



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOPATOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DEL
Tomato spotted wilt virus (TSWV) EN AISLAMIENTOS MÉXICANOS**

BLANCA ESTELA GONZÁLEZ PACHECO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: "Caracterización biológica y molecular del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en aislamientos mexicanos" realizada por la alumna Blanca Estela González Pacheco, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

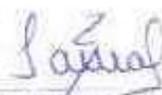
ETIOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. DANIEL E. SOTOCA MARTÍNEZ

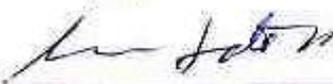
ASERORA:


DRA. LAURA SILVA ROSALES

ASERORA:


DRA. REYNA ROJAS MARTÍNEZ

ASERORA:


DR. RAMÓN MARCO SOTO HERNÁNDEZ

ASERORA:


DR. ROBERTO RIVAS MEDRANO

Montecillo, Texcoco, México, 10 de marzo del 2014.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DEL *Tomato spotted wilt virus*
(TSWV) EN AISLAMIENTOS MÉXICANOS

Blanca Estela González Pacheco, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*) se transmite por trips de manera persistente y se encuentra distribuido alrededor del mundo causando graves pérdidas económicas en diversos cultivos. El TSWV tiene genoma tripartita de ARN con las siguientes características principales: el segmento largo (L) es de polaridad negativa y codifica para la polimerasa RNA dependiente (RdRP); el segmento mediano (M) codifica las glicoproteínas Gn y Gc que forman parte de la cápside y NSm involucrada en el movimiento viral; y el segmento pequeño (S) codifica las nucleoproteínas NSs implicadas en la actividad supresora del silenciamiento genético. En México, el TSWV ha causado grandes pérdidas en cultivos ornamentales y hortícolas, de estos últimos, lechuga, pimiento y jitomate han sido los más afectados. Se caracterizó biológica y molecularmente tres aislamientos mexicanos de TSWV obtenidos de lechuga (TSWV-L), pimiento (TSWV-P) y jitomate (TSWV-T). Los nucleótidos secuenciados correspondientes a los segmentos M y S del genoma de TSWV tuvieron una homología del 98%. Al inocular los aislamientos en las plantas diferenciales se observaron diferencias significativas en especies de plantas correspondientes a siete familias. El aislado L fue el más agresivo en muchas especies de plantas diferenciales e infecto maíz; mientras TSWV-P y TSWV-T se consideraron aislamientos leves sin poder afectar maíz. Las diferencias del aislado agresivo se observaron en los cambios en aminoácidos, dos en la proteína NSm y cinco en la proteína Gn-Gc del RNA M. En la región intergénica (IGR) hubo siete deleciones y en el RNA S hubo cambios en la proteína NSs. La distribución de los aislamientos mexicanos en árboles filogenéticos usando diferentes proteínas siempre los situaron un grupo muy definido geográficamente y por su hospedero sólo con la proteína NSs. El presente trabajo asocia la agresividad de los aislamientos Mexicanos de TSWV a los cambios encontrados en los segmentos M y S.

Palabras clave: *Tospovirus*, TSWV, marchitez manchada y aislamientos.

Biological and molecular characterization of Mexican isolates of

Tomato spotted wilt virus (TSWV)

Blanca Estela González Pacheco, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

They are transmitted by thrips in a propagative manner. Taxonomically, tospoviruses have been classified in the Tospovirus genus, of the Bunyaviridae family. Tospoviruses cause economically significant losses in diverse cropping systems globally. Tospoviruses have a tripartite negative-sense and ambisense RNA genome. The large (L) RNA component has a negative polarity and encodes an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). The medium (M) and small (S) RNA fragments have genes in ambisense orientation. RNA M encodes the two envelope Gn and Gc glycoproteins in addition to the NSm protein, which is involved in virus movement. TSWV has caused major losses in vegetable and flower crops in Mexico recent years being lettuce tomato and pepper particularly affected. Three TSWV isolates from lettuce (TSWV-L), pepper (TSWV-P) and tomato (TSWV-T) respectively, obtained from central Mexico had a 98% homology in their nucleotide M and S RNA genomic segments, however significant differences were found amongst them on their infection against a set of plant species from seven different families. TWSV-L was an aggressive isolate in its host and in the set of differential plants, as compared to the P and T isolates, which were considered as mild. The L isolate was able to infect maize plants. Differences inherent to this severe isolate L, were observed at the M and S RNA segments. In the M segment, two amino acid differences were detected at the NSm protein and five at the Gn-Gc proteins. Also this severe isolate lacked eleven nucleotides in the intergenic region (IGR). In the S segment specific differences were also found for the L isolate in the NSs protein. Phylogenetic analysis of different TSWV proteins led to a geographic and host grouping only for the NSs protein. The comparative analysis Mexican isolates of TSWV allowed the association of changes on the M and S RNA segments for aggressiveness isolates.

