Figura 16, al comparar la secuencia del TSWV presente en Guatemala con otras secuencias de TSWV reportadas en el GenBank, se encontró que el virus de Guatemala se relaciona más a las cepas de TSWV reportadas de California, Estados Unidos. Es muy probable que ésta sea la procedencia del TSWV de Guatemala. A su vez, el dendrograma presenta ciertas tendencias, ya que se pueden distinguir tres grupos distintos. Se puede ver una separación de un grupo de secuencias de TSWV reportadas en el Nuevo Mundo (Guatemala y Estados Unidos). Aunque también se encuentran cercanamente relacionadas a algunas cepas reportadas en algunos lugares de Europa. También hay otro grupo correspondiente exclusivamente a cepas reportadas en el Viejo Mundo (Europa) y otro grupo muy diferente a estos dos

grupos anteriores, correspondiente a cepas de TSWV reportadas en Japón. La posible explicación por la cual las cepas de Japón puedan ser tan diferentes de las otras es debido a que Japón es una isla. Es muy probable que una cepa del virus llegó ahí y éste ha estado mutando y cambiando en total aislamiento del resto del mundo.

Figura 16: Árbol filogenético de las comparación de secuencias de cepas de TSWV reportadas en GenBank en distintas regiones del mundo y la secuencia reportada para Guatemala.



IV. CONCLUSIONES

- El método de extracción de Frohlich *et al.* (1999) fue el más efectivo para la extracción de ARN de trips, ya que se obtuvo mayores concentraciones y fue únicamente con este método de extracción que fue posible detectar TSWV por medio de RT-PCR.
- La utilización de los iniciadores L1 y L2 propuestos por la OEPP/EPPO (2004) para la detección de TSWV en pestes en cuarentena presenta un producto de amplificación inespecífico de 450 pb correspondiente al gen constitutivo 18S ribosomal de *Frankliniella* sp.
- El kit Access RT-PCR Systems (Promega 2009) fue más efectivo que el kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences 2003), para la detección de TSWV en insectos trips individuales.
- La detección de TSWV fue más eficiente realizando el RT-PCR en dos pasos con el kit Access RT-PCR Systems (Promega 2009).

V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una fase de purificación con fenol ácido:cloroformo:isopentanol y precipitación con Isopropanol y acetato de amonio para la extracción de ARN en el método de Frohlich *et al.* (1999), para mejorar la pureza y obtener una concentración más cercana a la real.
- Se recomienda llevar a cabo un estudio exhaustivo de los iniciadores a utilizar para la detección de TSWV en el insecto vector trips, ya que pueden presentar reacciones cruzadas con componentes de ARN del insecto, debido a que se encuentra en cantidades mayores que el ARN viral.
- Se recomienda hacer un estudio de la prevalencia de TSWV en las distintas especies de trips, ya que la transmisión y riesgo de infección del virus a los cultivos depende en gran parte de la especie de trips que se encuentra en mayoría dentro de las plantaciones.
- Se recomienda realizar un análisis de la prevalencia de otros tospovirus como INSV y WSMoV en insectos trips, diferenciando y tipificando entre especies de trips.
- Se recomienda hacer pruebas para estandarizar una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa múltiplex para la detección simultánea de varios tospovirus (TSWV, INSV, WSMoV).

VI. LITERATURA CITADA

- Adkins, S. 2000. *Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success*. Molecular Plant Pathology 1(3):151-157.
- Amersham Biosciences. 2003. *Ready-to-Go RT-PCR Beads*. Alemania. 24 pp.
- Ananthkrishnan, T. N. y R. S. Annadurai. 2007. *Thrips-Tospovirus interactions: Biological and molecular implications*. Current Science 92(8):1083-1086.
- Ávila *et al.* 2006. *Evaluation of Frankliniella bispinosa (Thysanoptera: Thripidae) as a vector of the tomato spotted wilt virus in pepper*. Florida entomologist 89(2):204-207.
- De Borbón, C. M., O. Gracia y R. Piccolo. 2006. *Relationships between Tospovirus incidence and Thrips populations on tomato in Mendoza, Argentina*. Journal of Phytopathology 154:93-99.
- Baldwin *et al.* 2001. *A regional study to evaluate tillage, row patterns, in-furrow insecticide and planting date on the yield, grade and tomato spotted wilt virus incidence of the Georgia Green peanut cultivar*. Proc. Annual Southern Conserv. Tillage Conf. Sustain. Agric. 24:26-34.
- Boonham *et al.* 2001. *The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real-time fluorescent RT-PCR (TaqMan)*. Journal of virological Methods 101:37-48.
- Broughton, S., R. Jones y B. Coutts. 2004. *Management of thrips and tomato spotted wilt virus*. Government of Western Australia, Department of Agriculture Farmnote No. 69/2004.
- Brown, T.A. 2001. *Gene cloning and DNA analysis*. Cuarta Edición. Editorial Blackwell Science. Estados Unidos. 363 pp.
- Chatzivassiliou *et al.* 1999. *Transmission of tomato spotted wilt tospovirus by Thrips tabaci populations originating from leek*. Plant pathology 48:700-706.
- Culbreath, A., J. W. Todd y S. L. Brown. 2003. *Epidemiology and Management of Tomato Spotted Wilt in Peanut*. Annual Review of Phytopathology 41:53-75.

- De la Torre *et al.* 2002. *Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV)*. Ensayo en Agrociencia 36:211-221.
- EPPO/CABI. 1997. *Tomato spotted wilt torpovirus in: Quarantine pests for Europe*. Segunda edición, 1379-1387 pp.
- Filho *et al.* 2002. *Dynamics of Tomato spotted wilt virus replication in the alimentary canal of two thrips species*. Phytopathology 92:729-733.
- Frohlich *et al.* 1999. *A phylogeographic analysis of the Bemisia tabaci species complex based on mitochondrial DNA markers*. Molecular Ecology 8:1593-1602.
- Granval de Millán, N. y O. Gracia. 1999. *El género Tospovirus y su importancia en la horticultura*. Avances en Horticultura, edición on-line 4(1):1-23.
- Hernández Sampieri, R. 2006. *Metodología en la investigación*. 4ª edición. McGraw-Hill interamericana. México. 763 pp.
- Hoffmann *et al.* 2004. *West Nile virus surveillance: A simple method for verifying the integrity of RNA in mosquito (Diptera: Culicidae) pools*. J. Med. Entomol. 4 (4): 731-735
- Hoon Sin *et al.* 2005. *Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus*. PNAS 102(14):5168-5173.
- Janeway *et al.* 2005. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6a. edición, Garland Science, Nueva York, 823 págs.
- Lewin, B. 2006. *Essential genes*. Prentice Hall. Estados Unidos. 608 pp.
- Llamas *et al.* 1998. *Effect of temperatura on symptom expression and accumulation of tomato spotted wilt virus in different host species*. Plant pathology 47:341-347.
- Locali *et al.* 2003. *Development of a molecular tool for the diagnosis of Leprosis, a major threat to Citrus production in the Americas*. Plant Disease 87(11):1317-1321.

- Matsuura *et al.* 2004. *Localization of Tomato spotted wilt virus in Chrysanthemum stock plants and efficiency of viral transmission from infected stock plants to cuttings.* Journal of Phytopathology 152:219-223.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación MAGA. 2008. *Guatemala. Unidad de política e información estratégica: Tomate y ornamentales.* En: <http://www.maga.gob.gt>
- Nagata *et al.* 2002. *Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus.* Journal of General Virology 83:663-671.
- Nagata *et al.* 2004. *The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses.* Plant pathology 53:136-140.
- Naidu, R. A., J. L. Sherwood y C. M. Deom. 2008. *Characterization of a vector-non-transmissible isolate of Tomato spotted wilt virus.* Plant pathology 57(1):190-200.
- Nelson, D. y M. Cox. 2005. *Leninger Principles of biochemistry.* 4a edición, Freeman publishers, New York. 1119 pp.
- Ochoa *et al.* 1999. *Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (Dendranthema grandiflora).* Plant pathology 48:707-717.
- OEPP/EPPO. 2004. *Diagnostic protocols for regulated pests: Tomato spotted wilt tospovirus, Impatiens necrotic spot tospovirus and Watermelon silver mottle tospovirus.* Bulletin OEPP/EPPO 34:271-279.
- Parrella *et al.* 2003. *An update of the host range of tomato spotted wilt virus.* Journal of Plant Pathology 85(4):227-264.
- Salas, Jorge. 2003. *Plantas cultivadas y silvestres hospederas de Thrips tabaci y Thrips palmi (Thysanoptera: Thripidae) en Quíbor, Estado Lara, Venezuela.* Biagro 15(1):47-54.
- Stumpf, C. y G. Kennedy. 2007. *Effects of tomato spotted wilt virus isolates, host plants, and temperature on survival, size, and development time of Frankliniella occidentalis.* Entomologia Experimentalis et Applicata 123:139-147.

- Tsompana *et al.* 2005. *The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome*. *Molecular Ecology* 14:53-66.
- Ullman, D., A. Whitfield y T. German. 2005. *Thrips and tospoviruses come of age: Mapping determinants of insect transmission*. *PNAS* 102(14):4931-4932.
- Whitfield, A., D. Ullman y T. German. 2005. *Tospovirus-Thrips interactions*. *Annual Reviews of Phytopathology* 43:459-489.
- Zar, J. 1996. *Biostatistical analysis*. 3a edición, Prentice Hall, NJ. 865 pp.

VII. APÉNDICES

APÉNDICE A. Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por los métodos de extracción Frohlich *et al.* (1999) y Boonham *et al.* (2001). A_{260} = absorbancia a 260nm, A_{280} = absorbancia a 280nm, A_{320} = absorbancia a 320nm.

