

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis filogeográfico de haplotipos de *Diaphorina citri* en 13 departamentos de Guatemala utilizando como marcador el gen citocromo oxidasa 1 (CO1)

Trabajo de graduación por
María Fernanda Lainfiesta Palomo para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2015

Análisis filogeográfico de haplotipos de *Diaphorina citri* en 13 departamentos de Guatemala utilizando como marcador el gen citocromo oxidasa 1 (CO1)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Análisis filogeográfico de haplotipos de *Diaphorina citri* en 13 departamentos de Guatemala utilizando como marcador el gen citocromo oxidasa 1 (CO1)

Trabajo de graduación por
María Fernanda Lainfiesta Palomo para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,


2015

Vo. Bo. :

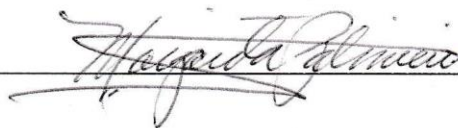
(f) 

(Elena Dardón)

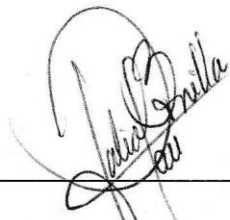
Tribunal Examinador:

(f) 

(Lic. Elena Dardón)

(f) 

(Lic. Margarita Palmieri)

(f) 

(PhD. Dalia Lau)

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de julio del 2015

PREFACIO

Este trabajo de graduación se realizó en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. El proyecto surgió derivado de mis prácticas profesionales que fueron en este mismo laboratorio realizando biotipificación de mosca blanca *Bemisia tabaci* por medio del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa 1. Para este estudio se utilizaron psílicos que estaban en el laboratorio de proyectos anteriores. El objetivo principal de este trabajo era la elaboración de un análisis filogeográfico del vector *Diaphorina citri* utilizando como marcador mitocondrial el gen citocromo oxidasa 1. El proceso comenzó con encontrar iniciadores que funcionaran con el psílido ya que los iniciadores universales que se habían utilizado en estudios previos de insectos no amplificaron consistentemente con el ADN del psílido. Luego se optimizó la reacción de PCR y se purificó y secuenció el fragmento amplificado.

Se seleccionaron 60 insectos, pertenecientes a 13 departamentos de Guatemala. Se han encontrado 5 haplotipos diferentes en los 13 departamentos incluidos en el estudio. Se secuenciaron 51 muestras, pero únicamente 48 tenían una secuencia de calidad utilizable. De estas 48, solo 47 se incluyeron en el alineamiento porque una de las secuencias era de menor tamaño que el alineamiento y se perdía información al incluirla.

Este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo sin el apoyo de la Lic. Elena Dardón y todos los miembros del laboratorio de protección vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala por lo que les agradezco de todo corazón su tiempo y su apoyo durante el transcurso del trabajo de laboratorio. Agradezco también a la Lic. Palmieri por permitirme realizar este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Protección Vegetal, así como el uso de sus reactivos y equipo.

Me gustaría agradecer a toda mi familia, especialmente a mi mama y a mi hermana por todo el apoyo durante el transcurso de la carrera. Así también como a mis amigos: Yunuen, Marlin, Waleska, Matute, Ingrid, Sergio, Jonathan, Miguel, y Pablo. Sin todas estas personas maravillosas en mi vida no hubiera llegado a este punto.

ÍNDICE

	Página
LISTADO DE CUADROS	viii
LISTADO DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
A. Objetivo general	2
B. Objetivos específicos	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
A. Huanlongbing (HLB).....	4
B. <i>Diaphorina citri</i>	7
C. Estudios filogeográficos	10
V. METODOLOGÍA	13
A. Especímenes del estudio.....	13
B. Extracción de ADN	13
C. Cuantificación de ADN y verificación de la integridad.	13
D. Optimización del protocolo de amplificación.....	14
E. Amplificación en triplicado, purificación y secuenciación.	14
F. Detección de bacteria ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> '.	15
G. Análisis de datos	15
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
VII. CONCLUSIONES	31
VIII. RECOMENDACIONES	32
IX. LITERATURA CITADA	33
X. ANEXOS	38

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1: Cuantificación y pureza del ADN.....	19
Cuadro 2: Condiciones modificadas para la reacción de PCR durante el proceso de optimización de la amplificación.....	20
Cuadro 3: Resumen de haplotipos y posición polimórfica observada del alineamiento de 28 secuencias de <i>D. citri</i>	24
Cuadro 4: Muestras de <i>D. citri</i> utilizadas para el alineamiento.....	25
Cuadro 5: Frecuencia de haplotipos de <i>D. citri</i> y su distribución geográfica.....	26

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Síntomas asociados al HLB en hojas y frutos.....	5
Figura 2: Estadíos de <i>D. citri</i>	7
Figura 3: Dibujo del ciclo de vida del psílido asiático de los cítricos.....	8
Figura 4: Distribución en América del vector <i>D. citri</i>	9
Figura 5: Diagrama de flujo de la metodología utilizada	16
Figura 6: Gel de agarosa al 1% de las pruebas de amplificación con diferentes métodos de extracción.....	18
Figura 7: Geles de agarosa al 1% mostrando productos de amplificación.....	21
Figura 8: Gel de productos purificados de PCR.....	22
Figura 9: Red de haplotipos de <i>D. citri</i>	27
Figura 10: Mapa de distribución de los haplotipos encontrados.....	28
Figura 11: Gel de agarosa al 2% para la detección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	30

RESUMEN

La enfermedad de Huanglongbing (HLB) es una enfermedad que afecta cítricos causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. El vector de esta enfermedad es el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*. En Guatemala, la enfermedad HLB afecta los cultivos de cítricos desde el 2010 (Tapia 2010). Aun así hasta el momento nunca se había realizado un análisis filogeográfico de este insecto. El siguiente estudio se basó en la utilización de la secuencia de un fragmento del gen mitocondrial CO1 de 821 pares de bases para realizar un análisis de haplotipos en 13 departamentos de Guatemala. El fragmento del gen se amplificó por medio de una PCR de punto final, se purificó y se secuenció. Posteriormente se realizó un alineamiento de 644 pares de bases en donde se encontraron cinco sitios polimórficos.

En los departamentos que se incluyeron en este estudio, se encontraron 5 haplotipos diferentes, siendo el haplotipo más abundante el haplotipo 1. La información recolectada en el estudio sugiere que en Guatemala solo ha habido un evento de introducción de este vector, pero un estudio a escala más grande debe llevarse a cabo para confirmar esta sospecha. Debería establecerse un programa de monitoreo para asegurar que no haya más diversificación y que los programas implementados de control de la plaga estén funcionando adecuadamente sin ejercer presión selectiva hacia haplotipos resistentes al método de control utilizado.

ABSTRACT

Huanlongbing is a disease affecting citrus, caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp.. The vector of this disease is the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. In Guatemala, HLB has been affecting citrus crops since 2010 (Tapia 2010). So far, a phylogeographic analysis of this insect in the country has not been done. This study was based on the amplification of an 823 base pairs fragment of the gene for cytochrome oxidase 1 (CO1) to do a haplotype analysis in 13 departments of Guatemala. The gene fragment was amplified using an endpoint PCR, purified and sequenced. Subsequently an alignment of 644 base pair was analyzed where five polymorphic sites were found.

In the departments included in the study, five different haplotypes were found, the most abundant being haplotype 1. The information generated throughout the study suggests that Guatemala has only seen one event of vector introduction but a greater scale study must be carried out to confirm this. Also, a monitoring program should be established to ensure that the control methods being used in the field are working to control the dispersion of the vector and disease but also to ensure that the current method of control is not exerting selective pressure for resistant haplotypes.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huanglongbing (HLB) es una causada por bacterias del género *Candidatus Liberibacter* spp, específicamente por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, transmitidas por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*. Aunque se ha encontrado la bacteria en diversas plantas, en ninguna ha demostrado ocasionar síntomas tan severos como en los cítricos, como frutos pequeños, deformes y amargos. Actualmente se han identificado tres variantes de la enfermedad a nivel mundial, pero en Guatemala únicamente se ha encontrado la variante asiática. Desde el 2009 el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) emitió una alerta fitosanitaria con el respaldo del Organismo Internacional Regional Sanidad Agropecuaria (OIRSA) para controlar la diseminación del vector y de la enfermedad, aunque la enfermedad fue reportada oficialmente a OIRSA como presente en Guatemala hasta en junio del 2010 (Tapia 2010). Para controlar adecuadamente la enfermedad de Huanglongbing es necesario realizar estudios para conocer más al vector, el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*. La realización de un estudio filogeográfico y de diversidad del vector permitirá realizar planes de control y manejo y por ende de la enfermedad.

El objetivo principal de este estudio es elaborar una filogenia basada en los haplotipos del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa 1 (CO1) de *D. citri* en 13 departamentos de Guatemala. Para llevar a cabo esto es necesario optimizar un protocolo de amplificación para el gen CO1 de *Diaphorina citri*, ya que hay dificultades reportadas para la amplificación de este gen con iniciadores universales. Por otro lado, al realizar la filogenia de *D. citri* se puede establecer si hay una relación entre haplotipos y la región donde se encuentra.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

1. Elaborar una filogenia de los haplotipos del gen mitocondrial CO1 de *Diaphorina citri* que están presentes en 13 departamentos de Guatemala (Alta Verapaz, El Progreso, Huehuetenango, Izabal, Suchitepéquez, Zacapa, Escuintla, Jutiapa, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, San Marcos y Santa Rosa).

B. Objetivos específicos

1. Optimizar la amplificación del gen CO1 de *D. citri*.
2. Obtener la secuencia del gen CO1 de *D. citri* de varios departamentos de Guatemala.
3. Buscar los polimorfismos de un solo nucleótido en las secuencias obtenidas para el gen CO1 de *D. citri*.
4. Determinar los haplotipos del gen CO1 de *D. citri*.
5. Elaborar una filogenia basada en el gen CO1 de *D. citri* proveniente de diferentes regiones de Guatemala.

III. JUSTIFICACIÓN

La industria de cítricos de Centroamérica y Panamá genera más de 100,000 empleos e ingresos de \$ 200 millones. Este mercado creció de 1998 hasta el 2002 un 42% en el país. En Guatemala, para el 2004, se sabía que únicamente el cultivo de limón persa generaba alrededor de 2,500 empleos y que se exportaba el equivalente de \$ 1,774,000.00 anuales al mundo (ANACAFE 2004). La producción de cítricos es de gran importancia económica para Guatemala en particular en seis departamentos (Zacapa, Izabal, El Progreso, Petén, Alta Verapaz y Chiquimula). Sin embargo, desde el 2009 se ha propagado la enfermedad de Huanglongbing (HLB o *greening*) en la mayoría de los departamentos que cultivan cítricos.

Los estudios filogenéticos de diversas especies (e.i. *Bemisia tabaci* (Font 2009)) han sido realizados en el país con la intención de conocer a la especie y poder formular planes de control de aquellos que son vectores tanto de patógenos que afectan animales como de plantas. En general, existen pocos estudios filogenéticos del psílido asiático de los cítricos siendo uno de los más conocidos un análisis filogeográfico de psílicos en colecciones de aproximadamente 16 países (Boykin *et al.* 2012). Este estudio sería pionero ya que a nivel de país no existen estudios filogeográficos de *D. citri* y la información generada será de gran utilidad para tomar decisiones en cuanto al manejo de las poblaciones de este insecto en Guatemala.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Huanglongbing (HLB)

1. HLB. Huanglongbing (HLB) o la enfermedad de *greening* de los cítricos es una enfermedad destructiva que afecta a la gran mayoría de los cítricos (Jagoueix *et al.* 1994). Esta enfermedad es causada por una bacteria endógena del floema de las plantas, que ataca específicamente en el tubo criboso, que ha sido clasificada como ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’. La bacteria se transporta de planta en planta a través de dos vectores, de los cuales hasta el momento se han identificado *Diaphorina citri* (Asia y América) y *Trioza erytreae* (África), ambos psílidos (Bové 2006).

Originalmente, la enfermedad fue descrita por primera vez en China, en 1919. Se reportó el amarillamiento de los tallos en los cítricos (Bové 2006). La bacteria causante de la enfermedad fue observada por primera vez en 1970 por Laflèche y Bové en el floema de las hojas de la naranja dulce (Jagoueix *et al.* 1994). En un principio se creyó que el organismo causante del huanglongbing era un organismo similar a micoplasma pero actualmente se sabe que es una bacteria Gram negativa (Jagoueix *et al.* 1994).

2. Bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ es una bacteria Gram negativa, fastidiosa, limitada al floema de la planta. Por su secuencia de la subunidad 16S de ADN¹ ribosomal (ADNr) se le clasifica en la subdivisión α de *Proteobacteria* (Jagoueix *et al.* 1994). Hasta el momento se han identificado tres formas de la enfermedad, cada una asociada a una especie diferente de ‘*Candidatus Liberibacter*’. Las especies asociadas a esta enfermedad son: *Ca. Liberibacter africanus* (Laf), *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) y *Ca. Liberibacter americanus* (Lam) (Doddapaneni *et al.* 2008; Islam, *et al.* 2012). No fue sino hasta 2009 cuando se reportó un medio de cultivo en el cual se logró cultivar las tres especies que han sido asociadas a HLB en condiciones de

¹ ADN = Ácido desoxiribonucleico

laboratorio. Es en el artículo donde describen el medio que también describen la forma de las colonias de *Ca. Liberibacter africanus*, que son irregulares, convexas de 0.1-0.3 mm después de 3 a 4 días de incubación, mientras que se describe la forma de las células de las otras dos especies como ovoides alargados hasta varillas con medidas de 0.3 a 0.4 por 0.5 a 2 μm con apéndices parecidos a las fimbrias. No todas las cepas que se han cultivado en este medio han demostrado ser patogénicas, pero algunas sí (Sechler *et al.* 2009). El medio de cultivo modificado, llamado LiberA, contenía fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio, NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y extracto de vena de cítricos (Sechler *et al.* 2009).