Keywords: Tospoviruses, TSWV, spotted wilt and isolates.

Dedico esta tesis a:

A tres mujeres que me inspiran para seguir adelante...

Estela Pacheco Olvera

Laura Silva Rosales

María Ilusión Pérez Cáliz

A las personas integrantes de mi Consejo Particular por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo y mis problemas;

A quienes forjaron mi vida ... mis padres...

Felipe y Estela

Al provenir, mi hijo Dante

A quienes llevo en el corazón ...

Bere, Nery y Dafne

Agradecimientos

Todos los mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación. Y por la beca otorgada No. .

A mis tutores Dra. Laura Silva Rosales y Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, por su guía, confianza y apoyo; siempre útiles y oportunos, durante mi estancia en el CINVESTAV y COLPOS.

Agradezco al CINVESTAV unidad Irapuato por permitirme acceder a sus instalaciones, proporcionar los recursos materiales y humanos valiosos para este trabajo. Un agradecimiento especial a mi amiga Alicia, José Luis y Luis Jorge.

A los Dres. Reyna Rojas, Marco Soto y Roberto Ruíz, por su valiosa colaboración. Una sincera disculpa al Dr. Ruíz por mi falta.

A mis compañeros de Laboratorio de Interacciones Planta Virus Departamento de Ingeniería Genética, por su ayuda y consejos: Fulgencio, Ricardo, Miguel y Gaby. Y a quienes compartieron conmigo momentos inolvidables: Abi, Daniel, Selene, Marisol, Mariana, Angélica, Gloria y todo el equipo de voleibol “Los innombrables”.

Al Dr. Rafael Rivera-Bustamante y Raúl Álvarez (CINVESTAV) y al CESAVEG por las semillas donadas para la caracterización biológica de TSWV.