Método de extracción	No. de muestra *	A260	A280	A320
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1.1	0.157	0.241	0.023
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1.2	0.155	0.237	0.019
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.1.3	0.119	0.184	0.017
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2.1	0.157	0.242	0.023
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2.2	0.151	0.235	0.019
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.2.3	0.131	0.208	0.012
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3.1	0.137	0.218	0.013
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3.2	0.138	0.217	0.012
Frohlich <i>et al.</i> 1999	1.3.3	0.120	0.190	0.010
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1.1	0.003	0.003	0.002
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1.2	0.003	0.002	0.001
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.1.3	0.004	0.003	0.002
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2.1	0.001	0.001	0.001
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2.2	0.002	0.002	0.001
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.2.3	0.001	0.001	0.001
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3.1	0.009	0.008	0.003
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3.2	0.008	0.008	0.002
Boonham <i>et al.</i> 2001	2.3.3	0.008	0.007	0.002

* Donde el último número (derecha) representa el número de repetición de lectura de cada muestra, el número de en medio representa el número de muestra de cada método de extracción y el primer número (izquierda) representa el método de extracción (1: Frohlich *et al.* (1999), 2: Boonham *et al.* (2001)).

APÉNDICE B: Comparación de secuencias por análisis con Herramienta de alineación de secuencia local básica (BLAST, por sus siglas en inglés).

Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Max ident
AY630445.1	Frankliniella sp. KY-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	619	619	98%
AY744778.1	Pectinariophyes reticulata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	453	453	92%
AY744795.1	Epipyga n. sp. JRC-2004-a 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	448	448	92%
AY744787.1	Cosmoscarta sp. JRC-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	448	448	92%
AY744785.1	Aphrophora cribrata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	448	448	92%
AY744783.1	Aphrophoraalni 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	448	448	92%
Z97587.1	Tettigonia viridissima nuclear 18S rRNA gene (partial)	448	448	92%
U16264.1	Prosapia plagiata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	444	444	91%
EU713459.1	Penalva lateralis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
EU713458.1	Anostostoma sp. OZ1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
EU713455.1	Hemiandrus subantarcticus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
EU713454.1	Aistus sp. NCAL7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
EU713453.1	Deinacrida connectens 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
EU183570.1	Haplaxius skarphion voucher P59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	93%
EU183561.1	Nymphocixia caribbea voucher P154 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	93%
EU183553.1	Haplaxius crudus voucher P49 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	93%
EU183552.1	Haplaxius deleter voucher P48 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	93%
EU183550.1	Melanoliarus vicarius voucher P11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	93%
DQ337169.1	Hydroscaphidae sp. BMNH703455 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	88%
AF423804.1	Pterophylla camellifolia 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY121147.1	Pterophylla camellifolia 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY521867.1	Microcentrum rhombifolium isolate BYU_ACOR010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AF004766.1	Hackeriella veitchi 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	442	442	91%
AY744799.1	Cephus siccifolius 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744798.1	Mahanarva costaricensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744797.1	Evexus n. sp. JRC-2004-e 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744796.1	Evexus n. sp. JRC-2004-r 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744794.1	Aeneolamia contigua 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744791.1	Zulia vilior 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744789.1	Prosapia bicincta 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%
AY744788.1	Liorhina sp. JRC-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	442	442	91%

APÉNDICE C. Alineación de secuencia obtenida con el gen 18S de ARNr de *Frankliniella* sp.

>[gb|AY630445.1|](#) Frankliniella sp. KY-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1734

Score = 619 bits (335), Expect = 2e-174
Identities = 347/352 (98%), Gaps = 4/352 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 2      AGCTGCCCGATAAGGCATAAAAAAGAACCTTTATCGGATGGCTAGCTCAACATCGTTTTAT 61
            |||
Sbjct 1119    AGCTGCCCGATAAGGCATAAAAAAGAACCTTTATCGGATGGCTAG-TCAACATCG-TTTAT 1062

Query 62     GGTTAGAACTAGGGCGGTATCTGATCGCCTTCGAACCATCATAACTTTCGTTCTTGATCA 121
            |||
Sbjct 1061    GGTTAGAACTAGGGCGGTATCTGATCGCCTTCGAACC-TC-TAACTTTCGTTCTTGATCA 1004

Query 122    ACGAGAACATCCTTGCCAAATGCTTTTCGCTTCGGTCCGCTCTTGCGACGATCCAAGAATTT 181
            |||
Sbjct 1003    ACGAGAACATCCTTGCCAAATGCTTTTCGCTTCGGTCCGCTCTTGCGACGATCCAAGAATTT 944

Query 182    CACCTCTAACGTCGCAATACGAATGCCCCCGCCTGTCTCCATTAATCATTACCTCTGGTT 241
            |||
Sbjct 943     CACCTCTAACGTCGCAATACGAATGCCCCCGCCTGTCTCCATTAATCATTACCTCTGGTT 884

Query 242    CTGAAAACCAACAAAATAGAACCGAGGTCCTATTCCATTATTCCATGCACTAGCATTTCAG 301
            |||
Sbjct 883    CTGAAAACCAACAAAATAGAACCGAGGTCCTATTCCATTATTCCATGCACTAGCATTTCAG 824