3. Síntomas de la enfermedad de Huanglongbing . Los síntomas de la enfermedad HLB son muy variados y suelen confundirse con los síntomas de otros desórdenes o deficiencias como la deficiencia de zinc, manganeso o hierro (MAGA S/F; Bové 2006). La enfermedad empieza por tornar amarillos los retoños (ramas jóvenes) que crecen después del periodo de incubación de la enfermedad. Posteriormente las hojas presentan manchas asimétricas verdes y amarillas (Gottwald *et al.* 2007; Bové, J.M. 2006) (Figura 1A y 1B). En estas hojas hay acumulación anormal de almidón en el envés de la hoja y pueden ser hojas más gruesas y con apariencia coriácea (Anchor *et al.* 2010; Bové 2006). Las frutas son afectadas en las etapas tardías de la infección. Usualmente son frutos más pequeños, asimétricos, con el eje frutal torcido y con un jugo más amargo (Figura 1C). La fruta que debería ponerse naranja al madurar permanece verde o está moteada de verde mientras que los frutos verdes tienen una apariencia moteada con amarillo (Bové 2006; Gottwald y Bassanezi 2007) .

Figura 1: Síntomas asociados al HLB en hojas y frutos. A y B: manchas cloróticas y moteado amarillo, asimétrico característico de la enfermedad de HLB. C: fruto pequeño y con el eje frutal torcido.



(Adaptado de <http://visar.maga.gob.gt/visar/img/hlb.pdf>).

4. Prevención y control de la enfermedad de Huanglongbing. Aun no se ha encontrado una cura para la enfermedad de huanglongbing (HLB), o *greening* de los cítricos. Es un patógeno que está afectando a más de 40 países del mundo. Actualmente la mayoría de los esfuerzos se enfocan en prevenir la infección y en controlar al vector que la transmite. Hasta el momento no se ha encontrado una variante de cítrico resistente a la enfermedad. La investigación se ha centrado en analizar combinaciones de porta injertos e injertos que le den tolerancia al árbol contra la enfermedad, pero en los resultados ninguna combinación tuvo tolerancia de más de seis meses después de haber inoculado los árboles con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Shokrollah *et al.* 2011).

Para controlar la infección se han implementado varios métodos. El método más controversial y difícil de aplicar es la remoción de árboles sintomáticos en el momento en que se hace una detección positiva de la enfermedad. Es una técnica que consume mucho tiempo y recursos ya que implica inspecciones por lo menos cuatro veces al año, así como la eliminación inmediata de los árboles que presenten síntomas. La eficiencia de esta técnica para la reducción de la dispersión de la enfermedad se ve afectada por qué tan rápido se remueven los arboles posteriormente de haber sido identificados como infectados y la habilidad de identificación de síntomas del grupo encargado de realizar las inspecciones (Bassanezi *et al.* 2013). Hay un método de control químico que utiliza antibióticos -al hacer un injerto con una rama infectada con HLB tratada con ampicilina (1 g/L) antes de hacer el injerto, el árbol que crece no demuestra síntomas de la enfermedad y no se detecta la enfermedad ni utilizando la técnica de PCR en tiempo real- para evitar la propagación de la enfermedad, pero no ofrece una protección contra la infección si se utiliza como medida única en plantaciones mixtas (Zhang *et al.*, 2013).

Entre los métodos que se utilizan para controlar al vector se encuentran métodos desde físicos, químicos hasta de control biológico. Como método físico de control se ha comprobado que la plantación intercalada de guayaba en las arboledas de cítricos, dentro de las filas, es una técnica de control y prevención no química que ofrece una protección en contra de la infección del vector y funciona como barrera de dispersión que dura aproximadamente un año (Ichinose *et al.* 2012). El método de control químico del vector implica rociar las arboledas con insecticidas de amplio espectro, una vez en invierno y una

vez en verano, para reducir el número de insectos adultos y disminuir la probabilidad de infección. Se ha demostrado que esta técnica, aplicando insecticidas específicos (clorpirifós, oxamilo o fenpropatrin), resulta de una disminución de 10 a 15 veces de los adultos de *Diaphorina citri* (Qureshi *et al.*, 2010).

B. *Diaphorina citri*

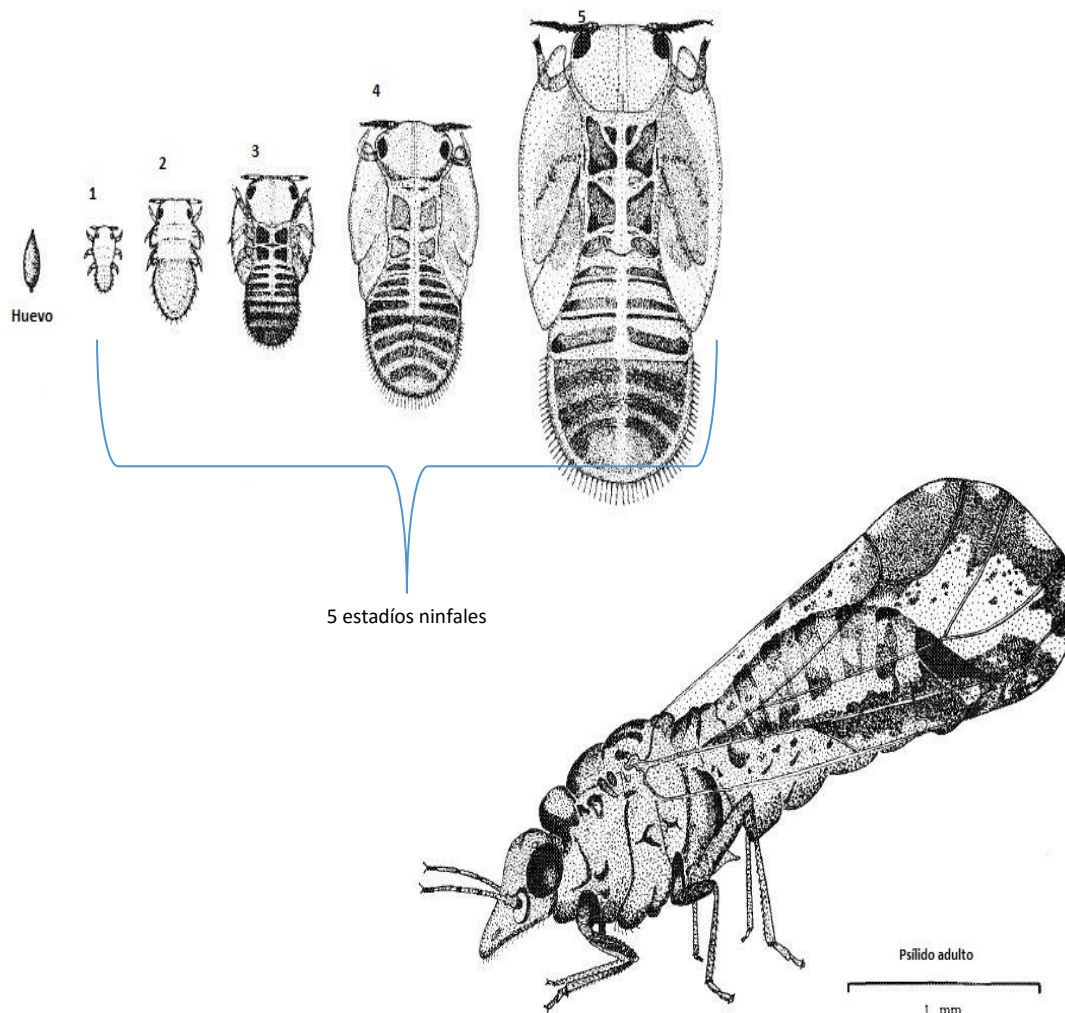
1. Morfología y ciclo de vida. El psílido asiático de los cítricos (ACP por sus siglas en inglés) es un insecto pequeño cuando es adulto (2.7 a 4 mm de largo), usualmente de colores café/gris, azul/verde, amarillo/anaranjado, con alas moteadas café (Figura 2, adulto). Los adultos descansan y se alimentan en las hojas de los cítricos (usualmente hojas jóvenes a excepción del invierno donde no hay crecimiento) o en los tallos jóvenes a un ángulo de 45° de la superficie (Grafton-Cardwell *et al.* 2006; Hall *et al.* 2013). Las hembras depositan entre 500-800 huevos cada dos meses y la ovoposición se ve afectada por la humedad y por la temperatura. El tiempo de incubación de los huevos es de aproximadamente 4 días a temperatura ambiente y el promedio de tiempo de desarrollo de huevo a adulto es de 14 días a una temperatura de 28°C, pero puede tomar hasta 49 días cuando la temperatura es menor a 15°C (Grafton-Cardwell *et al.* 2006; Hall *et al.* 2013).

Figura 2: Estadios de *Diaphorina citri*. En esta imagen se observan fotografías de los diversos estadios del vector de la enfermedad de huanglongbing en Asia y en América.



(Adaptado de <http://visar.maga.gob.gt/visar/img/hlb.pdf>).

Figura 3: Dibujo del ciclo de vida del psílido asiático de los cítricos. En esta figura es un dibujo en el cual se ha representado el ciclo de vida del psílido asiático de los cítricos a escala.



Adaptada de Catling 1970

2. Distribución en América. Se sabe que la enfermedad de HLB se transmite por vectores que transportan la bacteria de un árbol a otro. Se conoce que el vector de Las (Candidatus Liberibacter asiaticus) y Lam (Candidatus Liberibacter americanus) es *Diaphorina citri* (Chiyaka *et al.*, 2012) mientras que el vector de Laf (Candidatus Liberibacter africanus) es *Trioza erythrae* (Bové *et al.* 2012) pero éste únicamente se encuentra en África. El vector importante para Guatemala es *Diaphorina citri* (Figura 2), que tiene una amplia distribución en América empezando en Florida, pasando por México hasta Panamá, Colombia, Venezuela, Brasil, Paraguay, y las islas del Caribe (Figura 4). No en todos los países donde se encuentra el vector se ha comprobado la presencia de la

enfermedad; hasta el 2006 solo se había encontrado en São Paulo, Brasil y al sur de Florida (Grafton-Cardwell, *et al.* 2006). En 2008 se encontró en el sur de California y en el 2009 en Arizona. A partir del 2009 se encontró en los estados mexicanos de la península de Yucatán y en países de Centro América y el Caribe (Gottwald 2010).

Figura 4: Distribución en América del vector *Diaphorina citri*. Los círculos verdes indican los sitios específicos donde se tienen referencias de la presencia de *D. citri*.



(Adaptada de

<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx?speciesID=13932&dsID=18615&loc=global>)

3. Transmisión de la enfermedad. El patógeno puede ser transmitido por adultos, así como por las ninfas del cuarto y quinto estadio (Brlansky y Rogers, 2007). Una vez el árbol ha sido infectado, el período de incubación del patógeno varía de unos meses hasta varios años antes de que el árbol empiece a mostrar síntomas (Gottwald, 2010). La distribución de la bacteria es irregular a lo largo del sistema vascular de los árboles lo cual ha dificultado que se establezca acertadamente su forma de dispersión y de diagnóstico por lo que para realizar los muestreos en búsqueda de la enfermedad se buscan hojas con síntomas y se toman las muestras alrededor de estas. Lo que se ha descubierto y verificado es que los psílicos se infectan de la bacteria cuando se alimentan, particularmente del área del cítrico que presenta una alta concentración de bacteria (Gottwald *et al.*, 2008; Brlansky y Rogers, 2007). Así mismo se ha comprobado que la transmisión ocurre más frecuentemente entre los árboles de una misma fila que entre filas dentro de una misma plantación, y que es poco probable que se disemine naturalmente en distancias muy largas (Chiyaka *et al.*, 2012; Tatineni *et al.*, 2008).

C. Estudios filogeográficos

1. Estudios filogeográficos. La palabra filogeografía fue acuñada por Avise *et al.* (1987) y representaba un análisis filogenético de datos de un organismo en un contexto de la distribución geográfica del mismo con la idea de unir los campos de genética de poblaciones con filogenética (Hickerson *et al.* 2010). En los años posteriores la utilización de marcadores mitocondriales para analizar datos a nivel de especie llevó a que se definiera que los clados diferentes dentro de una especie eran límites de poblaciones (Hickerson *et al.* 2010). Fue con el incremento en el interés en la teoría coalescente, propuesta por Kingman en 1982, que es un modelo matemático para describir los procesos genealógicos de una muestra de genes neutrales de una población en el tiempo (Crandall y Templeton 1993). Así como la integración de la misma a la filogeografía, y con modelos matemáticos de genética de poblaciones que se empezó a incursionar el campo de la filogeografía, aunque tomó tiempo antes de que existieran publicaciones de este tipo. Aun así, a lo largo de los años 90 los datos obtenidos de marcadores mitocondriales eran insuficientes para obtener parámetros precisos (Hickerson *et al.* 2010). Actualmente el campo de la

filogeografía está migrando de métodos descriptivos a estimación de parámetros (Kuhner 2008), y otras disciplinas basadas en modelos más complejos que tomen en cuenta mucha más información que solo la geográfica y filogenética (Hickerson *et al.* 2010).