Este trabajo de investigación fue parcialmente financiado por Fondos SEP-CONACYT CB—2010-01 (No. 0157638) otorgado por Laura Silva Rosales. Además del fideicomiso 2011 revocable de administración e inversión no. 167304 para el establecimiento y operación de los fondos para la investigación científica y desarrollo tecnológico del centro público colegio de postgraduados, a quienes expreso mi agradecimiento.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Tomato spotted wilt virus	1
Virus segmentado de RNA con sentido negativo	2
Características estructurales del TSWV.....	4
Proceso infectivo del TSWV	6
<i>TSWV</i> en México.....	8
II. OBJETIVO GENERAL	10
Objetivos específicos	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
Procedencia de los aislamientos.....	11
Caracterización biológica de los aislamientos	11
Fuente de inóculo	11
Inoculación en plantas indicadoras	12
Extracción de RNA de plantas	12
Transcripción Reversa (RT).....	13
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	13
Diseño de oligonucleótidos específicos	14
Clonación y transformación de productos de PCR.....	14
Alineamiento y ensamblaje.....	15
Predicción de estructuras secundarias.....	15
IV. RESULTADOS	17
Aislamientos del virus.....	17
Sintomatología	17
Biocaracterización de los aislamientos de TSWV en México	20
Clonación y secuenciación de RNA M del genoma de TSWV	30
Análisis filogenético del RNA M de TSWV	33
Clonación y secuenciación de RNA S del genoma de TSWV.....	38
Análisis filogenético del RNA S de TSWV.....	38
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	45
VII. LITERATURA CITADA	46
VIII. APÉNDICE	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los virus de RNA monocatenario de sentido negativo (tomado del International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014).	3
Cuadro2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del segmento M y S de aislamientos mexicanos de <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV).....	22
Cuadro 3. Diagnóstico de <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) en los cultivos de lechuga, tomate y pimiento durante los años 2007 a 2012.....	18
Cuadro 4. Síntomas virales de los aislamientos Mexicanos (L, P and T) de TSWV en 21 plantas diferenciales (7 familias/18 especies) a los 45 días de inoculados.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del virión <i>Tomato spotted wilt virus</i> . Membrana externa que contiene glicoproteínas (Gn-Gc). Dentro las ribonucleasas (RNPs), que constan del RNA viral encapsulado por la nucleoproteína (N) y de la polimerasa (L). Modificado de Tsompana <i>et al.</i> , 2008.	1
Virus segmentado de RNA con sentido negativo	2
Figura 2. Organización segmentada del genoma de TSWV (L, M y S) y sentido estratégico del RNA. Tamaño aproximado del RNA viral en nucleótidos (nt) y su complementario RNA _{vc} . Los marcos de lectura abierto representados por cajas de color y las barras negras son secuencias guía del no templado. Modificado de Hull (2004).....	4
Figura 3. Ciclo de TSWV dentro de la célula vegetal, modificado de van Knippenberg; 2005 ...	7
Figura 4. Síntomas de <i>Tomato spotted wilt virus</i> en infecciones naturales. (a-b) planta lechuga al final de la cosecha con manchas necróticas invendible y hojas con necrosis seca extendida al centro. En invernadero (c) plantas de tomate con manchas necróticas en las hojas y (d) manchas necróticas en los frutos. (e-f). La planta chaparrada de pimiento con manchas anulares y deformación de hojas.	19
Figura 5. Planta de maíz producto de una línea susceptible a virosis (DAS 2348), inoculada con TSWV. El virus fue detectado en las hojas más jóvenes de la planta. A) hojas apicales con deformación en forma rizo helicoidal, 5 días después de la inoculación. B) clorosis y puntos necróticos en hojas laterales.....	30
Figura 6. Predicciones de las estructuras secundarias de la región intergénica (IGR) del segmento M para los aislamientos mexicanos TSWV-L, P y T. Las diferencias de nucleótidos se muestran en el bucle de la estructura del tallo para cada aislamiento; así como su ausencia (deleciones) en el aislado L. (A) TSWV-T dG = energía liberada inicial -43,67 y al final -53,40 ; (B) TSWV-P dG = energía liberada inicial -41,73 y al final -53,10; (C) TSWV-T dG = energía liberada inicial -46,43 y al final -53,10.	31
Figura 7. Representación esquemática de los segmentos M y S de TSWV y sus dos marcos de lectura abierta (ORFs). Fondo negro representa la secuencia de nucleótidos. (A) Los ORFs que codifican para las proteínas Nm y Gn / Gc. Las diferencias en aminoácidos entre los aislamientos TSWV-L, P y T se indican con líneas verticales por encima o debajo de cada caja en su posición	

relativa. Las regiones intergénicas y UTR se muestran como pequeñas cajas de trazos con sus respectivas secuencias de nucleótidos expandido hacia arriba o abajo. Las regiones hidrofóbicas (dominio secuencia señal / transmembranal) posibles sitios de N-glycosylation en GN y GC se indican como cuadros grises sólidos como informe de Naidu *et al*, (2004) (b) Los ORF individuales (que codifica proteínas NSs y NP). Las diferencias en los aminoácidos y sus posiciones están indicadas con líneas verticales, por encima de la caja de NSS. La región intergénica (IGR) está representado como pequeña caja de trazos. La escala indica 1000 nucleótidos..... 32

Figura 8. Alineación de nucleótidos y árbol filogenético de la UTR 5´del segmento de RNA M para los tres aislamientos mexicanos de TSWV. (A) Los diferentes nucleótidos están subrayados en las secuencias alineadas. (B) Árbol filogenético con los valores en los clados..... 35

Figura 9. Análisis filogenético sin raíz del *Tomato spotted wilt virus* (TWSV) de la región genómica RNA M. Relación de secuencias basadas en la secuencia de nucleótidos. (A) Proteína no estructural (NSm) y (B) Poliproteína precursora (Gn-Gc), con otros aislamientos reportados de diversas regiones del mundo. El árbol filogenético fue construido por el método Neighbor-Joining (NJ) y Kimura 2- parámetros. La robustez de los árboles fue estimada usando 1000 reiteraciones. En los entrecodos se muestra los valores de remuestreo o “bootstrap”. Los diferentes colores de fondo indican los diferentes grupos de aislamientos de TSWV.....36