Query 302    GCAATATCCAGCCTGCTTGAAGCACTCTAATTTGTTCAAAGTAAAAGTGCCG 353
            |||
Sbjct 823    GCAATATCCAGCCTGCTTGAAGCACTCTAATTTGTTCAAAGTAAAAGTGCCG 772

```

APÉNDICE D. Análisis de complementariedad de los iniciadores L1 y L2 con la secuencia del gen 18S ribosomal de *Frankliniella* sp.

In silico Primer(s) search for: >gi|54399805:c1734-1 frankliniella sp. ky-2004 18s ribosomal rna gene, partial sequence

>L2

5'-atcagtcgaaatggtcggca

Position: 1201 <- 1220 20bp 45 % Tm = 4.0°C

<-acggctggtaaagctgacta-5

|||| ||| ||
cttgcctccaattgatactccttaa

>L2

5'-atcagtcgaaatggtcggca

Position: 543 <- 562 20bp 50 % Tm = 4.0°C

<-acggctggtaaagctgacta-5

| ||| ||| | |
ccttccgtcaattcctttaagttca

>L1

5'-aattgccttgcaaccaattc

Position: 563 -> 582 20bp 55 % Tm = 32.2°C

5-aattgccttgcaaccaattc->

|| |||||
caaagtcgaaacgttggtatgaagg

>L1

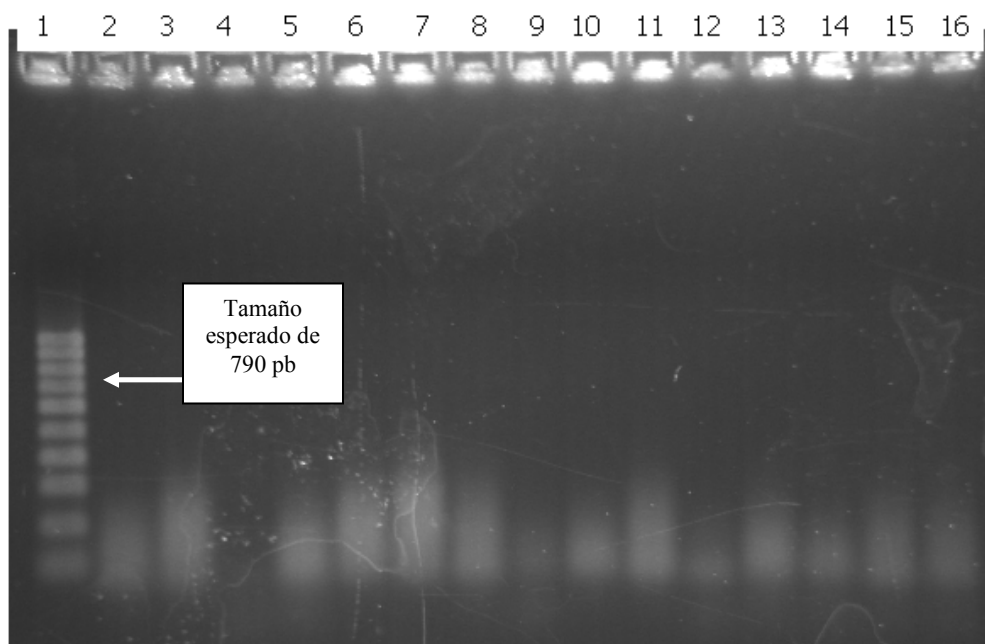
5'-aattgccttgcaaccaattc

Position: 939 <- 958 20bp 60 % Tm = 4.0°C

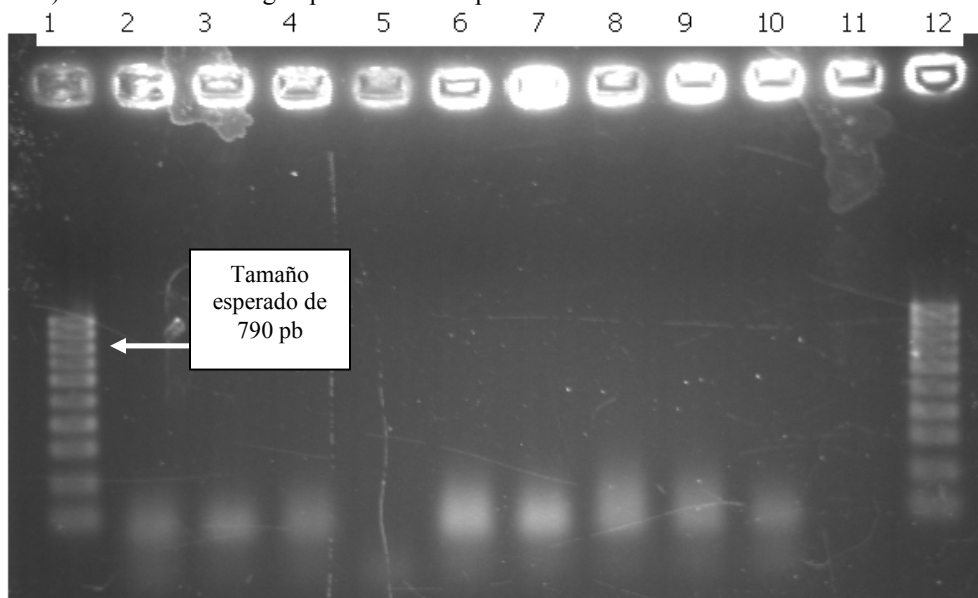
<-cttaaccaacgttccgtaa-5

|||| ||| ||| ||
tctaattgtcaaagtaaactgcc

APENDICE E. Electroforesis en gel de Agarosa de prueba de detección de TSWV utilizando el kit ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences 2003). No se obtuvo ningún producto de amplificación.

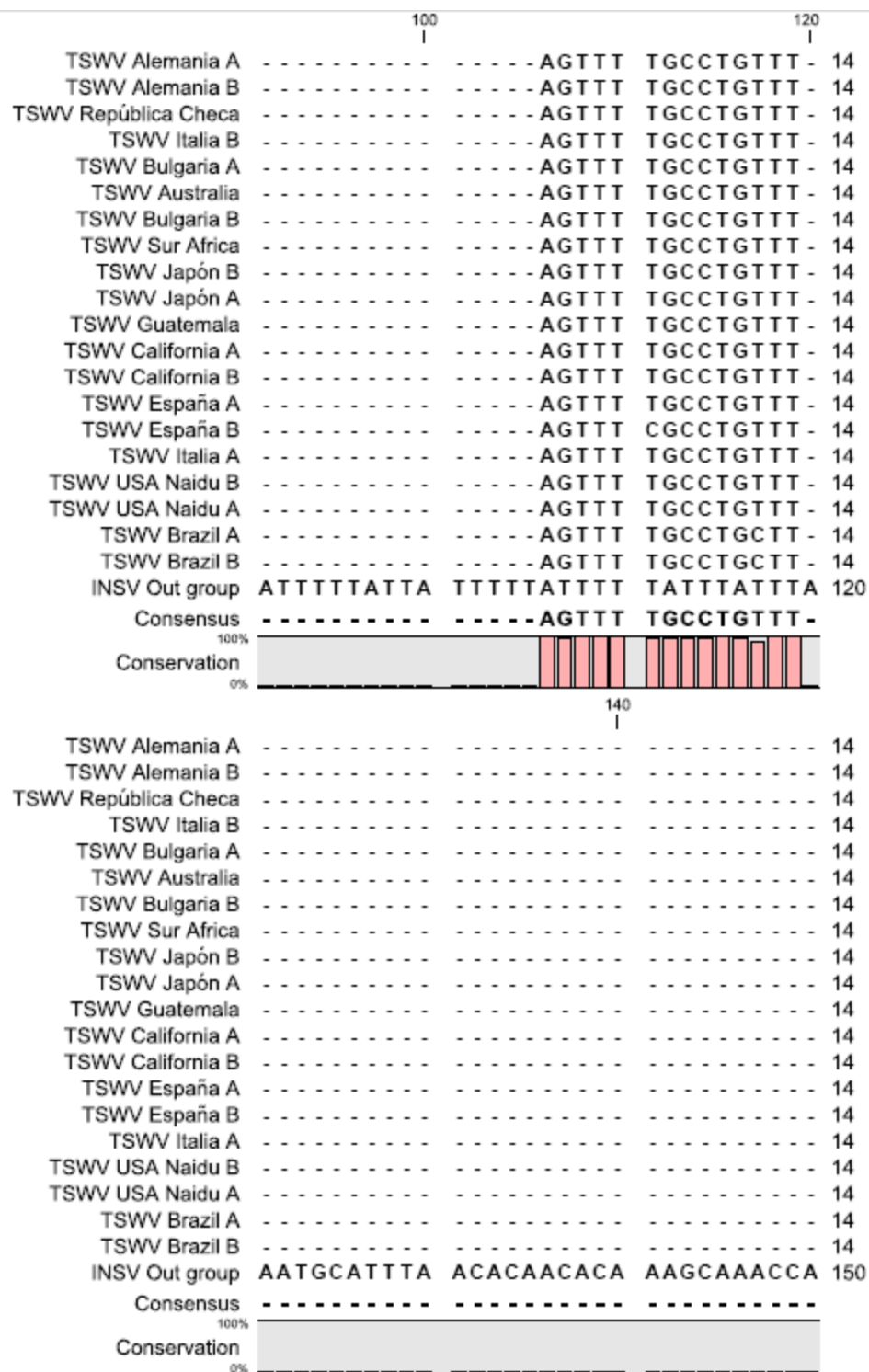


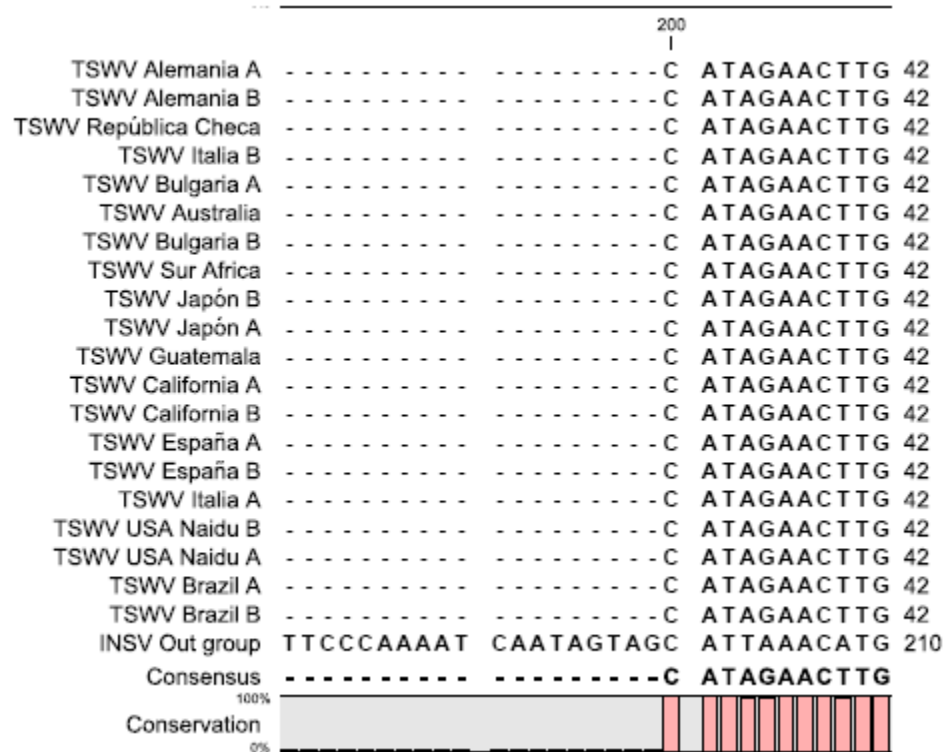
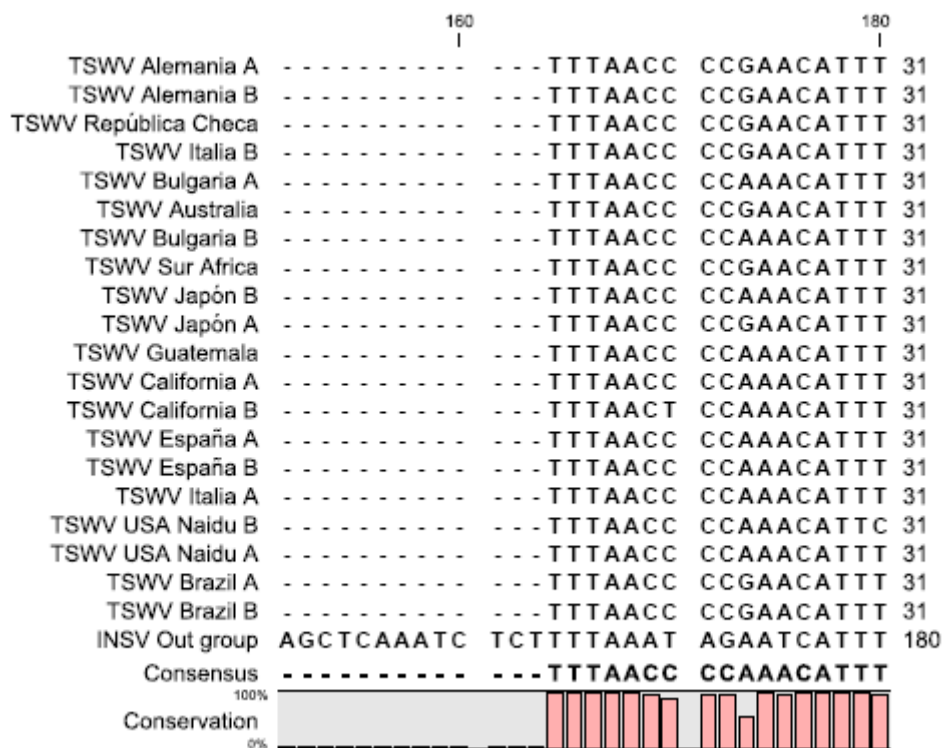
APÉNDICE F. Electroforesis en gel de Agarosa de prueba con el kit Acces RT-PCR Systems (Promega 2009). No se obtuvo ningún producto de amplificación.

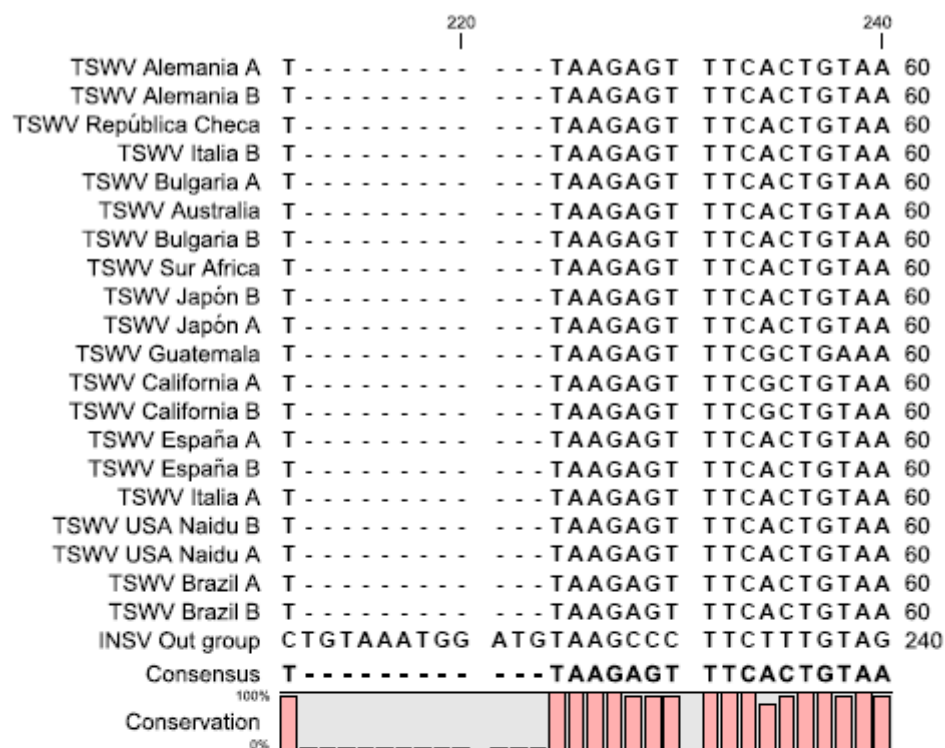


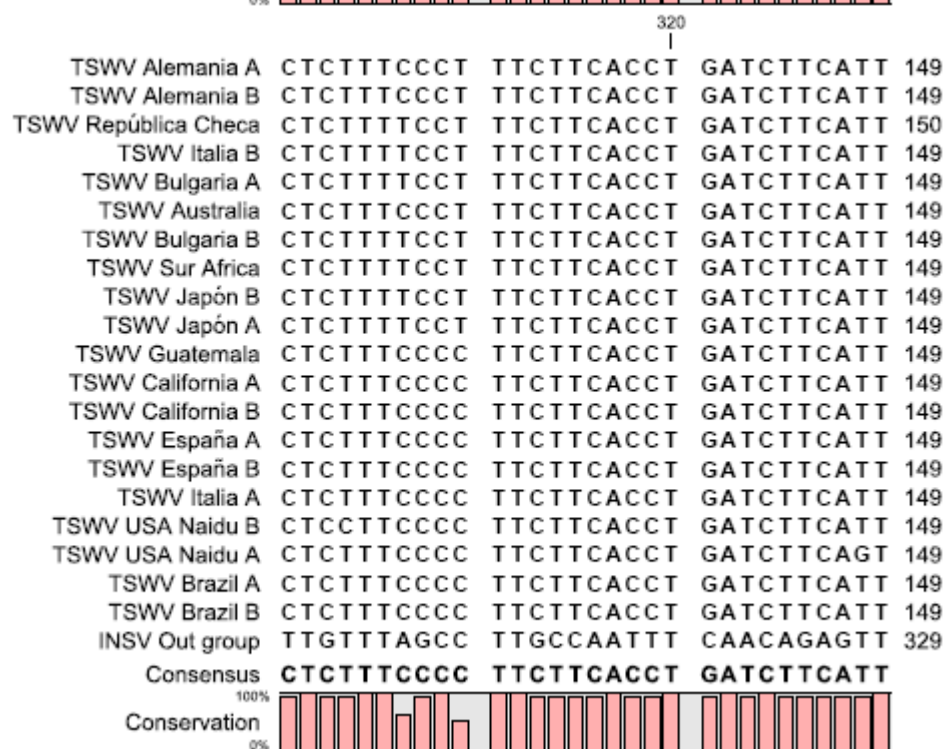
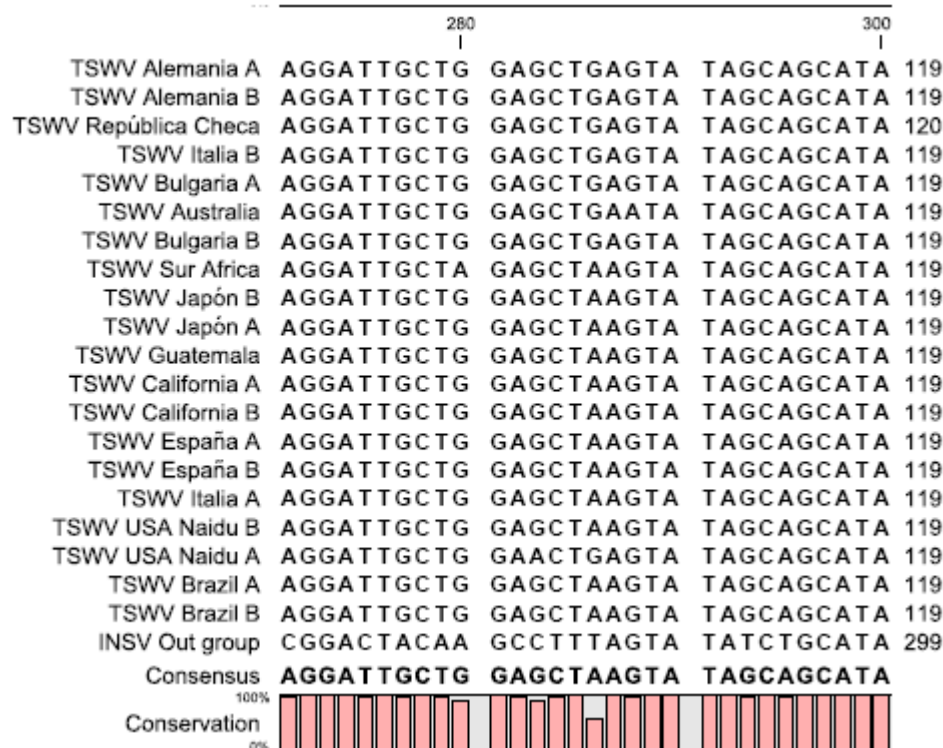
APÉNDICE G. Alineación de secuencias del fragmento de ARN S de TSWV.

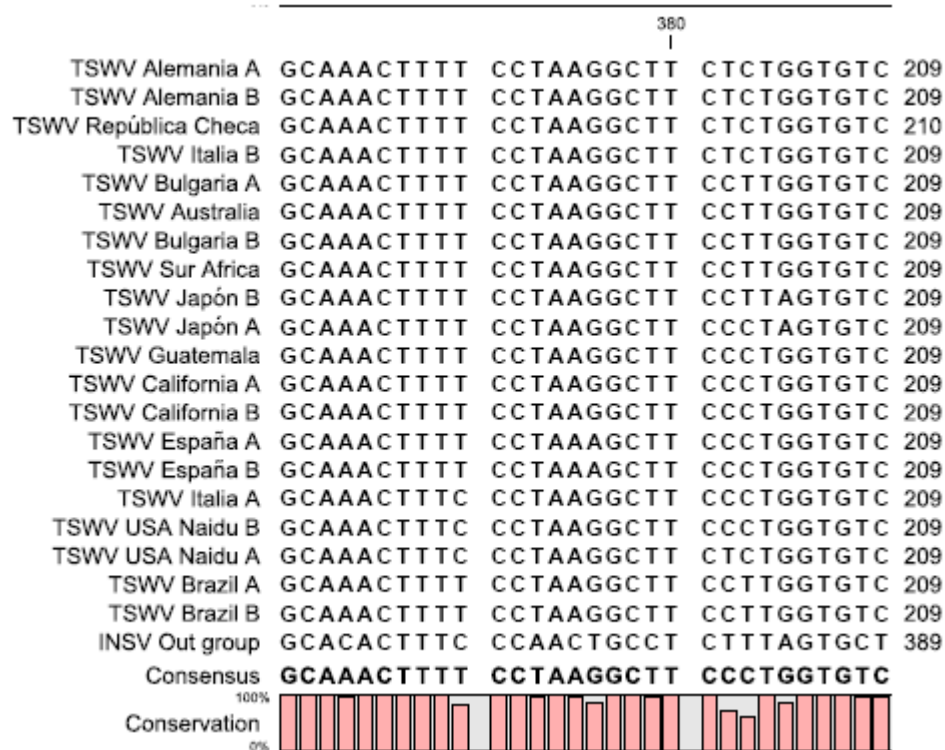
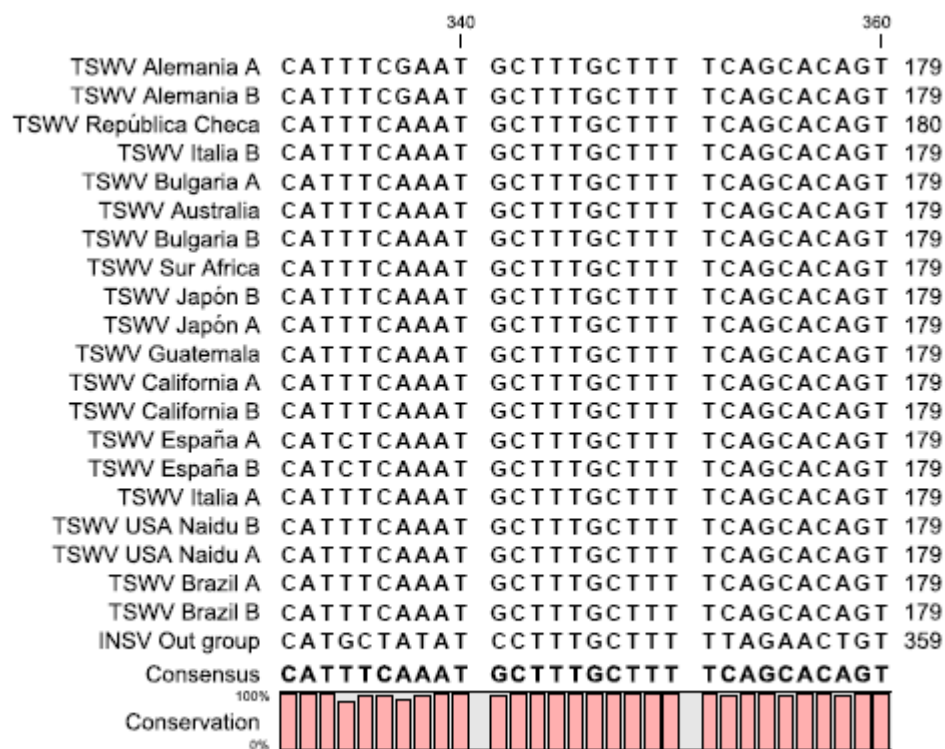
		20	
		1	
TSWV Alemania A	-----	-----	-----
TSWV Alemania B	-----	-----	-----
TSWV República Checa	-----	-----	-----
TSWV Italia B	-----	-----	-----
TSWV Bulgaria A	-----	-----	-----
TSWV Australia	-----	-----	-----
TSWV Bulgaria B	-----	-----	-----
TSWV Sur Africa	-----	-----	-----
TSWV Japón B	-----	-----	-----
TSWV Japón A	-----	-----	-----
TSWV Guatemala	-----	-----	-----
TSWV California A	-----	-----	-----
TSWV California B	-----	-----	-----
TSWV España A	-----	-----	-----
TSWV España B	-----	-----	-----
TSWV Italia A	-----	-----	-----
TSWV USA Naidu B	-----	-----	-----
TSWV USA Naidu A	-----	-----	-----
TSWV Brazil A	-----	-----	-----
TSWV Brazil B	-----	-----	-----
INSV Out group	CACACATTAA	ACTTATTTCA	AATAATTTAT 30