2. Estudios filogeográficos del orden Hemiptera y Diptera. Se han realizado varios análisis filogeográficos de diversos organismos del orden Hemiptera, orden al que pertenece el vector *Diaphorina citri*, con fines variados utilizando un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1. Un estudio realizado con el vector de la enfermedad de Chagas, *Triatoma brasiliensis*, en Brazil en el 2004 demostró que el vector tiene cuatro formas cromáticas diferentes y un patrón de haplotipos y distribución geográfica que establece un complejo de especie. Aun así, se han encontrado poblaciones híbridas entre estas cuatro formas, pero cada una puede ser utilizada como blanco individual para programas de control del vector (Monteiro *et al.* 2004). Alrededor del mismo tiempo, en Australia se utilizó un análisis de citocromo oxidasa 1 para establecer el origen de una invasión de *Aedes aegypti* y se sugiere establecer un monitoreo constante de este vector utilizando esta metodología para seguir la dispersión de la diversidad endémica y exótica del mosquito (Beebe *et al.* 2005). Estudios similares se han realizado para psílidos como *Bactericera cockerelli* (Swisher *et al.* 2013) así como para mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Dinsdale *et al.* 2010). El caso de *Bemisia tabaci* es importante ya que hay un estudio filogeográfico realizado en Guatemala para este vector por medio del cual se describieron los haplotipos que se encuentran en el país de mosca blanca (Font 2009).

3. Estudios filogeográficos de *Diaphorina citri*. Hay pocos estudios filogenéticos acerca del vector de la enfermedad de HLB, *Diaphorina citri*, y menor cantidad de estudios filogeográficos. Como fundamentos para el presente estudio, los estudios más importantes son un análisis de la diversidad genética de este insecto en cultivos de cítricos en Colombia y un análisis filogeográfico realizado con muestras de 15 países de 52 colecciones diferentes. En el primero concluyen que debido a la similitud de los índices de diversidad genética molecular entre poblaciones de *D. citri* de regiones diferentes la separación de las mismas fue reciente. Asimismo, concluyen que, en Colombia, por lo menos en las dos regiones analizadas aún no hay una diferenciación genética que pueda ser atribuida a la presencia de la bacteria ya que esta aún no ha sido detectada en Colombia (Moncayo-Donoso *et al.* 2014). El segundo estudio es importante

ya que presenta nuevos iniciadores específicos para la amplificación del gen CO1 de *Diaphorina citri* y reporta dos grupos de haplotipos, uno proveniente del suroeste de Asia y el segundo del sureste de Asia, así como un haplotipo único encontrado en el Caribe (Boykin *et al.* 2012).

V. METODOLOGÍA

A. Especímenes del estudio

La colecta de psílidos no fue realizada por la estudiante, se utilizaron muestras llevadas al laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala en el periodo comprendido entre enero del 2013 a diciembre de 2014. Se decidió utilizar cinco individuos por departamento basándose en una revisión de todas las muestras disponibles y encontrando el departamento con menos número de insectos disponibles. En el momento de realizar la extracción, se encontró que algunas de las muestras ya no estaban disponibles por lo que para dos de los departamentos estudiados se utilizaron menos individuos.

B. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de psílidos individuales utilizando el método de extracción de Beard y Scott (2013) adaptado por Erick Mollinedo (2014). Se maceró cada individuo en 100 μ l de buffer CTAB 2X (2% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 y 1.4 M NaCl). Luego se incubó la extracción a 65°C por una hora. Al terminar el tiempo de incubación se agregó 100 μ l de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), se agitó fuertemente y después se centrifugó a 7,000 rpm por 15 minutos. Posteriormente se precipitó el ADN con 1 volumen de isopropanol e se incubó a -20°C overnight. Luego se hizo una centrifugación a 12,000 rpm por 20 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se secaron los tubos para luego re-suspender el precipitado en 50 μ l de buffer TE. Las primeras 30 muestras después de la re-suspensión fueron almacenados con 200 μ l de isopropanol y 20 μ l de acetato de amonio a -20°C del 12/12/2014 al 21/01/2015, día que se precipitó de nuevo el ADN y se re-suspendió en 50 μ L de buffer TE.

C. Cuantificación de ADN y verificación de la integridad.

Para cuantificar el ADN extraído se utilizó la técnica de espectrofotometría UV-visible. Se midió la absorbancia a 260,280 y 320 nm de longitud de onda de una muestra con un espectrofotómetro UV-Visible (Marca: Thermo Spectronic Modelo: GENESYS 10

UV-Vis). Con las absorbancias medidas se utilizó la fórmula 1 para calcular la concentración y la fórmula 2 para calcular la pureza de la muestra. Para verificar la integridad del ADN se utilizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con GelRed corrida a 85 V por 45 minutos.

$$[\text{Concentración de ADN}] = (\text{Abs}_{260} - \text{Abs}_{320}) * 50 * \text{Factor de dilución}$$

Fórmula 1

$$\text{Pureza} = (\text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280})$$

Fórmula 2

D. Optimización del protocolo de amplificación

La PCR de punto final se hizo con los iniciadores DCITRI CO1-L y DCITRI CO1-R (Boykin *et al.* 2012). La reacción se llevó a cabo en 25 μL . Las concentraciones iniciales de la reacción fueron: 1x de buffer de polimerasa sin cloruro de magnesio; 1.65mM de cloruro de magnesio; 0.33 μM de cada uno de los iniciadores; 2.5 mM de dNTPs; 0.04 U/ μl de Taq polimerasa y 3 μl de ADN. Estas condiciones fueron adaptadas para obtener las bandas más definidas posibles. El programa de termociclado (Termociclador MJ Research PTC-150 Minicycler) fue el siguiente: 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minutos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y al finalizar los ciclos 10 minutos a 72°C. El programa se modificó dependiendo de los resultados de las pruebas. El producto de la amplificación se visualizó en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed y corrido a 85 V por 45 minutos (Corrido en cámara Apollo Instrumentations con fuente de poder Sigma Aldrich Techware PS251-1, Visualizado en BioDoc-It Imaging System, Marca: UVP).

E. Amplificación en triplicado, purificación y secuenciación.

Al terminar de optimizar la reacción de amplificación y la visualización del fragmento del CO1 se procedió a amplificar las 60 muestras en triplicado para enviar a secuenciar. Los productos de PCR fueron purificados con el kit SpinPrep PCR Clean-Up Kit (Novagen, Darmstadt, Alemania) según las especificaciones de fabricante. Después de haber realizado la purificación de los productos estos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con GelRed y corridos a 85V por 45 minutos para asegurar que los productos

purificados eran de calidad adecuada para ser secuenciados. La secuenciación será realizada por la empresa Macrogen, Inc. con sede en Corea.

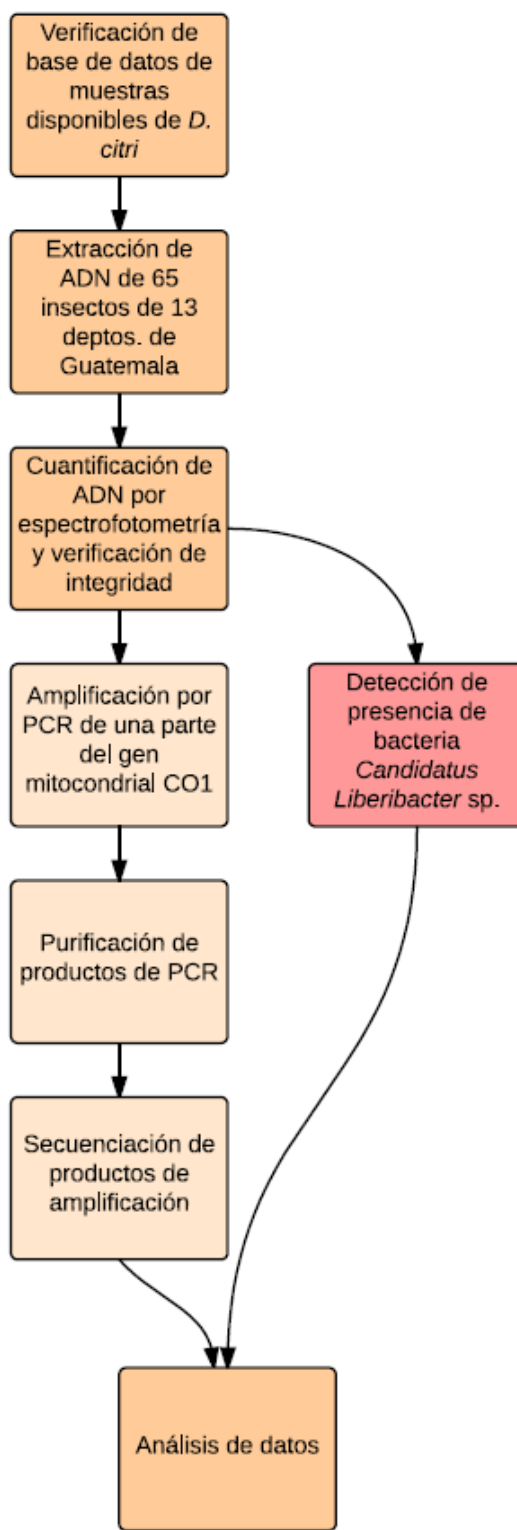
F. Detección de bacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'.

La detección de la bacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' fue por medio de PCR de punto final. El volumen final de reacción fue de 21 μ l con buffer de PCR 1.25X. Cloruro de magnesio 1.8 mM, dNTP's 0.125mM, iniciador HLB1999F e iniciador HLB1999R 0.20 μ M (Hung *et al.* 1999) y 1U de Taq.Pol y una concentración de ADN de la muestra de entre 50-100 ng. El programa de termociclador utilizado fue 1 paso de 3 minutos a 94°C, seguido de 32 ciclos de :1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, y 2 minutos a 72°C, seguido de un paso de 72°C por 10 minutos para finalizar. El producto del PCR se visualizó en un gel de agarosa al 2% con 0.75 μ l de GelRed y se corrió a 75V por 50 minutos con buffer TAE 1X previamente enfriado por lo menos 30 minutos (Mollinedo 2014).

G. Análisis de datos

La información recibida de Macrogen de las secuencias de las muestras se introdujo al *software* Sequencher 5.3. Dentro de este programa, primero se utilizó la herramienta de *trim ends* que recorta las secuencias en las orillas donde suele haber secuenciación de baja calidad debido al método. Posteriormente se obtuvo un consenso para cada muestra, que fue verificado manualmente basándose en el cromatograma. Igualmente, de este consenso para cada muestra se seleccionó un pedazo de la secuencia, tratando de incluir la mayor cantidad de pares de bases, pero verificando la calidad de las secuencias según los picos del cromatograma (alrededor de 750 pb). La secuencia consenso de cada muestra se alineo con el programa Mega 6 (Tamura *et al.* 2013) con el algoritmo de clustalW. La información del alineamiento fue posteriormente exportada a formato NEXUS y se realizó una red de haplotipos en el programa TCS (Clement *et al.* 2000).

Figura 5: Diagrama de flujo de la metodología utilizada. En esta figura se aprecia el diagrama de flujo del trabajo realizado en este estudio.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Extracción de ADN

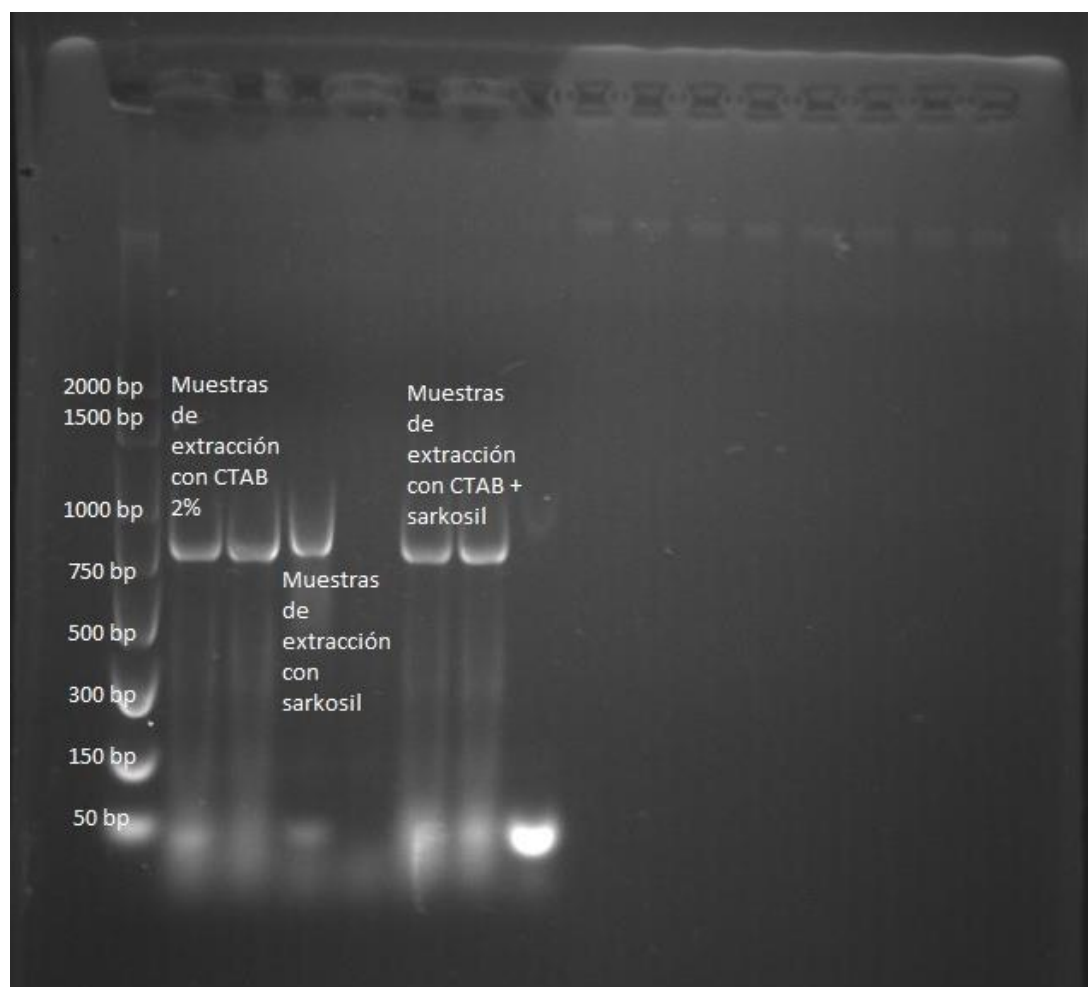
Se hicieron pruebas de tres métodos diferentes de extracción de ADN de los psíidos antes de comenzar con el estudio. Se evaluó el método de CTAB que fue el seleccionado para realizar todas las extracciones y que está descrito en la metodología, así como un método que utilizaba sarkosil, y una extracción combinada de ambos métodos. En las dos pruebas realizadas tanto el protocolo con CTAB y el protocolo combinado dieron como resultado ADN utilizable para la amplificación del fragmento de interés mientras que el ADN obtenido a partir del protocolo con sarkosil dio resultados inconsistentes para la amplificación del fragmento de interés (Figura 6). Se seleccionó el método de CTAB por tiempo y practicidad del mismo.