Figura10. Análisis filogenético sin raíz del *Tomato spotted wilt virus* (TWSV) de la proteína NSs. Relación de las secuencias basadas en previos reportes de nucleótidos. (A) Árbol construido con 39 aislamientos reportados y (B) con 100 aislamientos de otras partes del mundo. El árbol filogenético fue construido por el método Neighbor-Joining (NJ) y Kimura 2- parámetros. La robustez de los árboles fue estimada usando 1000 reiteraciones. En los entrecodos se muestra los valores de remuestreo o “bootstrap”. Los diferentes colores de fondo indican los diferentes grupos de aislamientos de TSWV..... 39

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tomato spotted wilt virus

El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Figura 1), es un virus que pertenece al género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae* (Milne *et al.*, 1984) y ocasiona la enfermedad conocida como marchitez manchada del jitomate. El TSWV posee una amplia gama de hospedantes que incluye más de 900 especies de plantas tanto mono como dicotiledóneas (Habssen *et al.*, 2010). Se encuentra en casi todos los continentes y es causante de severas pérdidas económicas en varios cultivos hortícolas y ornamentales como lechuga, jitomate, pimiento y crisantemo (Whitfield *et al.*, 2005).

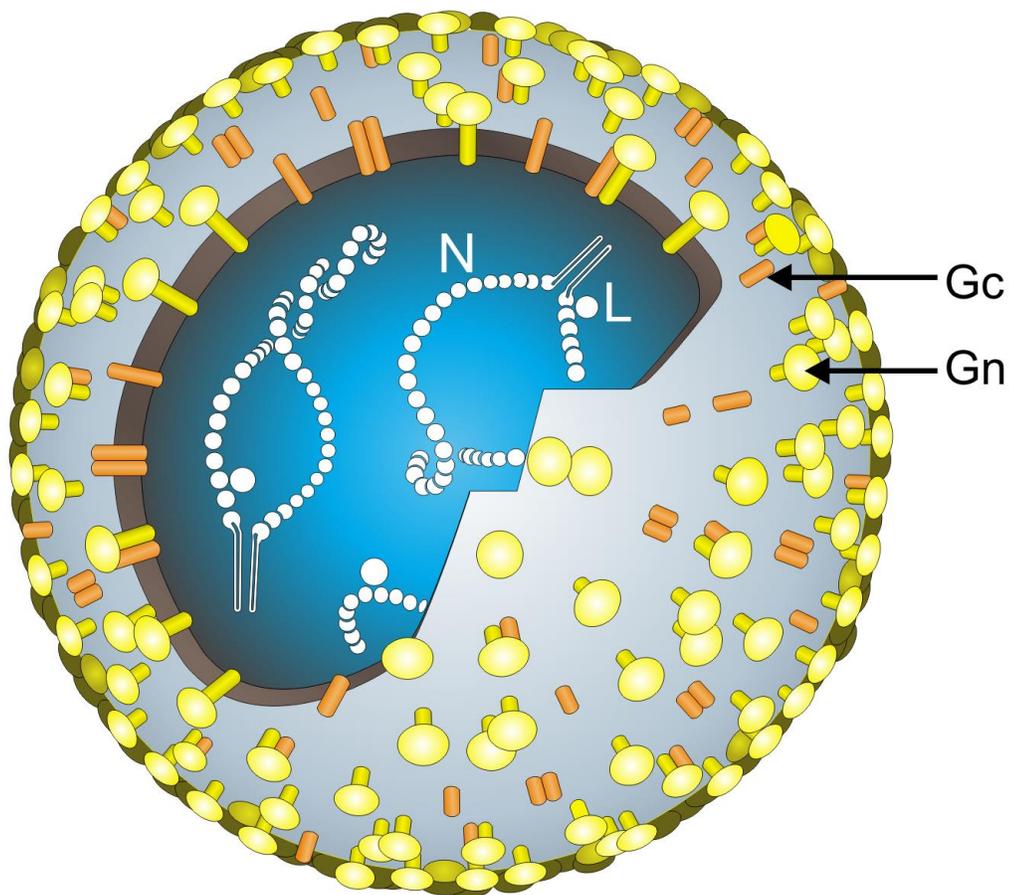


Figura 1. Representación esquemática del virión *Tomato spotted wilt virus*. Membrana externa que contiene glicoproteínas (Gn-Gc). Dentro las ribonucleasas (RNPs), que constan del RNA viral encapsulado por la nucleoproteína (N) y de la polimerasa (L). Modificado de Tsompana *et al.*, 2005.