Consensus	-----	-----	-----
Conservation	100%	-----	-----
	0%	-----	-----











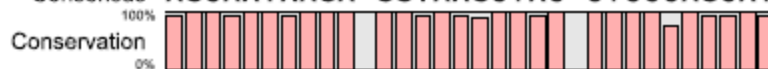
		400		420	
TSWV Alemania A	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Alemania B	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV República Checa	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	240
TSWV Italia B	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Bulgaria A	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Australia	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Bulgaria B	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Sur Africa	ATACTTC	TTT	GGGTCAATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Japón B	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Japón A	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Guatemala	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV California A	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV California B	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV España A	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV España B	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Italia A	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CAAGGTCTTT	239
TSWV USA Naidu B	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV USA Naidu A	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Brazil A	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
TSWV Brazil B	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	239
INSV Out group	AAACTTAGAC		ATGTCAATTC	CAAGCTCAAC	419
Consensus	ATACTTC	TTT	GGGTCGATCC	CGAGGTCTTT	
Conservation					

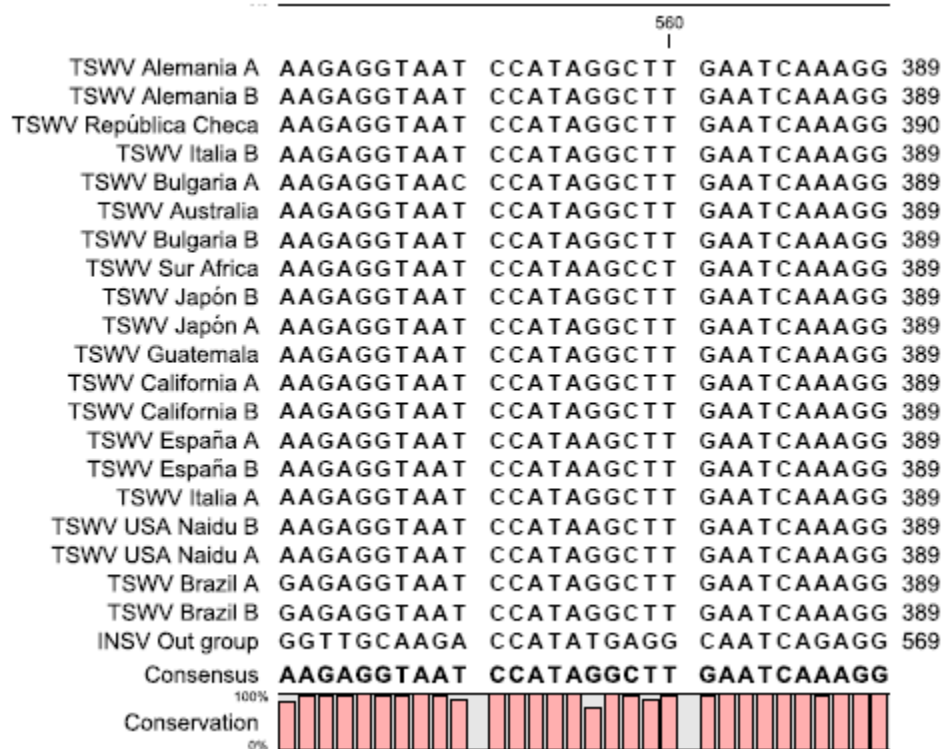
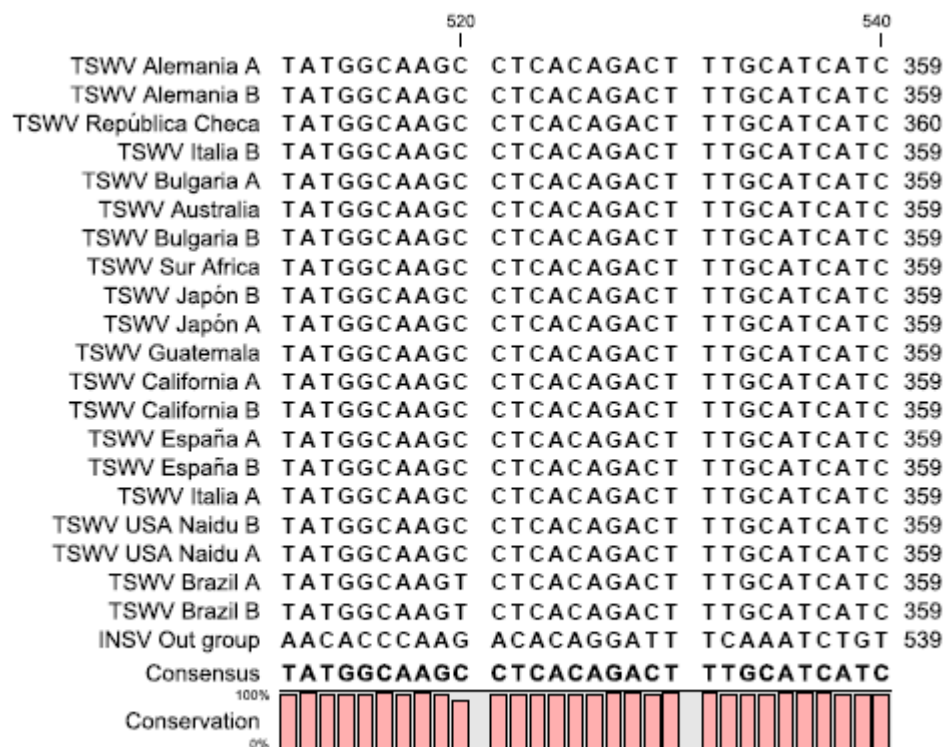
			440		
TSWV Alemania A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Alemania B	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV República Checa	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	270
TSWV Italia B	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Bulgaria A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Australia	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Bulgaria B	TGTATTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Sur Africa	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCTAAGAC	269
TSWV Japón B	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Japón A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Guatemala	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCCAGAC	269