En la extracción de ADN se logró obtener concentraciones muy variadas de ADN con un promedio de concentración de 43.5 ± 31.2 ng/ μ l y un promedio de pureza de 1.70 ± 0.64 . En algunas muestras se obtuvo tan poco como 5 ng/ μ l de ADN y en otras se logró extraer 135 ng/ μ l (Cuadro 1). La variación en la cantidad de ADN es probable que se deba al diferente tamaño de los insectos utilizados o en si a la manera de macerarlos ya que, aunque se utilizó un dispositivo macerador y pistilos lo más similares posibles durante el proceso de maceración con algunos pistilos se observó diferencia en la cantidad de espuma formada en el tubo. Otra razón por la cual se observa una diferencia es que las primeras 30 muestras fueron precipitadas dos veces ya que fue necesario almacenar el ADN antes de utilizarlo por lo que se pierde una cantidad de ADN al precipitarlo la segunda vez. Por otro lado, la pureza no se pudo obtener para todas las muestras ya que la absorbancia medida a 280 nm con el espectrofotómetro ha sido 0 para 3 de las muestras (Cuadro 1). El rango del valor de la relación A260/A280 es de 1.6-2.0 para que el ADN se considere “puro” (Heaton y Keer 2008; Elkins 2012). En el caso de este estudio 13 muestras tuvieron un valor mayor

a 2.0 para esta relación lo cual indica presencia de ARN, por lo que tratar las muestras con ARNasa habría disminuido este valor y quizás facilitado la amplificación (Heaton y Keer 2008). Por otro lado, había 19 muestras con un valor menor a 1.6 lo cual es indicativo de contaminación con proteínas que se resuelve agregando proteinasas (proteínasa K) a la muestra (Heaton y Keer 2008). Ninguno de estos tratamientos se realizó en el estudio. Las 28 muestras restantes se encuentran en el rango considerado como ADN puro por lo que no era necesario agregarles ningún tratamiento antes de su utilización para la amplificación

Figura 6: Gel de agarosa de pruebas de amplificación con diferentes métodos de extracción de ADN.

En esta imagen se observa la amplificación del fragmento de interés a partir de ADN extraído con diferentes protocolos. Para el ADN extraído protocolo de CTAB, así como el protocolo de CTAB con sarkosil se observa una amplificación clara en ambas muestras y en el de sarkosil solo hay amplificación en una de las muestras. Esta también es la primera amplificación con la receta original de PCR de los iniciadores DCITRICO1L y DCITRICO1R.



Cuadro 1: Cuantificación y pureza del ADN. La cantidad y la pureza del ADN calculada a partir de mediciones de absorbancia a 260, 280 y 320 nm con la fórmula 1 y la fórmula 2.

Muestra	[C] ng/uL	Pureza (260/280)	Muestra	[C] ng/uL	Pureza (260/280)
ML001	35	1.67	ML031	135	1.42
ML002	30	2.00	ML032	95	1.73
ML003	40	2.25	ML033	10	0.00
ML004	35	2.33	ML034	50	2.50
ML005	30	1.75	ML035	85	2.43
ML006	35	2.00	ML036	30	3.00
ML007	40	1.67	ML037	75	1.25
ML008	35	2.33	ML038	40	2.67
ML009	5	0.00	ML039	75	2.50
ML010	35	0.75	ML040	105	2.63
ML011	35	1.80	ML041	100	2.22
ML012	20	0.25	ML042	110	1.57
ML013	60	2.17	ML043	65	1.63
ML014	25	2.50	ML044	35	1.17
ML015	5	1.25	ML045	35	1.75
ML016	20	2.00	ML046	95	1.36
ML017	5	0.00	ML047	15	1.50
ML018	40	2.67	ML048	30	1.50
ML019	20	1.67	ML049	55	1.38
ML020	45	2.00	ML050	30	1.50
ML021	15	1.25	ML051	30	1.50
ML022	10	1.50	ML052	45	1.80
ML023	15	2.00	ML053	85	1.55
ML024	20	2.00	ML054	75	0.88
ML025	15	2.00	ML055	60	2.00
ML026	15	2.00	ML056	25	1.67
ML027	20	1.50	ML057	30	2.00
ML028	30	1.60	ML058	60	1.71
ML029	20	2.00	ML059	120	1.71
ML030	15	1.25	ML060	30	1.20
			Promedio	43.5	1.70
			Desviación Estandar	31.2	0.61

B. Optimización de PCR

En el proceso de optimización de PCR se empezó por cambiar la concentración de dNTPs de la muestra de reacción (Cuadro 2). Posteriormente se optimizó la cantidad de ADN que se agregó a la mezcla de reacción, la temperatura de hibridación de los iniciadores y el tiempo de hibridación y de amplificación del programa del termociclador y el número de ciclos de amplificación. La receta final optimizada de reacción (Cuadro 2, Anexos) fue en un volumen final de 25 μ l con concentraciones finales de: buffer de reacción 1X, $MgCl_2$ 1.65mM, iniciadores DCITRICO1L y DCITRICO1R a 0.33 μ M cada uno, dNTPs 0.1 μ M, 1 U de polimerasa y 2 μ l de ADN. El programa final y optimizado de amplificación (Cuadro 3, Anexos) fue: 1 paso de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 34 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, un paso de hibridación a 59°C por 1 minuto y 30 segundos y un paso de amplificación a 72°C por 1 minutos y 30 segundos, un paso de amplificación final a 72°C por 10 minutos y un paso de *hold* a 4°C por tiempo indefinido.

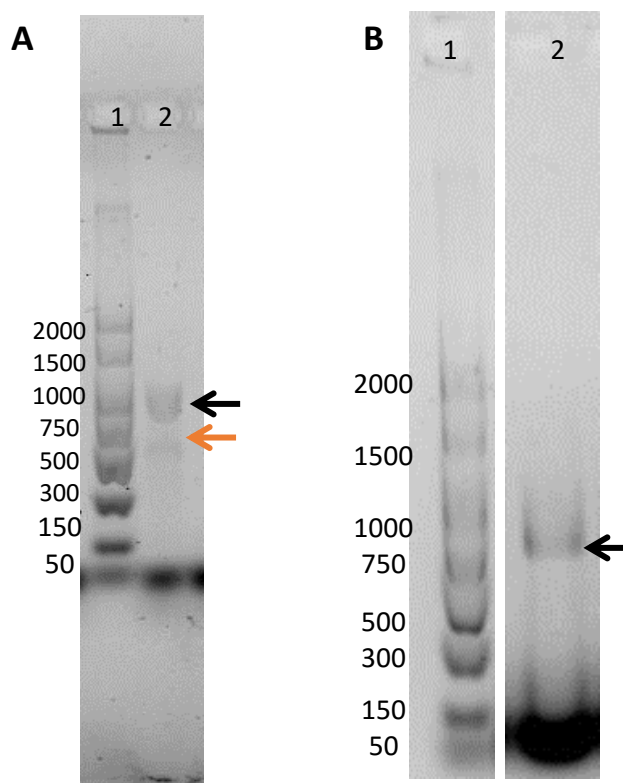
Cuadro 2: Condiciones modificadas para la reacción de PCR durante el proceso de optimización de la amplificación.

Condición modificada	Valor original	Modificación 1	Modificación 2	Modificación 3	Modificación 4
Concentración de dNTPs	0.22 mM	0.15mM	0.1 mM	-	-
Cantidad de ADN	3 μ l	2 μ l	1 μ l	2 μ l	-
Temperatura de hibridación	51.9°C	53.8°C	56.1°C	58°C	59°C
Tiempo de hibridación y tiempo de amplificación	1 min	1min 30 s	-	-	-
Ciclos de amplificación	30 ciclos	34 ciclos	-	-	-

Originalmente, la reacción de amplificación al finalizar las pruebas de optimización había quedado con las siguientes condiciones: volumen final de 25 μ l con concentraciones finales de buffer de reacción 1X, $MgCl_2$ 1.65mM, iniciadores DCITRICO1L y DCITRICO1R a 0.33 μ M cada uno, dNTPs 0.1 μ M, 1 U de polimerasa y 1 μ l de ADN. El programa de termociclado fue: 1 paso de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, un paso de hibridación a 58°C por 1 minuto y un paso de amplificación a 72°C por 1 minutos, un paso

de amplificación final a 72°C por 10 minutos y un paso de *hold* a 4°C por tiempo indefinido. Al comenzar con la amplificación masiva de las primeras 30 muestras se observó una banda de amplificación inespecífica por debajo de la banda de interés (Figura 7). Este fenómeno se observó en más de la mitad de 30 muestras y en otro cuarto no se obtuvo amplificación. Con base en esto se hicieron pruebas adicionales, como aumentar la temperatura de hibridación de los iniciadores, pero la banda se eliminó al no solo elevar a 59°C sino incrementar a 34 ciclos el programa de amplificación e incrementando 30 segundos el paso de hibridación y de amplificación.

Figura 7: Geles de agarosa al 1% mostrando productos de amplificación. A. Fracción de gel de agarosa al 1% hecho el 27/01/2015. La flecha naranja apunta a la banda inespecífica de menor tamaño mientras que la banda de interés (CO1) está señalada con la flecha negra. B. Fracción de gel de agarosa al 1% hecho el 16/02/2015 con la receta optimizada final. La flecha negra indica la banda de interés. Ambas fracciones de los geles tienen los tonos invertidos para visualizar más claramente las bandas.

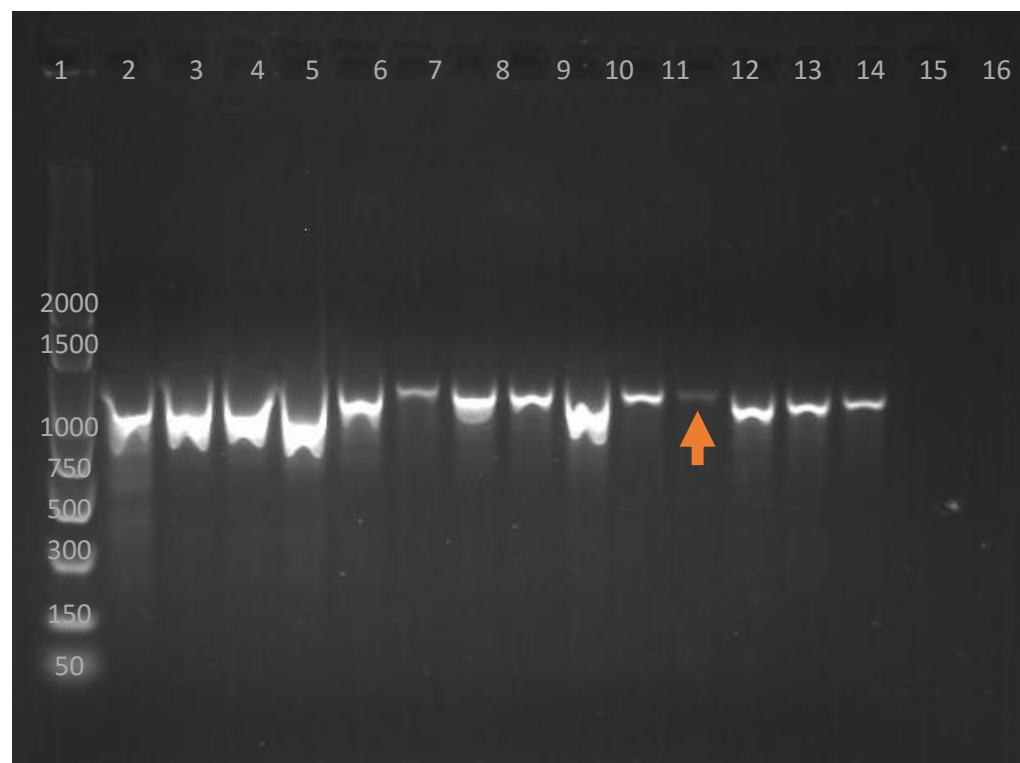


C. Secuenciación

Se enviaron a secuenciar 51 muestras. La empresa que realizó la secuenciación envió por cada muestra, 2 cromatogramas (Ejemplo: Figura 4 Anexos) en PDF y el formato

“.ab1” así como dos archivos de texto con la secuencia. Se utilizó el programa Sequencher 5.3 para visualmente optimizar la información recolectada (descartar ambigüedades, recortar los extremos que por la naturaleza del tipo de secuenciación tienen mucho ruido, etc.) así como para obtener el consenso de la secuencia del fragmento amplificado basado en la secuenciación en ambas direcciones. De las 51 secuencias enviadas, 48 vienen de una calidad aceptable para ser utilizadas en un alineamiento (Cuadro 8, Anexos). En promedio la longitud de la secuencia consenso fue de 736 pares de bases. Las secuencias de las muestras ML011, ML036 y ML037 eran de una calidad pobre y llenas de ambigüedades por lo que no se tomaron en cuenta para el resto de los análisis. En el caso de la muestra ML011 era de esperarse ya que fue la muestra más tenue en el gel de agarosa después de la purificación (Figura 8). Por el contrario, las muestras ML036 y ML037 tenían aproximadamente la misma intensidad en el gel de agarosa de purificación que las demás muestras cuya secuencia si fue obtenida correctamente. Merece la pena mencionar que La secuencia de la muestra ML022 es la secuencia más pequeña obtenida con 606 pares de bases.