TSWV California A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV California B	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV España A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV España B	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Italia A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV USA Naidu B	ATATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV USA Naidu A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Brazil A	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
TSWV Brazil B	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	269
INSV Out group	ATGTTTAGCA		TCTTGATAAA	TAGCCGGAAC	449
Consensus	GTATTTT	GCA	TCCTGATATA	TAGCCAAGAC	
Conservation					

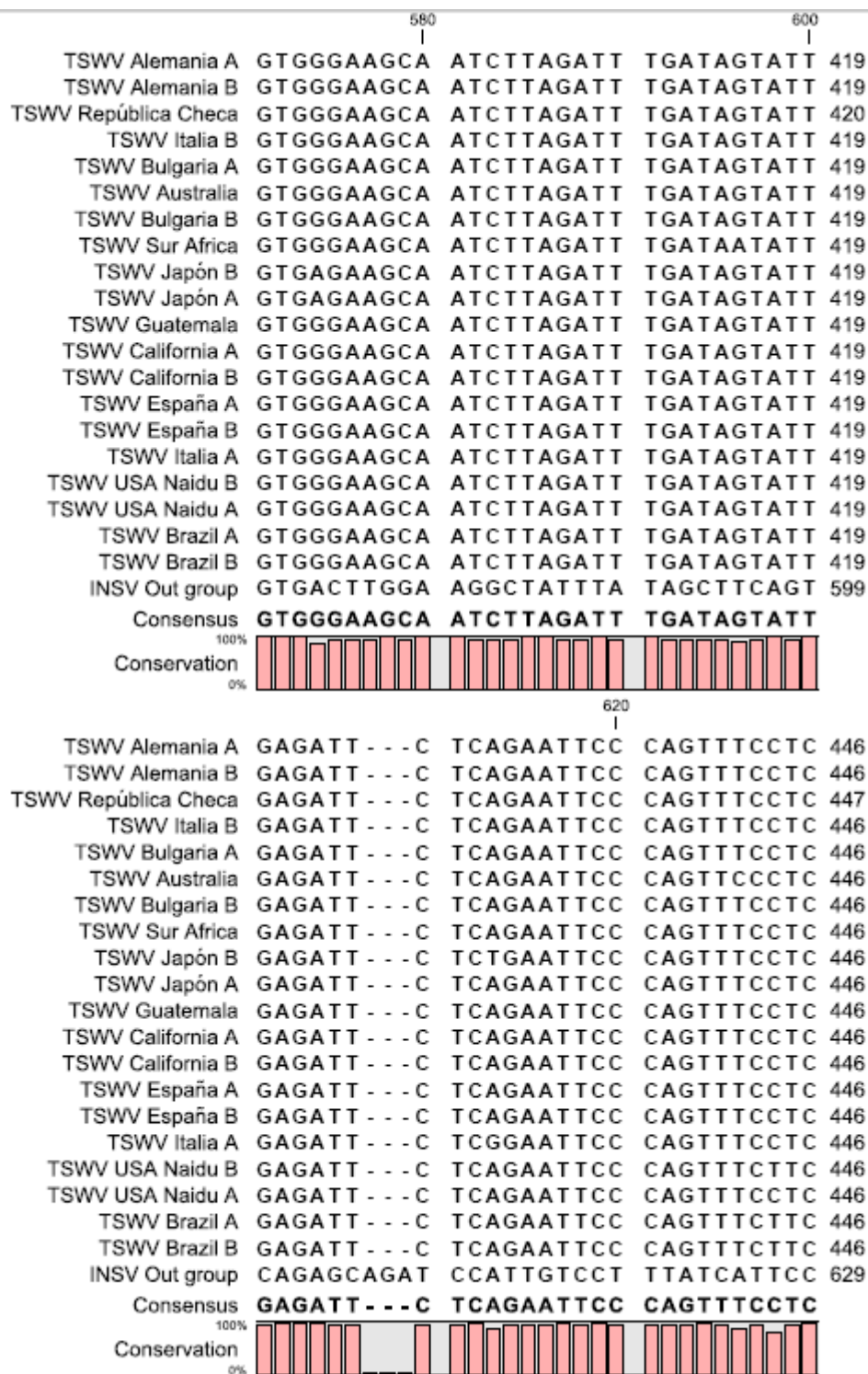
		460		480	
TSWV Alemania A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Alemania B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV República Checa	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	300	
TSWV Italia B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Bulgaria A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Australia	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Bulgaria B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCGACTGA	299	
TSWV Sur Africa	AACACTAATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Japón B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Japón A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Guatemala	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV California A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV California B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV España A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV España B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Italia A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCGACTGA	299	
TSWV USA Naidu B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV USA Naidu A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Brazil A	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
TSWV Brazil B	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA	299	
INSV Out group	TAGTGCAGCT	ATTTCAAAT	TCAGTACAGA	479	
Consensus	AACACTGATC	ATCTCAAAGC	TATCAACTGA		

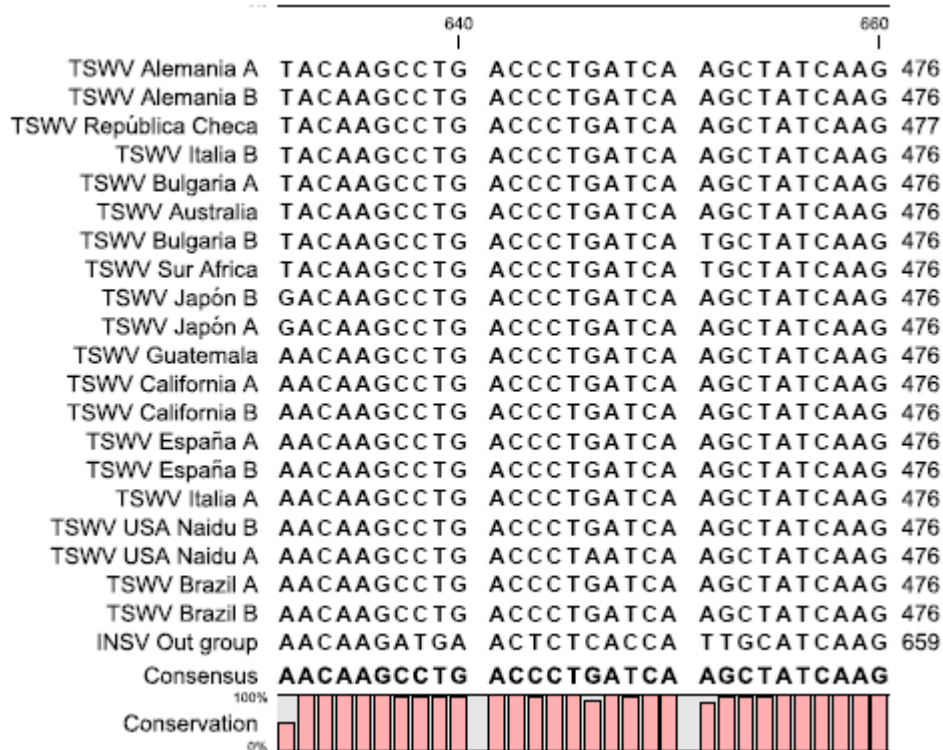


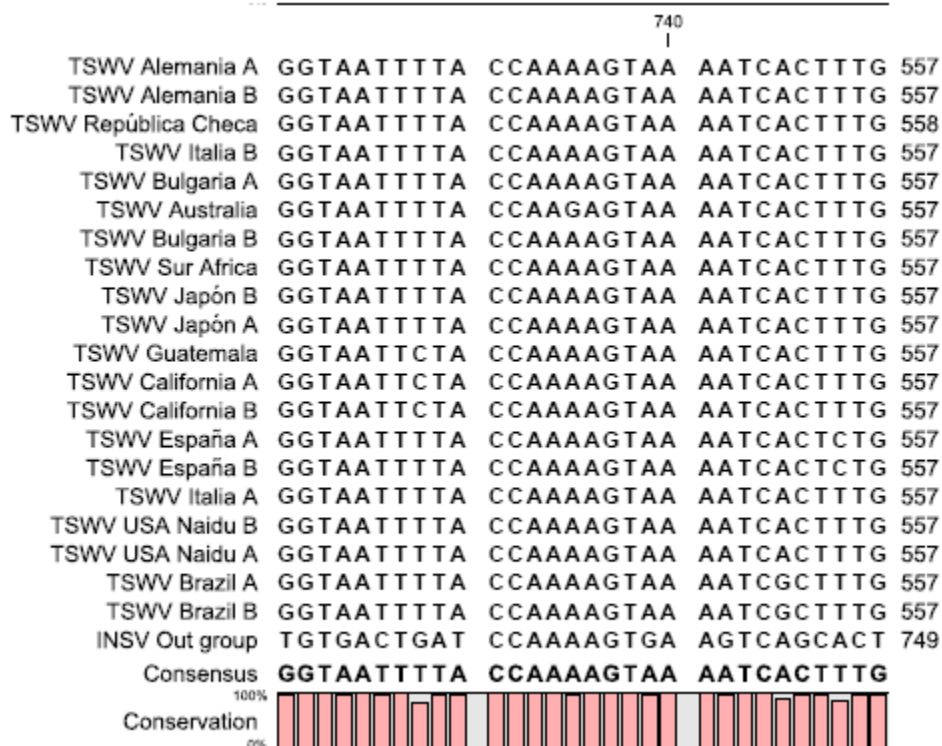
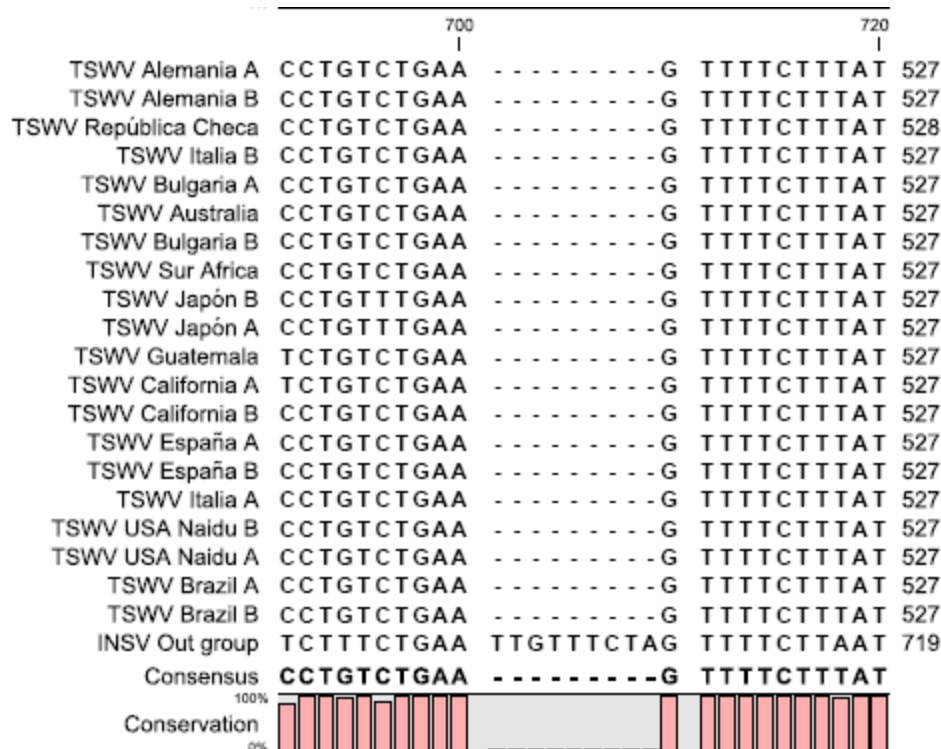
		500			
TSWV Alemania A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Alemania B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV República Checa	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	330	
TSWV Italia B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Bulgaria A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Australia	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Bulgaria B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Sur Africa	AGCAATAAGA	GGTAAACTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Japón B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Japón A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Guatemala	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCTAGCAT	329	
TSWV California A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCTAGCAT	329	
TSWV California B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCTAGCAT	329	
TSWV España A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV España B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Italia A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV USA Naidu B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV USA Naidu A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCTAGCAT	329	
TSWV Brazil A	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
TSWV Brazil B	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT	329	
INSV Out group	TGCTATCAGA	GGAAGACTTC	CTCCTAAGAG	509	
Consensus	AGCAATAAGA	GGTAAGCTAC	CTCCCAGCAT		

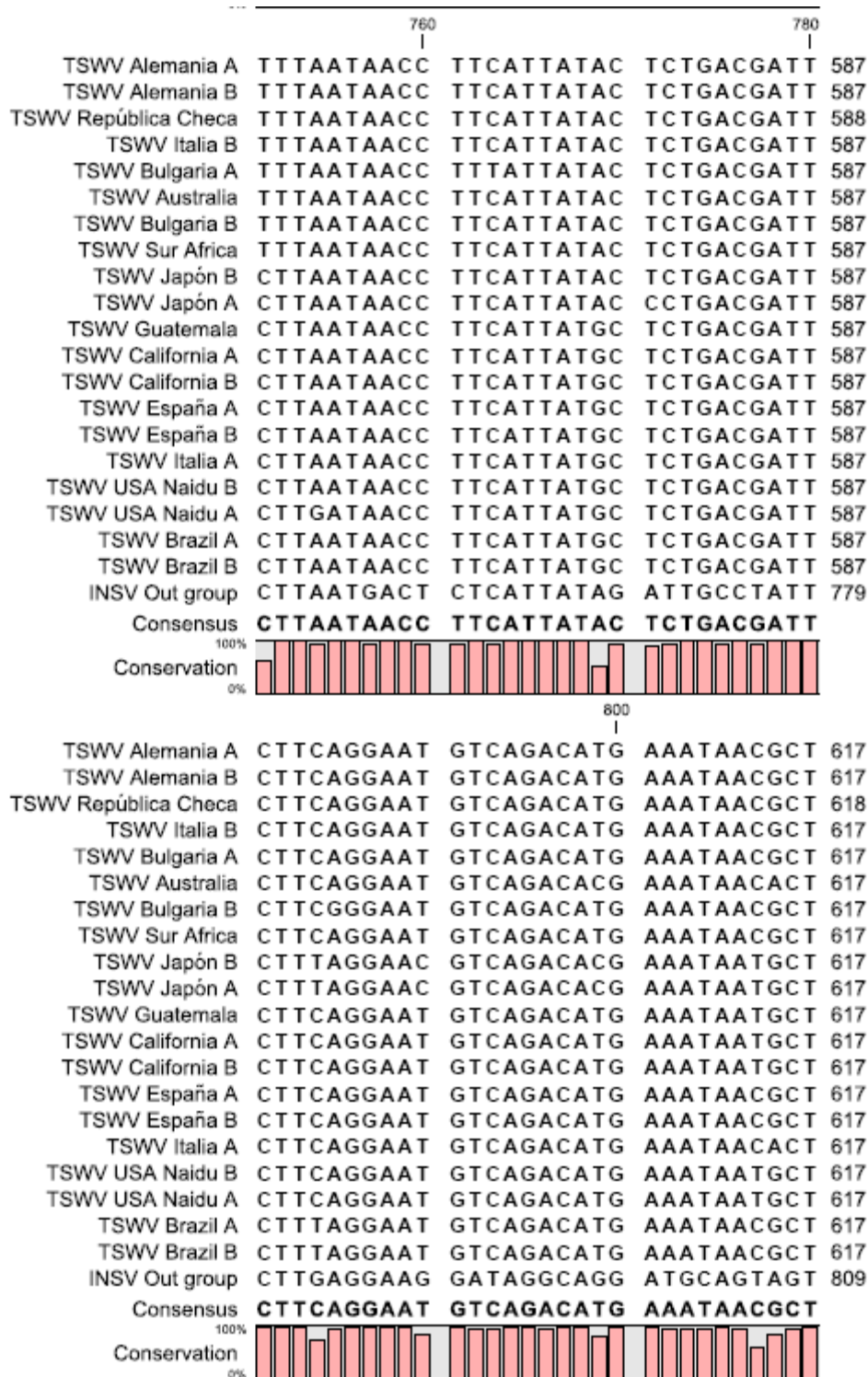










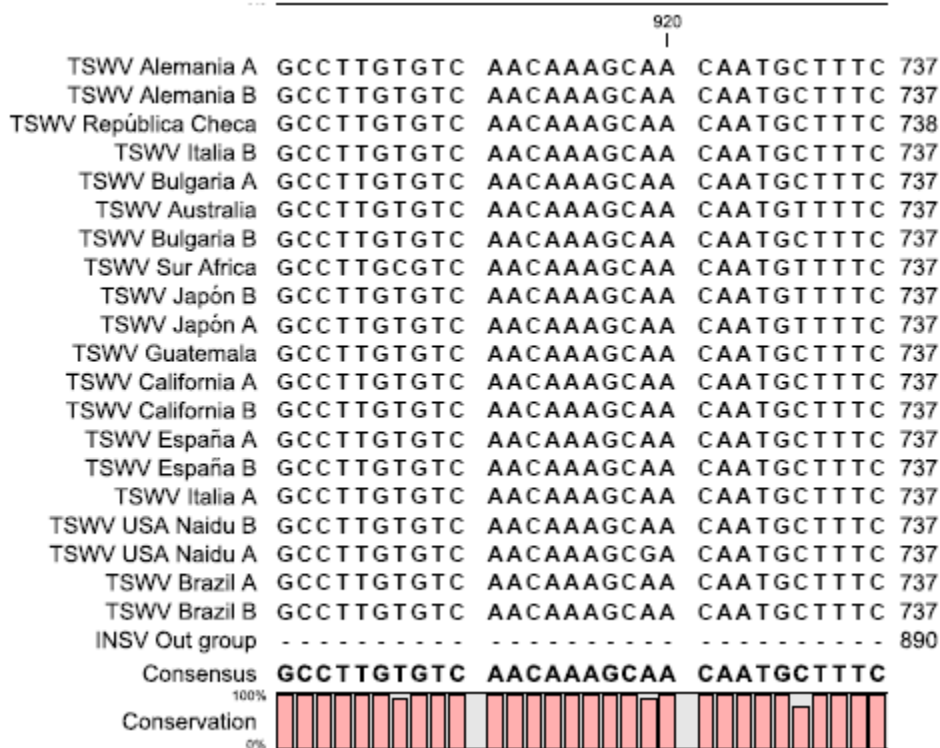
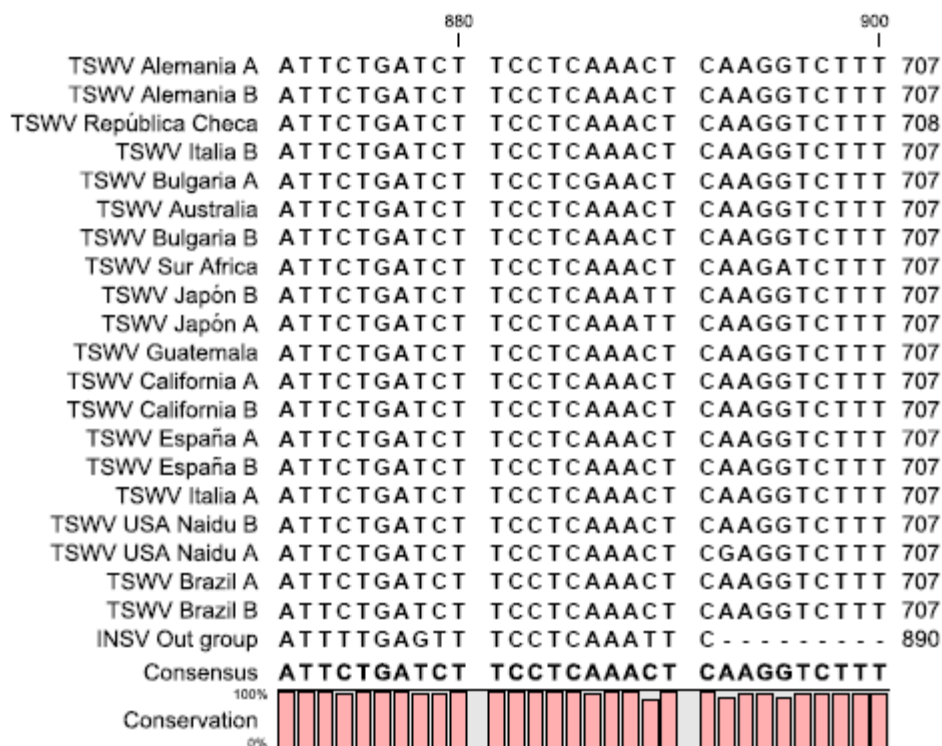


	820		840	
TSWV Alemania A	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	GGTTTTCCAG	647
TSWV Alemania B	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	GGTTTTCCAG	647
TSWV República Checa	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	GGTTTTCCAG	648
TSWV Italia B	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	GGTTTTCCAG	647
TSWV Bulgaria A	CATCTTCTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCTAG	647
TSWV Australia	CATCTTCTTG	ATCTGGTCTA	GGTTTTCCAG	647
TSWV Bulgaria B	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	GGTTTTCTAG	647
TSWV Sur Africa	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	GGTTTTCTTG	647
TSWV Japón B	CATCTTCTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV Japón A	CATCTTCTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV Guatemala	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTCTCCAG	647
TSWV California A	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV California B	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV España A	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV España B	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV Italia A	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV USA Naidu B	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	647