Figura 8: Gel de productos purificados de PCR. Hecho el 09/02/2015, es un gel de agarosa al 1% corrido a 85 V por 45 minutos. La flecha naranja indica la muestra ML011 para la cual no se obtuvo una secuencia del tamaño esperado ni de calidad utilizable.



D. Análisis filogeográfico

Para el análisis filogeográfico, primero se alinearon las 48 secuencias por el método ClustalW por medio del programa Mega 6 (Tamura *et al.* 2013). Se encontraron 6 sitios de polimorfismo (6 SNPs) aunque a continuación solo se reportan 5. Los SNPs se encontraron en la posición 16, 590, 614, 625 y 641 (Cuadro 3) en posición relativa al comienzo del alineamiento de estas 48 secuencias. Se descartó la información de la secuencia ML022 por ser menor su secuencia a los 644 pares de bases de las otras secuencias ya que de los sitios de polimorfismo se hubieran perdido al usar un fragmento más corto. Debido a la baja variabilidad entre las secuencias de los distintos haplotipos (el haplotipo más diferente contiene 2 SNPs) y en base al trabajo realizado por Boykin *et al.* en el 2012, se decidió que la manera más robusta de analizar los datos era realizando una red de haplotipos (Figura 9). Para generar esta red de haplotipos se utilizó el paquete informático TCS (Clement *et al.* 2000) que se basa la generación de la red de mayor parsimonia a un 95% de nivel de confianza y así mismo calcula el peso del haplogrupo, valor que corresponde con la edad del haplogrupo, una medida relativa de que tan antiguo es el haplogrupo (Templeton *et al.* 1992). Para realizar el alineamiento no se utilizó una secuencia de referencia externa, como las reportadas en GenBank para el fragmento de interés, ya que el fragmento reportado al ser alineado causaba la pérdida del primer SNP del alineamiento ya que la secuencia reportada comenzaba después y terminaba después. La secuencia que se utilizó y se descartó fue la secuencia FJ190167, reportada a GenBank por Boykin *et al.* en el 2009.

En la figura 9, se observa la red de haplotipos generada por TCS, donde los diferentes colores de los círculos representan su localización geográfica y el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de ese haplotipo. Se observa que el haplotipo 1 es el más frecuente y que está distribuido en los 13 departamentos que fueron incluidos en el estudio- Alta Verapaz, El Progreso, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa- (Cuadro 4). Su gran distribución geográfica puede indicar que el haplotipo 1 es el haplotipo más antiguo presente en Guatemala (Moncayo-Donoso *et al.* 2014). Los otros 4 haplotipos son únicos

y se encuentran en regiones geográficas diferentes y separadas. El haplotipo más lejano en la red de haplotipos es el haplotipo 5, perteneciente a una muestra de Quetzaltenango, y se encuentra a 2 pasos simples de mutación del haplotipo 1.

Cuadro 3: Resumen de haplotipos y posición polimórfica observada del alineamiento de 51 secuencias de *Diaphorina citri*. Se tomó la secuencia de la muestra ML001 como la primera muestra del alineamiento en lugar de utilizar una secuencia de referencia previamente reportada y el haplotipo 1 como referencia para las demás.

Haplotipo	Posición de nucleótido relativa al inicio del alineamiento				
	16	590	614	625	641
Haplotipo 1	-	-	C	A	A
Haplotipo 2	-	-	C	G	A
Haplotipo 3	-	T	C	A	A
Haplotipo 4	C	-	C	A	A
Haplotipo 5	-	-	A	A	C

El programa TCS calculó también el peso del haplogrupo que resultó 0.96 para el haplotipo 1 y 0.01 para cada haplotipo de los otros cuatro. Aunque este valor apoya que el haplotipo 1 sea el más antiguo, en el caso de los cuatro haplotipos únicos no es un valor altamente confiable porque hay poca igualdad de haplotipos entre localidades diferentes (Boykin, *et al.* 2012). Otro factor que influye en este valor es que, aunque el esfuerzo de muestreo es igual (5 individuos por departamento en casi todos los departamentos) no es uniforme ya que por la naturaleza general del estudio no se tomó en cuenta las coordenadas exactas de recolección de las muestras y hay departamentos donde todos los individuos provienen de una misma localidad y de otros que provienen de varias. Esto se debe a la utilización de muestras almacenadas en el laboratorio de estudios previos. Otro aspecto a tomar en cuenta es que si se amplificaron los cinco individuos de cada departamento (con la excepción de Jutiapa -4- y Quiché-1-) pero no se incluyen las secuencias de todos los individuos de cada departamento, por diversas razones. De hecho, hay departamentos donde se incluyeron más individuos como Alta Verapaz, que ya cuenta con las 5 secuencias mientras que Quiché solo cuenta con 1 secuencia (Cuadro 4).

Cuadro 4: Muestras de *D. citri* utilizadas para el alineamiento. En el siguiente cuadro se reportan las muestras cuyas secuencias fueron incluidas en el alineamiento que se utilizó para generar la red de haplotipos por departamento.

Departamento	Muestras incluidas
Alta Verapaz	ML001-ML005
El Progreso	ML006, ML015, ML016, ML020
Escuintla	ML031-ML034
Huehuetenango	ML007-ML009, ML017
Izabal	ML010, ML019, ML023
Jutiapa	ML038, ML039
Quetzaltenango	ML041-ML044
Quiche	ML040
Retalhuleu	ML046-ML049
San Marcos	ML051-ML054
Santa Rosa	ML056-ML059
Suchitepéquez	ML012-ML014, ML024
Zacapa	ML026-ML029

En los departamentos donde se encontró un haplotipo únicos fueron Quetzaltenango (Haplotipo 5), Escuintla (Haplotipo 4), Suchitepéquez (Haplotipo 2) y Zacapa (Haplotipo 3) (Figura 9 y 10, Cuadro 5). La distancia geográfica entre sitios está relacionada con la variabilidad de haplotipos (Campos *et al.* 2013; Moncayo-Donoso *et al.* 2014). En este caso se observa que hay haplotipos diferentes en departamento vecinos (Quetzaltenango con Suchitepéquez y Zacapa con Izabal) pero como no se está seguro del punto de recolección de las muestras es factible que provengan de extremos opuestos del departamento que sí permite la distancia como para que hubiera diversificación. Un aspecto que también es importante son las condiciones ambientales, ya que estas afectan la diversidad de haplotipos (Sarmiento 2008).

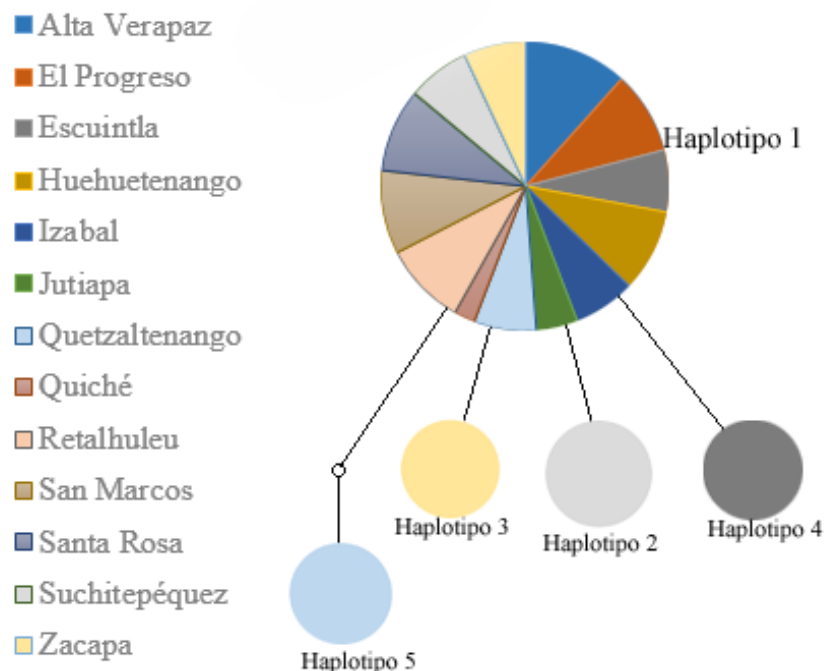
Cuadro 5: Frecuencia de haplotipos de *Diaphorina citri* y su distribución geográfica. Datos de los 13 departamentos de Guatemala que fueron incluidos en este estudio.

Departamento	Total de Individuos Secuenciados	Haplotipo 1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4	Haplotipo 5
Alta Verapaz	5	5	0	0	0	0
El Progreso	4	4	0	0	0	0
Escuintla	4	3	0	0	1	0
Huehuetenango	4	4	0	0	0	0
Izabal*	5	3	0	0	0	0
Jutiapa*	4	2	0	0	0	0
Quetzaltenango	4	3	0	0	0	1
Quiché	1	1	0	0	0	0
Retalhuleu	4	4	0	0	0	0
San Marcos	4	4	0	0	0	0
Santa Rosa	4	4	0	0	0	0
Suchitepéquez	4	3	1	0	0	0
Zacapa	4	3	0	1	0	0
Total	51	43	1	1	1	1

* En estos departamentos se encuentran las secuencias que se obtuvieron de baja calidad para las cuales no se pudo determinar el haplotipo.

En Guatemala se puede observar un haplotipo característico (Haplotipo 1) que como ya se mencionó antes sea el más antiguo debido a su amplia distribución geográfica (Moncayo-Donoso *et al.* 2014). Por otro lado, los cuatro haplotipos únicos son resultado de mutaciones puntuales posiblemente debido a diferentes factores ambientales, presión de insecticidas, control biológico de la plaga, disponibilidad de alimento entre otras cosas (Sarmiento 2008). La poca cantidad de haplotipos y que el más lejano se encuentre a solo dos pasos mutacionales (Haplotipo 5, Quetzaltenango) implica que hay una baja diferenciación genética que puede deberse a lo reciente de la introducción del vector, a que haya una similitud entre las características del lugar de origen del vector con Guatemala, o que el programa de manejo que se está utilizando no está promoviendo la diferenciación genética. Una fuerte diferenciación genética implica entre 40-50 pasos mutacionales (SNPs) entre haplotipos y un número similar de haplotipos diferentes (Campos *et al.* 2013). En Guatemala y en general, *D. citri* no parece ser un complejo de especies ni estar pasando por un proceso de especiación. Aun así, es de esperar que con el paso del tiempo la variabilidad incremente (Boykin *et al.* 2012).

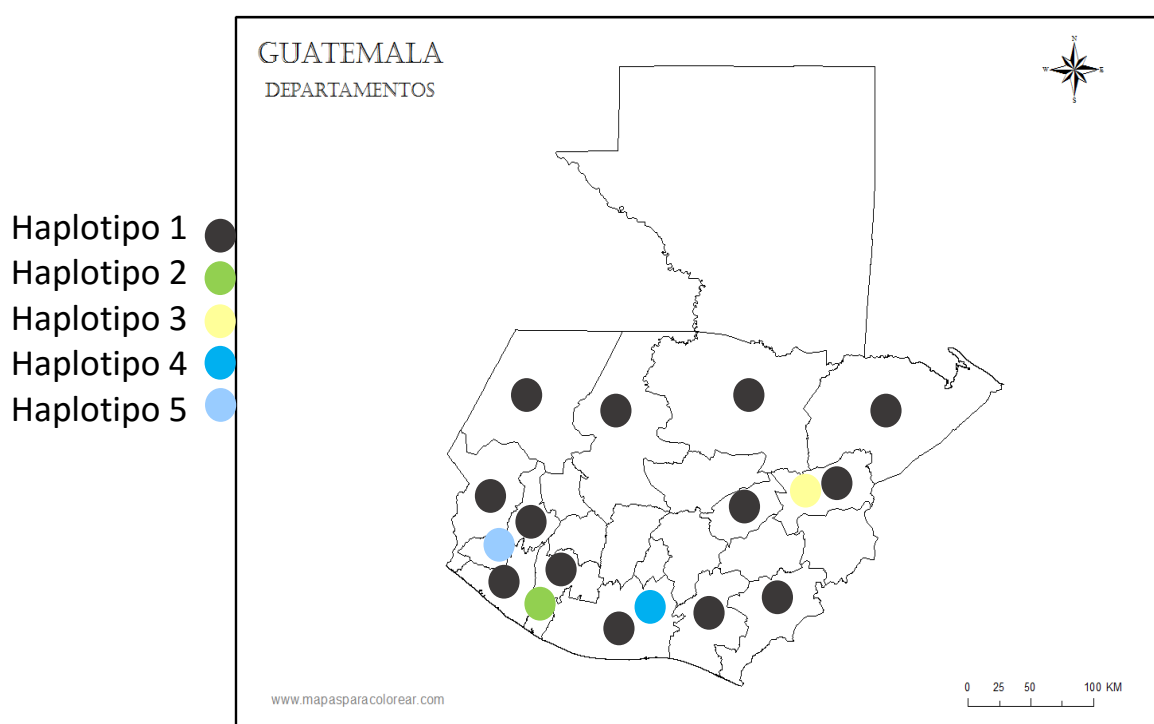
Figura 9: Red de haplotipos de *D. citri*. La red de haplotipos fue generada por TCS. El tamaño de cada círculo representa la frecuencia de ese haplotipo y los colores representan un departamento de Guatemala. Quetzaltenango.