TSWV USA Naidu A	CATCTTTTTG	ATCTGGTCAA	GGTTCCAG	647
TSWV Brazil A	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	TGTTTTCCAG	647
TSWV Brazil B	CATCTTCTTG	ATCTGGTCGA	TGTTTTCCAG	647
INSV Out group	CATGTTCTGA	ATCTTTTCAC	GGTTGTTGGT	839
Consensus	CATCTTCTTG	ATCTGGTCAA	GGTTTTCCAG	



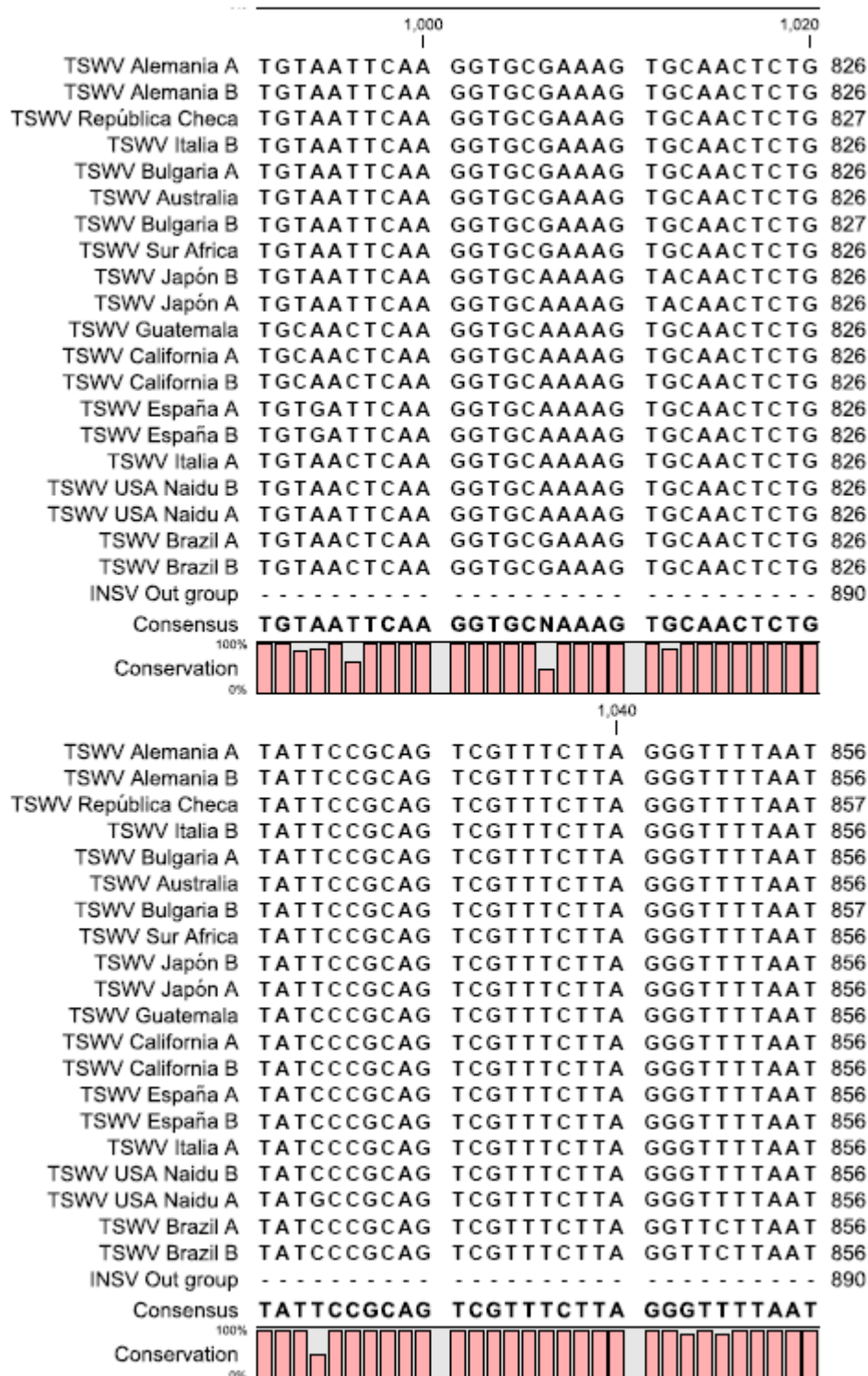
	860			
TSWV Alemania A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Alemania B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV República Checa	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	678
TSWV Italia B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Bulgaria A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Australia	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTATCAG	677
TSWV Bulgaria B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Sur Africa	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Japón B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Japón A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Guatemala	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV California A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV California B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV España A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV España B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Italia A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV USA Naidu B	AAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV USA Naidu A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Brazil A	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
TSWV Brazil B	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	677
INSV Out group	AAAGAAGTCA	GTGAAATTGA	AAGACCCTTC	869
Consensus	ACAAAAAGTC	TTGAAGTTGA	ATGCTACCAG	

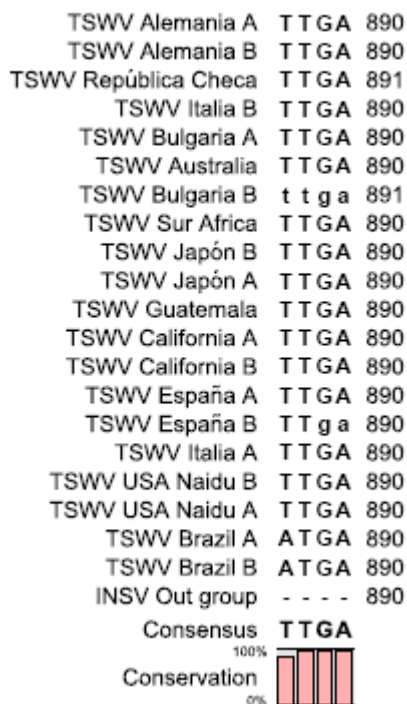
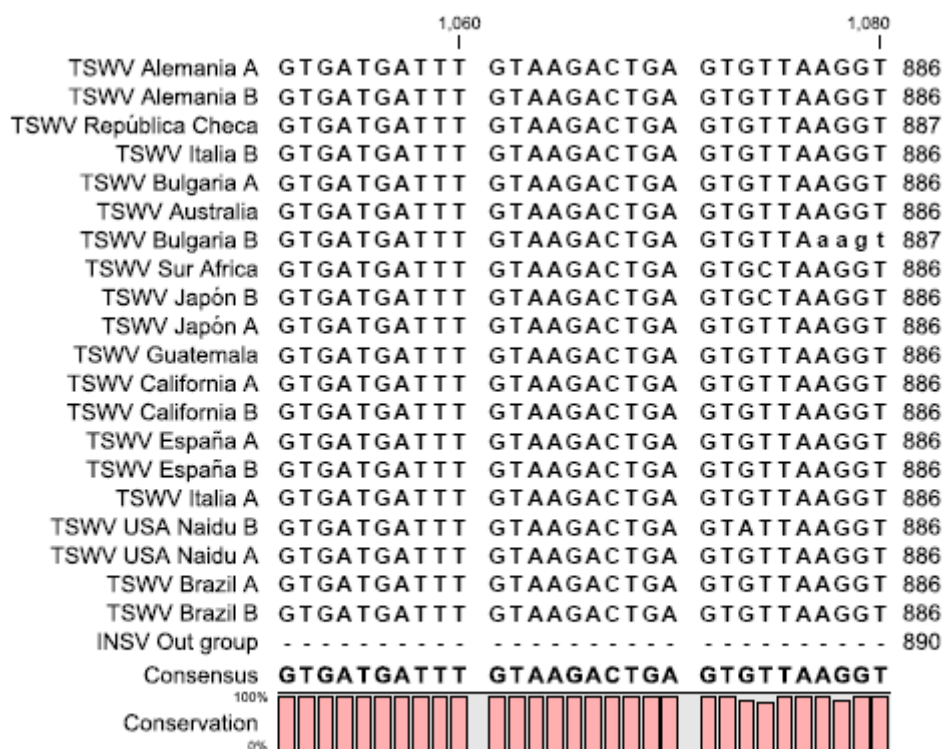




		940		960	
TSWV Alemania A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Alemania B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV República Checa	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	768	
TSWV Italia B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Bulgaria A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Australia	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Bulgaria B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Sur Africa	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Japón B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Japón A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Guatemala	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV California A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV California B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV España A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV España B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Italia A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV USA Naidu B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV USA Naidu A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Brazil A	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
TSWV Brazil B	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT	767	
INSV Out group	- - - - -	- - - - -	- - - - -	890	
Consensus	CTTAGTGAGC	TTAACCTTAG	ACATGATGAT		
Conservation					

			980	
TSWV Alemania A	TGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Alemania B	TGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV República Checa	TGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	797
TSWV Italia B	TGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Bulgaria A	TATAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Australia	TGTAGAAGCT	GTTATATGCT	TTGACCG - TG	796
TSWV Bulgaria B	TGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCGATA	797
TSWV Sur Africa	TGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Japón B	CACAGAAGTT	ATTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Japón A	CACAGAAGTT	ATTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Guatemala	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV California A	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV California B	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV España A	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	CTGACCG - TA	796
TSWV España B	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	CTGACCG - TA	796
TSWV Italia A	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV USA Naidu B	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV USA Naidu A	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Brazil A	CGTAAAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
TSWV Brazil B	CGTAAAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	796
INSV Out group	- - - - -	- - - - -	- - - - -	890
Consensus	CGTAGAAGTT	GTTATATGCT	TTGACCG - TA	
Conservation				





APÉNDICE H. Árbol filogenético construido con secuencias del fragmento de ARN S de TSWV reportadas en GenBank y la secuencia encontrada en Thrips de Guatemala.