El tiempo es importante, ya que *D. citri* lleva alrededor de 15 años de haber sido introducida en América. Esto es importante porque, aunque hay un reporte del insecto en Honduras en 1989, durante toda la década de los 90 no colectaron organismos en Honduras. Luego el reporte empieza en 1998 en Florida, 2002 en Belice en México (Halbert y Nuñez 2004). En Guatemala no hay reportes de *D. citri* o de HLB hasta el año 2010 (Noticias.com.gt 2010). Es posible que el evento de invasión del vector haya ocurrido un año antes ya que cuando se menciona ya había afectado a varios lugares. Varios individuos genéticamente similares es una característica de expansión reciente (Moncayo-Donoso *et al.* 2014), menos de 6 años en Guatemala. Es importante mencionar que, a diferencia de otros vectores, *D. citri* tiene una reducida capacidad de movimiento por sí misma (Chiyaka *et al.* 2012; Tatitani *et al.* 2008) por lo que hay poco intercambio genético entre poblaciones distantes (Campos *et al.* 2013). Por lo mismo, la dispersión de este vector es probable que se haya dado en su mayoría por actividad antropogénica (Boykin *et al.* 2012) en especial debido a la importancia económica elevada del cultivo de cítricos en Guatemala.

Figura 10: Mapa de distribución de los haplotipos encontrados. Se puede observar que El haplotipo 1 se encontró en los trece departamentos incluidos en el estudio, mientras que el haplotipo 2 se encontró en Suchitepéquez, el haplotipo 3 en Zacapa, el haplotipo 4 en Escuintla y el haplotipo 5 en Quetzaltenango.

EL mapa fue adaptado de <http://www.mapasparacolorear.com/guatemala/mapa-guatemala.php>



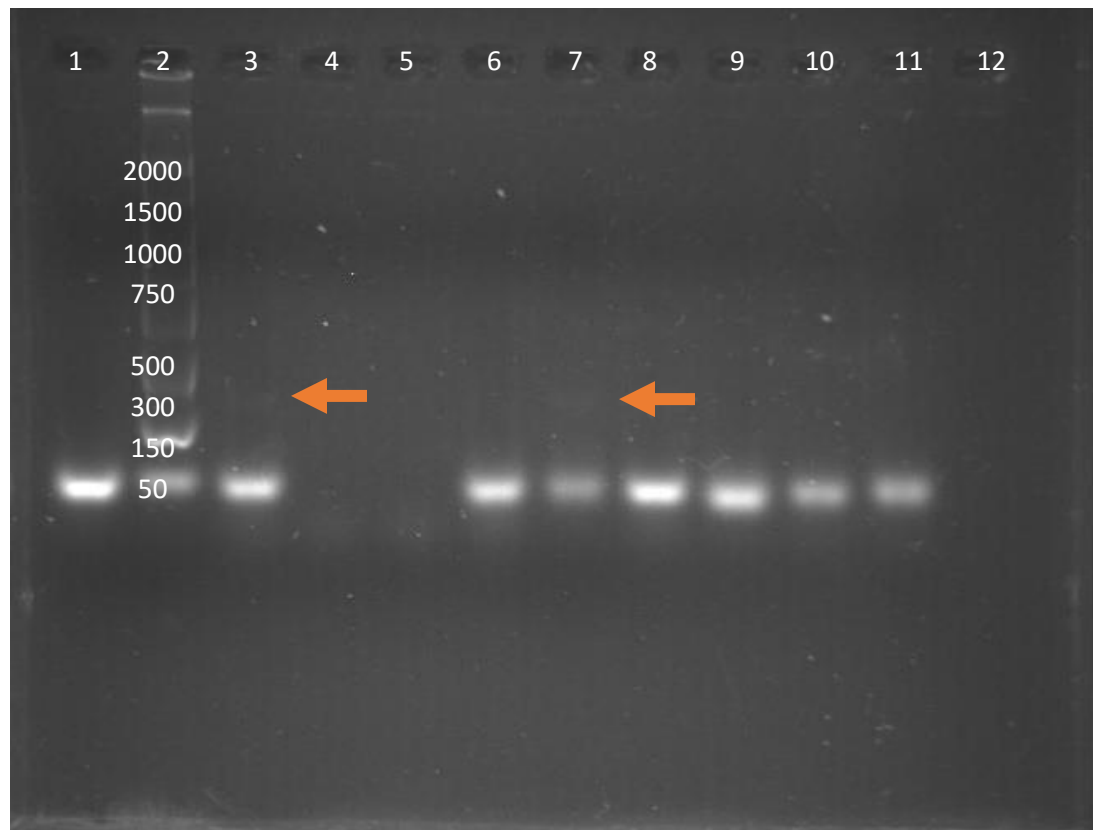
Pareciera ser que en Guatemala hubo un único evento de introducción del vector (por la distribución tan grande del haplotipo 1) o que hubiera habido varios eventos de introducción provenientes de la misma fuente o que haya habido varios eventos de introducción con el mismo haplotipo. No pareciera ser posible que el haplotipo 1 fuera una haplotipo nativo de Guatemala porque no hay referencias en donde se describa la presencia de *D. citri* en el país antes de 2010. Es una situación muy diferente a la que se encuentra en Brasil en donde por lo menos se espera que haya habido dos eventos separados de introducción. Esto se explica ya que en el muestreo realizado por Boykin *et al.* en 2012 no se encontró co-habitación de dos haplotipos diferentes. Lo cual no es el caso en este estudio ya que el haplotipo 1 se encuentra presente en todos los departamentos donde se han encontrado haplotipos únicos.

Lo importante de este estudio, a pesar de sus limitaciones de tiempo, recursos y sitios incluidos, es que ahora se conoce por lo menos a grandes rasgos la composición haplotípica de *D. citri* en Guatemala. Esto permite que se tomen decisiones de cómo manejar integralmente la plaga de la misma. Primeramente, es muy importante que el plan implementado disminuya o mantenga una baja variabilidad genética del vector (Moncayo-Donoso *et al.* 2014). Esto implica educar a las personas en el uso apropiado de los insecticidas y la importancia de cumplir con las instrucciones de los mismos y no utilizar siempre la misma combinación o un único insecticida ya que ha sido demostrado que la utilización regular de un mismo insecticida genera presión de selección y favorece la presencia y expansión de haplotipos únicos (Bass y Field 2011). Haber identificado donde se encuentran los haplotipos únicos sienta una base para estudios nuevos en los cuales se analicen diversos factores ambientales y de manejo de los cultivos de cítricos para encontrar las posibles causas de los eventos de mutación. Así mismo es evidencia de la necesidad de un muestreo a mayor escala y la implementación de un análisis similar a través de mayor tiempo para monitorear la diversidad del vector y asegurar que los programas de manejo y prevención que haya o vayan a ser implementados estén funcionando (Beebe *et al.* 2005).

E. Detección de bacteria ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’.

Se hizo la detección de la presencia de la bacteria causante de HLB por medio de un PCR de punto final con la esperanza de poder utilizar esta información para establecer una relación entre la presencia o ausencia de la bacteria y el haplotipo específico del insecto. Lastimosamente, de los 51 insectos utilizados para secuenciar en únicamente tres de ellos se encontró la presencia de la bacteria. En las muestras donde hubo presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* fue en: ML002, ML008 y ML010, provenientes de Alta Verapaz, Huehuetenango e Izabal (Figura 11).

Figura 11: Gel de agarosa al 2% para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. En este gel se cargaron las muestras de Huehuetenango e Izabal. Las flechas naranjas señalan las bandas de la presencia positiva de la bacteria causante de HLB.



VII. CONCLUSIONES

- A. La temperatura óptima de hibridación de los iniciadores reportados por Boykin *et al.* es de 59°C, el tiempo de hibridación y el de extensión debe ser de minuto y medio y el programa debe tener 34 ciclos para la amplificación óptima de la secuencia de interés.
- B. Se obtuvo la secuencia del gen CO1 para 48 individuos de *D. citri* de los 13 departamentos incluidos en el estudio, con un promedio de 736 ± 43 nucleótidos.
- C. Se encontraron cinco polimorfismos de un solo nucleótido en el alineamiento de 47 secuencias de 644 pares de bases.
- D. Se encontraron cinco haplotipos diferentes en los 13 departamentos de Guatemala. El haplotipo 1 es el más abundante (91.5%) y se encontró en los 13 departamentos. Los demás haplotipos 2-5 (2.125% c/u) se encontraron en Suchitepéquez, Zacapa, Escuintla y Quetzaltenango, respectivamente.
- E. Se elaboró una red de haplotipos con la información generada de la secuencia del gen CO1 de *D. citri* presentes en 13 departamentos de Guatemala (Alta Verapaz, El Progreso, Huehuetenango, Izabal, Suchitepéquez, Zacapa, Escuintla, Jutiapa, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos y Santa Rosa).
- F. El haplotipo 5 es el más diferente del haplotipo 1 y se encuentra a dos pasos mutacionales de este.
- G. Hay una diversidad muy pequeña entre individuos de diferentes poblaciones del insecto.
- H. En Guatemala pareciera haber un único evento de introducción del vector o por lo menos que hubo varios eventos de introducción con vectores del mismo haplotipo.
- I. La presencia de la bacteria causante de HLB se detectó en el 5% de las muestras analizadas.

VIII. RECOMENDACIONES

- A. Realizar un estudio con más individuos en los departamentos donde se encontraron haplotipos diferentes para confirmar que los haplotipos encontrados son los únicos que hay o si hay más.
- B. Hacer un estudio en donde se incluyan todos los departamentos de Guatemala donde se ha reportado *D. citri* para completar la línea base de haplotipos presentes en el país y confirmar si únicamente hubo un evento de introducción o si hubo otro en algún departamento no incluido en este estudio.
- C. Realizar un estudio donde se analicen otros parámetros que puedan ser los causantes de las variaciones entre los haplotipos, como altitud, condiciones climáticas, cultivo, época del año, plan de manejo utilizado en las plantaciones, etc. en conjunto con las secuencias de CO1 para saber qué condiciones están generando las mutaciones.
- D. Tratar las muestras que los requieran ya sea con ARNasa o proteinasa K antes de utilizar el ADN para la amplificación del fragmento de CO1 para obtener una amplificación más definida.
- E. Estandarizar un rango de concentración de ADN más estrecho al que funcione la reacción de amplificación para finalizar la optimización del proceso de detección.
- F. Re-amplificar muestras cuyas bandas sean tenues en la visualización posterior a la purificación del producto de PCR para asegurar que se obtendrá una secuencia utilizable del gen CO1.

IX. LITERATURA CITADA

- ANACAFE. 2004. Cultivo de limón persa. Programa de diversificación de ingresos de la empresa cafetalera. <http://portal.anacafe.org/Portal/Documents/Documents/2004-12/33/11/Cultivo%20de%20Lim%C3%B3n%20Persa.pdf> [con acceso el 7 de marzo de 2014].
- Anchor, Diann S., *et al.* 2010. «Sequence of anatomical symptoms observations in citrus affected with Huanglongbing disease». *Plant Pathology Journal*. 9(2): 56-64.
- Awise, J.C. *et al.* 1987. «Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics». *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 18(1987):489-522.
- Bass, Chris y Lin Field. 2011. «Gene amplification and insecticide resistance». *Pest Management Science*. 67(8): 886-890.
- Bassanezi, Renato Beozzo; J. Belasque Jr. y L.H. Montesino. 2013. «Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics». *Crop Protection*. 52(2013): 72-77
- Beard, Sam S. y Ian A.W. Scott. 2013. «A rapid method for detection and quantification of the vector-borne bacterium ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in the tomato potato psyllid, *Bactericera cockerelli*». *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 147(2013):196-200.
- Beebe, Nigel W.; P. Whelan, A. van den Hurk, S. Ritchie y R. Cooper. 2005. «Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and mainland incursion monitoring». *CDI*. 29(3): 299-304.
- Bové, Joseph-Marie. 2006 «Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus». *Journal of Plant pathology*. 88(1): 7-37
- Boykin, Laura M. *et al.* 2012. «Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: two Old World lineages and a New World invasion». *Bulletin of Entomological Research*. 102(2012):573-582.

- Brlansky, Ronald H. y M.E. Rogers. 2007. «Citrus Huanglongbing: Understanding the vector-pathogen interaction for disease management». APSnet Features. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Huanglongbing.aspx> [con acceso el 9 de febrero de 2014].
- Campos, Ricardo, *et al.*. 2013. «High phylogeographic structure in sylvatic vectors of Chagas disease of the genus *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae)». *Infection, Genetics and Evolution*. 19(2013): 280-286.
- Catling, H.D. 1970. «Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*». *FAO, Plant Protection Bulletin*. 18: 8-15.
- Chiyaka, Christinah, *et al.* 2012. «Modeling huanglongbing transmission within a citrus tree». *PNAS*. 109(30): 12213-12218.
- Clement, Mark; David. Posada y K. Crandall. 2000. «TCS: a computer program to estimate gene genealogies». *Molecular Ecology*. 9(10): 1657-1660.
- Crandall, Keith y Alan Templeton. 1993. «Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction». *Genetics*. 134(1993): 959-969.
- Dinsdale, A.; L. Cook, C. Riginos, Y. Buckley y P. de Barro. 2010. «Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries». *Annals of the Entomological Society of America*. 103(2): 196-208.
- Doddapaneni, Harshavardhan, *et al.* 2008. «Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analysis of the Citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium *Candidatus Liberibacter*». *BioMed Central Research notes* 2008, 1: 72, doi: 10.1186/1756-0500-1-72.
- Elkins, Kelly. 2012. **Determination of DNA Quality and Quantity Using UV-Vis Spectroscopy**. En: Elkins, K., (Ilustrada). *Forensic DNA Biology: A Laboratory Manual*. Academic Press, Oxford, Inglaterra. Pp. 59-62
- Gottwald, Tim R.; J.V. Da Graca y R. B. Bassanezi. 2007. «Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact». *Plant Management Network*.

- <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2007/huanglongbing/> [con acceso el 9 de febrero de 2014]
- Gottwald, Tim R. *et al.* 2008. «Within-tree spatial distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus*». *Proc. Int. Res. Conf. Huanglongbing*. Pp 310-290.
<http://www.plantmanagementnetwork.org/proceedings/irchlb/2008/Proceedings.Conference.on.HLB.2008.V14.pdf> [con acceso el 19 de febrero de 2014].
- Gottwald, Tim R. 2010. «Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing». *Annual Review of Phytopathology*. 2010. 48: 119-139.
- Grafton- Cardwell, Elizabeth, *et al.* 2006. «Asian citrus psyllid». *University of California. Division of agriculture and Natural Resources (ANR)*. Publicación 8205.
- Halbert, Susan y Carmelo Nuñez. 2004. «Distribution of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhyncota: Psyllidae) in the Caribbean basin». *Florida Entomologist*. 87 : 401-402.
- Hall, David, *et al.* 2013. «Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease». *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 146(2): 207-223.
- Heaton, Paul y Jacquie T. Keer 2008. **DNA Quantification**. En: Birch y Keer (Ilustrada). *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A robust approach*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra. Pp. 83-100.
- Hickerson, M.J.; *et al.* 2010. «Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000». *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54(2010):291-301.
- Hung, T.H.; M.L. Wu y H.J. Su. 1999. «Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction.». *Journal of Phytopathology*. 147(1999):599-604.
- Ichinose, Katsuya, *et al.* 2012. «Limited efficacy of guava interplanting on citrus greening disease: Effectiveness of protection against disease invasion breaks down after one year». *Crop Protection*. 34(2012): 119-126.
- Islam, MD-Sajedul, *et al.* 2012. «Multilocus microsatellite analysis of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing worldwide». *BioMed Central Microbiology*. 2012,12:39.

- Jagoueix, Sandrine; J.M. Bové yM. Garnier. 1994. «The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of *Proteobacteria*». *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(3): 379-386.
- Jagoueix, Sandrine; J.M. Bové yM. Garnier. 1996. «PCR detection of the two ‘Candidatus’ *Liberibacter* species associated with greening disease of citrus». *Molecular and Cellular probes*. 10(1996): 43-50.
- Kuhner, M.K. 2008. «Coalescent genealogy samplers: windows into population history». *Trends in Ecology and Evolution*. 24(208):86-93.
- MAGA. S/F. «¿Sabe usted que es la enfermedad de HUANGLONGBING-HLB-? ¿Que afecta a los cítricos? ». Documento. 2pp. <http://visar.maga.gob.gt/visar/img/hlb.pdf> [con acceso el 12 de febrero de 2014].
- Mollinedo, Erick. 2014. «Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae), mediante PCR de punto final en Guatemala (2013-2014)». Tesis. Universidad del Valle de Guatemala
- Moncayo-Donoso, Miguel Angel; *et al.*.2014. «Diversidad genética de *Diaphorina citri* en cultivos cítricos del Valle de Cauca y Quindío (Colombia)». *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 12(2): 106-114.
- Monteiro, Fernando; M. Donnelly, C. Beard y J. Costa. 2004. «Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northern Brazil». *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32(2004): 46-56.
- Noticias.com.gt. 2010. «Controlan plaga que afecta cítricos». Documento.1 pp de <http://noticias.com.gt/nacionales/20101209-controlan-plaga-que-afecta-citricos.html> [con acceso el 1 de mayo de 2015].
- Qureshi, Jawwad A. y P. A. Stansly. 2010. «Dormant season foliar sprays of broad-spectrum insecticides: An effective component of integrated management for *Diaphorina citri* (Hemiptera Psyllidae) in citrus orchards». *Crop protection*. 29(2010): 860-866.
- Sarmiento, L. 2008. «Variabilidad genética de poblaciones mexicanas de la cochinilla rosada del hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae)». Tesis Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Mexico. 61 pps.

- Sechler, A. *et al.* 2009. «Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’ Associated with Huanglongbing». *Phytopathology*. 99 (5): 480-486.
- Shokrollah, Hajivand, *et al.* 2011. «Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia». *Crop Protection*. 30(2011): 521-525.
- Swisher, Kylie *et al.*. 2013. «Haplotypes of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, on the wild host plant, *Solanum dulcamara*, in the Pacific Northwestern United States». *American Journal of Potato Research*. 90(2013): 570-577.
- Tamura, K., *et al.*.2013. «MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0». *Molecular Biology and Evolution*. 30(2013): 2725-2729.
- Tapia, Guisela. 2010. «Situación actual, regulación y estrategias para el control del Huanglongbing (HLB) en la región del OIRSA». OIRSA.
- Tatineni, Satyanarayanna, *et al.*2008. «In Planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR». *Phytopathology*. 99(5): 592-599.
- Templeton, Alan, Keith Crandall y Charles Sing. 1992. «A cladistics analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data.». *Genetics*. 132: 619-633.
- Zhang, Qiu-ming, *et al.* 2013. «Deciphering the bacterial microbiome of citrus plants in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’- infection and antibiotic treatments ». *PLOS One*. 8(11): e 76331.

X. ANEXOS

Cuadro 1: Componentes y sus respectivas concentraciones del *buffer* de extracción CTAB 2%.

Componente	Concentración
CTAB	2% (p/v)
Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM
NaCl	1.4 M

Cuadro 2: Receta optimizada de la reacción de PCR para la amplificación de una región del gen mitocondrial para el citocromo oxidasa 1 de *Diaphorina citri*.

Reactivo	Ci	Cf	1 reacción
Agua	-	-	16.33
Buffer sin MgCl ₂	10x	1x	2.5
MgCl ₂	25 mM	1.65 mM	1.65
Iniciador DCITRICO1L	12.5 µM	0.33µM	0.66
Iniciador CCITRICO1R	12.5 µM	0.33µM	0.66
dNTPs	2.5 mM	0.1 µM	1
Taq	5 U/µl	0.04 U/µl	0.2
DNA	-	5-135 ng/µl	2
Volumen total			25

Cuadro 3: Programa de amplificación para el PCR de una región del gen mitocondrial para el citocromo oxidasa 1 de *Diaphorina citri*.

Paso	Nombre	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	95 °C	2 min.
	Desnaturalización	95 °C	1 min.
34	Hibridización	59°C	1 :30min.
	Amplificación	72 °C	1 :30 min.
1	Terminación	72 °C	10 min.
1	Hold	4 °C	Infinito

Cuadro 4: Receta de amplificación para la detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Reactivo	Ci	Cf
Agua DEPC	-	-
Buffer sin MgCL2	10x	1.25x
MgCl2	25 mM	1.8 mM
Iniciador HLB 1999F	8.25 μ M	0.20 μ M
Iniciador HLB 1999R	8.25 μ M	0.20 μ M
dNTPs	2.5 mM	0.125 μ M
Taq	5 U/ μ l	0.04 U/ μ l
DNA	-	50-100 ng/ μ l
	Volumen total	21 μ l

Cuadro 5: Programa final de amplificación para los iniciadores HLB1999

Paso	Nombre	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	94 °C	3 min.
32	Desnaturalización	94 °C	1 min.
	Hibridización	60 °C	1 min.
	Amplificación	72 °C	2 min.
1	Terminación	72 °C	10 min.
1	Hold	4 °C	Infinito

Cuadro 6: Codificación de las muestras y el respectivo departamento donde fueron colectados los psílicos.

Codificación	Departamento	Codificación	Departamento
ML001	Alta Verapaz	ML042	Quetzaltenango
ML002	Alta Verapaz	ML043	Quetzaltenango
ML003	Alta Verapaz	ML044	Quetzaltenango
ML004	Alta Verapaz	ML045	Quetzaltenango
ML005	Alta Verapaz	ML040	Quiché
ML006	El Progreso	ML046	Retalhuleu
ML015	El Progreso	ML047	Retalhuleu
ML016	El Progreso	ML048	Retalhuleu
ML020	El Progreso	ML049	Retalhuleu
ML021	El Progreso	ML050	Retalhuleu
ML031	Escuintla	ML051	San Marcos
ML032	Escuintla	ML052	San Marcos
ML033	Escuintla	ML053	San Marcos
ML034	Escuintla	ML054	San Marcos
ML035	Escuintla	ML055	San Marcos
ML007	Huehuetenango	ML056	Santa Rosa
ML008	Huehuetenango	ML057	Santa Rosa
ML009	Huehuetenango	ML058	Santa Rosa
ML017	Huehuetenango	ML059	Santa Rosa
ML018	Huehuetenango	ML060	Santa Rosa
ML010	Izabal	ML012	Suchitepequez
ML011	Izabal	ML013	Suchitepequez
ML019	Izabal	ML014	Suchitepequez
ML022	Izabal	ML024	Suchitepequez
ML023	Izabal	ML025	Suchitepequez
ML036	Jutiapa	ML026	Zacapa
ML037	Jutiapa	ML027	Zacapa
ML038	Jutiapa	ML028	Zacapa
ML039	Jutiapa	ML029	Zacapa
ML041	Quetzaltenango	ML030	Zacapa

Cuadro 7: Muestras que ya se secuenciaron con su tamaño de la secuencia después de la optimización utilizando Sequencher 5.3.

Muestra	Tamaño de la secuencia (pb)	Muestra	Tamaño de la secuencia (pb)
ML001	874	ML029	740
ML002	790	ML031	691
ML003	712	ML032	732
ML004	721	ML033	752
ML005	716	ML034	740
ML006	655	ML038	773
ML007	726	ML039	740
ML008	708	ML040	740
ML009	721	ML041	732
ML010	727	ML042	722
ML012	726	ML043	814
ML013	883	ML044	740
ML014	716	ML046	742
ML015	723	ML047	750
ML016	732	ML048	740
ML017	740	ML049	735
ML019	742	ML051	740
ML020	750	ML052	750
ML022*	606	ML053	750
ML023	720	ML054	750
ML024	701	ML056	745
ML026	676	ML057	750
ML027	694	ML058	740
ML028	713	ML059	740

*Esta es la secuencia más pequeña

Cuadro 8: Secuencias de las muestras como se incluyeron en el alineamiento antes de recortar el alineamiento para que todas quedaran del mismo tamaño.

Muestra	Secuencia
ML001	<p>CTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTAT TGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTA CCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTAGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAG GATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTTCTTCATGACACTTAT TATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATT AACAGGAAATACAATAAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTCCCCCAA CACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGG GTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATA</p>
ML002	<p>ATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAA TAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCA CGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTAGACTAGCTACAATTTACGGAA TAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATT TGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTAA GAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTCCCCCAACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCC AGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCT</p>
ML003	<p>AAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTAC ATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGAT GTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTAGACTAGCTACAA TTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGG AGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAG GGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAACCTTACTTAAAGC TCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTCCCCCAACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACT TCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATA ATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTG</p>

Muestra	Secuencia
ML004	<p>CCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTCAGCATTG GTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCT ACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTA AAGCTCAATTTTAAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTA</p>
ML005	<p>TCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTCAGCATTGAGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAAT TTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATA ATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTT CATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTT CATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTG ATACCTTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACC TTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTAT TTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATT</p>
ML006	<p>TCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTCAGCATTG GGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGC TACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTA AAGCTCAATTTTAAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTG</p>
ML007	<p>CCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTCAGCATTG GTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCT ACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTA AAGCTCAATTTTAAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAAT</p>

Muestra	Secuencia
ML008	CATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGA ATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTC ACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTTGACTAGCTACAATTTACGGA ATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTT AGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTTACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTAT TTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTAA AGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATC CAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCT GAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATT
ML009	TCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCC GGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTTGACTAGC TACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTTACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAACCTTACTTAA AAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGT
ML010	TCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCC GGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTTGACTAGC TACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTTACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAACCTTACTTAA AAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTG
ML012	GTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACAT TAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGT AGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTACTGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAG TAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTTACTATGTGCTATCAATAGGG GCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAACCTTACTTAAAGCTC AATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTC GAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTTCAGTATTACTACTTATAAT CATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAA

Muestra	Secuencia
ML014	<p>TCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTC GGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTT TAGTTGACTAGC TACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAATAAAAAC TTTACTTA AAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAA</p>
ML015	<p>TGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTC CATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGT AGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTT TAGTTGA CTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAG GACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTG CTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAATAAAAAC TTT TACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCC ACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATT ACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTG</p>
ML016	<p>TTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTA CTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTT TAG TTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAG GAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTAT GTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAATAAAA CTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATG CCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGT ATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGTCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA</p>
ML017	<p>TTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTA CTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTT TAG TTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAG GAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTAT GTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAATAAAA CTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATG CCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGT ATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA</p>

Muestra	Secuencia
ML019	GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAG CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGTA TAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGG ACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGC TATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTT ACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCA CGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTA CTACTTATAATCATTATCTGAGAAGTCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTAT
ML020	TCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAAT TTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATA ATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTT CATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTT CATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTG ATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACC TTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTAT TTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTG TTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAAT
ML023	TTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGC TATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAG CAACCATAATTTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTTCTCC AAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGAC ATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATT TATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTA AACACTACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTG AAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTA ATCGAATTGTTTTATT
ML024	TAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGG AATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACC ATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTA TTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATT CTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTA TTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACT ACCTTTTTCCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATAT TATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTT

Muestra	Secuencia
ML026	<p>TGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCT ATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAG CAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCC AAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGAC ATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATT TATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTA AACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTG AAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTA ATCGAATTGT</p>
ML027	<p>CTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTAT TGTATGAGCTCACACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTA CCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAG GATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTAT TATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATT AACAGGAAATACAATAAAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAA CACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGG GTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATA GAAATTATATAAATAAGAAATGAATGC</p>
ML028	<p>TTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTTAAAACCTTC AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACACATATTTACTG TAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTG ACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGA GGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGT GCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAAAC TACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCC ACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATT ACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTAATCGAATTGTTTTATTCA</p>
ML029	<p>CTTCAGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGCGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTAT GCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTT ATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAT AAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAAT CATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACC TCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCT TCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGC AATAACT</p>

Muestra	Secuencia
ML031	CATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCAT TCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAG CTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTT ACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATC AATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAACCTTACTT AAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGAC GATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTAC TTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTT
ML032	TATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGA GGTAACCTTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACC ACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AATTTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTT TTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCA CTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAA TAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTT ATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACT ATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATT
ML033	GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAG CATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGAC TAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGG ACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCT TATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAACCTT ACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCA CGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTA CTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAAT
ML034	CTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTAT TGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTA CCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAG GATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTAT TATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATT AACAGGAAATACAATAAATAAAAACCTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAA CACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGG GTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATT

Muestra	Secuencia
ML038	<p>CTGAAGTATACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCCG TACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATA GATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTA CAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTAC AGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAA TAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAA AGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGA TACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTT ATAATCATTATCTGAGAAGTCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAAT</p>
ML039	<p>TTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAAT TTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGA GCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAA AAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCA AATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGC CATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGA ACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAG ATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAG AAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAAT</p>
ML040	<p>TCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCC GGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGC TACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTA CAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCA ATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAA AAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACG ATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACT TATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTAT</p>
ML041	<p>TACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCCGGTACATTAG GAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGA CTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTAC GGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAA TTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCT GTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATT TTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAAC TATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATT ATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTAT</p>

Muestra	Secuencia
ML042	<p>TTTAGGAGGTGGGAGACCCAATCTTATACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGG TTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACTTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAG CTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCA GCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTGTAGTACTAGTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTC CAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGA CATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGAT TTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAATTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGT AAACTACTCTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTTCT GAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCAATATTTTCAGTATTACTACTTATAATCCTTATTTGAGAATCAAGAACCTCT AATCGAAGTATGATACAACCAACTACAAAATTTCCCCCCCC</p>
ML043	<p>GTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACTTCAGCATTTCGGTACAT TAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGT AGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTGTAGTACTAGTACAAT TACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAG TAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGG GCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAATTTACTTAAAGCTC AATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACTACTCTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTC GAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAAT CATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATA</p>
ML044	<p>CATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGA AAGAGGTA AAAACTTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCT CACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAA TTAAAATTTTTAGTTGACTAGTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTC CTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGC CCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATA CAATAAATAAAAATTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACTACTACTCTTTTCCCAACACTTCTTAGG ACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTT CACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAAT</p>
ML046	<p>TTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACTTC AGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTG TAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTGTAGT ACTAGTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGG GACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGT GCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAAAT TTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACTACTCTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCC ACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATT ACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTA</p>

Muestra	Secuencia
ML047	GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAG CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGAC TAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGG ACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGC TATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAATAAAAAC TTT ACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCA CGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTA CTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAAT
ML048	GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAG CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGAC TAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGG ACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGC TATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAAATAAAAAC TTT ACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCA CGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTA CTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTAT
ML049	TTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGG TAAAAC TTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCAC ATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAA TTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTT ACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACT TTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATA AATAAAAAC TTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTAT AGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTAT TTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCA
ML052	GATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAA AACTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATAT TTA CTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTT TAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAG TAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCAC TATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATA AAAC TTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGG AATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTT CAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAG

Muestra	Secuencia
ML053	<p>TCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGT AAAAC TTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACA TATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA TTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTT CAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTT TCACATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATA AATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTAT AGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTTCTGAAATATTATTCTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTAT TTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAA</p>
ML054	<p>TTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAA GAGGTAAAAC TTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCA CCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATT AAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCT TTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCC ACTTTCACATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACA ATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGAC TTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTTCTGAAATATTATTCTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCA CTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTG</p>
ML056	<p>TTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGG TAAAAC TTCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCAC ATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA TTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTT ACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTT TTCACATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATA AATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTAT AGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTTCTGAAATATTATTCTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTAT TTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAA</p>
ML057	<p>GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAG CATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA TTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTT ACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTT TCACATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATA AAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTAT AGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTTCTGAAATATTATTCTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTAT TTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAA</p>

Muestra	Secuencia
ML058	GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACTTCAG CATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTAGTTGAC TAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGG AGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATG TGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAAAC TTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGC CACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTAT TACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAAT
ML059	GGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACTTCAG CATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTAGTTGAC TAGCTACAATTTACGGAATAAAAATAAAATTTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGG ACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCCACTTTCACTATGTGC TATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTT ACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCA CGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTA CTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAAT

Figura 1: Gel de integridad al 1% de agarosa del 27/01/2015. Corrido a 85 V por 45 minutos con las muestras ML001-ML006. ML015, ML016, ML020, ML021, ML007-ML009, ML017 y ML018 respectivamente empezando en el pozo 1. Las muestras pertenecen a los departamentos de Alta Verapaz, El Progreso y Huehuetenango.

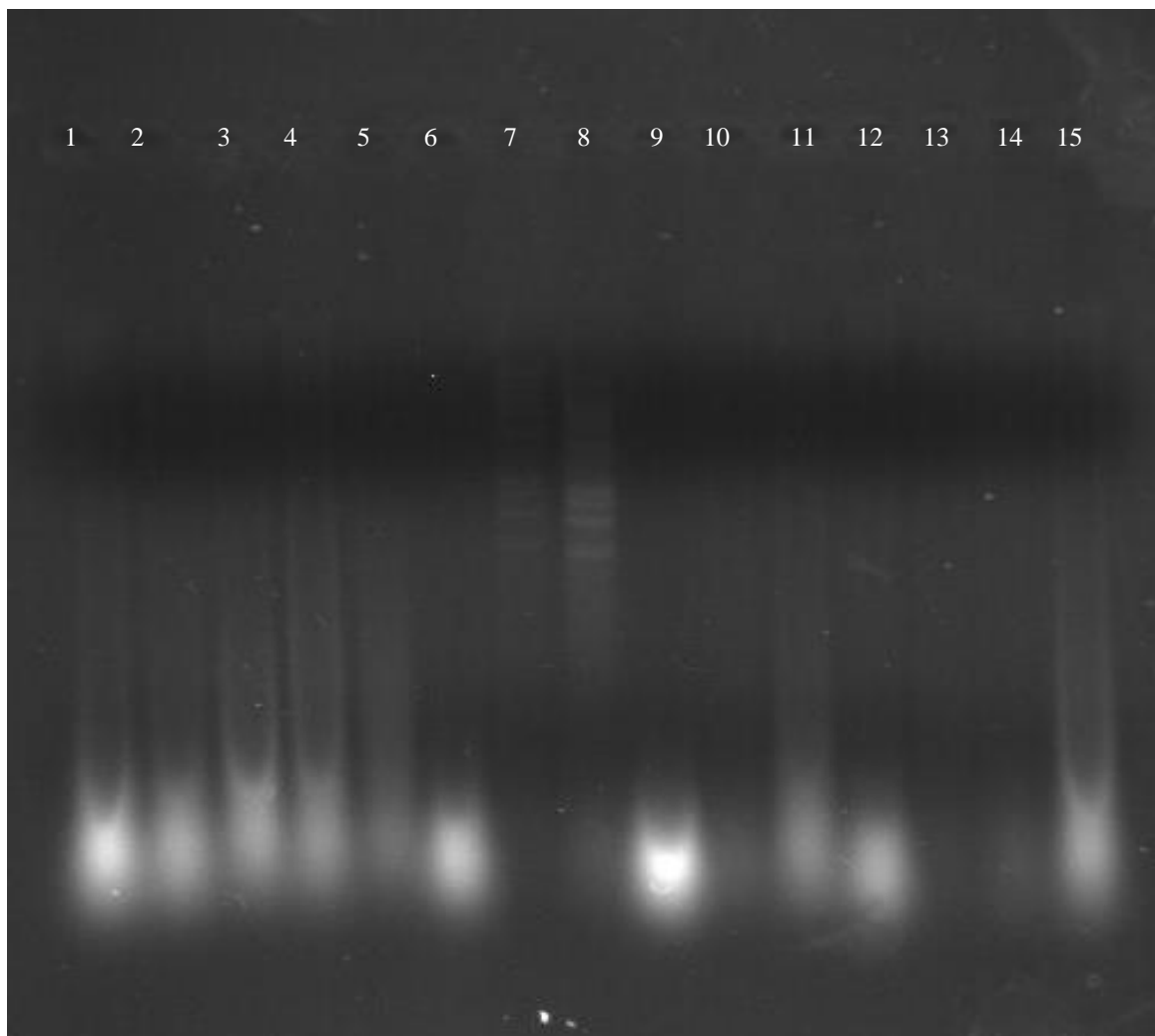


Figura 2: Resultados de amplificación a diferentes temperaturas de hibridación de los iniciadores. Gel de agarosa al 1% corrido a 85 V por 45 minutos.

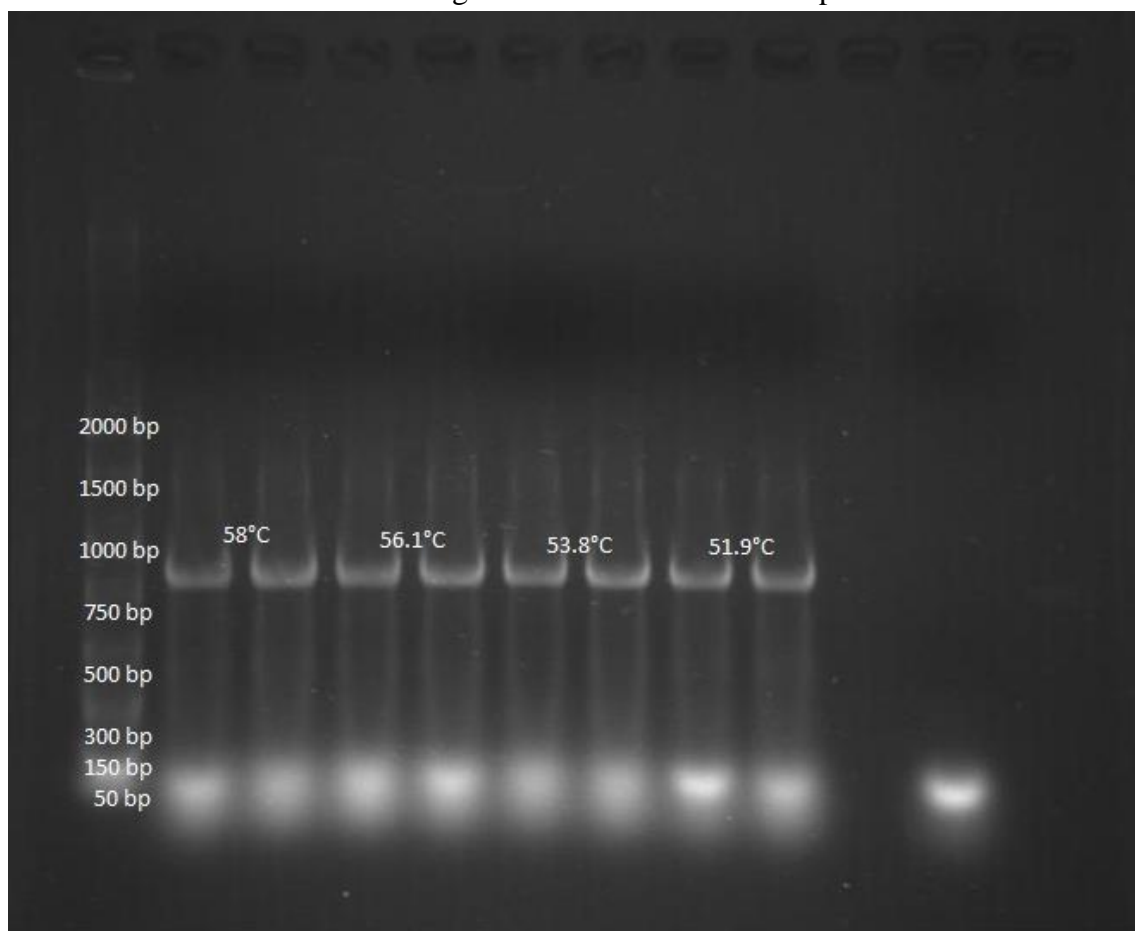


Figura 3: Gel de agarosa al 1% hecho el 10 de marzo del 2015 con el PCR optimizado. Corrido a 85 V por 45 minutos con las muestras ML031-ML035 en triplicado.