El TSWV es transmitido por trips del orden Thysanoptera que incluye más de 5500 especies descritas (Morse *et al.*, 2006) siendo *Frankliniella occidentalis* la especie más invasiva y económicamente importante (Whitfield *et al.*, 2004; Badillo-Vargas *et al.*, 2012). Actualmente no existen métodos eficaces para combatir la infección ocasionada por el TSWV y la resistencia que puede tener una planta a este virus no es duradera, por lo que este fitopatógeno sigue siendo una plaga de importancia económica.

Virus segmentado de RNA con sentido negativo

Los virus con mayor importancia médica y económica en humanos y animales tienen genoma de RNA de sentido negativo y poseen envoltura. Estos virus poseen amplia variedad morfológica y difieren en sus propiedades biológicas y organización de su genoma. Otra característica importante de estos virus es su genoma monocatenario y segmentado por lo que se ubican en el orden *Mononegvirales* que incluye a las familias *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Filoviridae* (con genoma multisegmentado), *Orthomyxoviridae* (genoma con seis a nueve segmentos), *Bunyaviridae* (genoma con tres segmentos) y *Arenaviridae* (genoma con dos segmentos) (Pringle, 1991).

La peculiaridad de los virus pertenecientes a la familia *Bunyaviridae* es que poseen tres segmentos de RNA de sentido negativo. No obstante, también algunos miembros de las familias *Orthomyxoviridae* (*Influenza A virus*) y *Arenaviridae* (*Lymphocytic choriomeningitis virus*) así como de los géneros *Ophiovirus* (*Citrus psorosis virus*), *Deltavirus* (*Hepatitis delta virus*) y *Tenuivirus* (*Rice stripe virus*) tienen esta característica (Cuadro 1). Estos virus se replican en el citoplasma de las células infectadas y sintetizan RNAm no poliadenilado, a excepción de los virus de la familia *Orthomyxoviridae* que se replican en el núcleo y su RNAm es poliadenilado (van Knippenberg *et al.* 2004).

La familia *Bunyaviridae* tiene más de 350 especies clasificadas en cinco géneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus* (Walter & Barr, 2011). Las especies del género *Tospovirus* infectan plantas, mientras que los otros cuatro géneros incluyen virus patógenos de animales y humanos.

Cuadro 1. Clasificación de los virus de RNA monocatenario de sentido negativo (tomado del International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014).

<i>Familia</i>	<i>Genero</i>	<i>Especie</i>	<i>Hospedante</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>			Vertebrados
	<i>Virus de la influenza A</i>	<i>Influenza A virus</i>	Vertebrados
	<i>Virus de la influenza B</i>	<i>Influenza B virus</i>	Vertebrados
	<i>Virus de la influenza C</i>	<i>Influenza C virus</i>	Vertebrados
	<i>Isavirus</i>	<i>Infectious salmon anemia virus</i>	Vertebrados
	<i>Quarantavirus</i>	<i>Quarantil virus</i>	Vertebrados
	<i>Thogotovirus</i>	<i>Thogoto virus</i>	Vertebrados
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Bunyamwera virus</i>	Vertebrados
	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Plantas
	<i>Hantavirus</i>	<i>Hantaan virus</i>	Vertebrados
	<i>Phlebovirus</i>	<i>Rift Valley fever virus</i>	Vertebrados
	<i>Nairovirus</i>	<i>Dugbe virus</i> /	Vertebrados
<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i>	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>	Vertebrados
<i>Ophioviridae</i>	<i>Ophiovirus</i>	<i>Citrus psorosis virus</i>	Plantas
	<i>Tenuivirus</i>	Rice stripe virus	Plantas
	<i>Deltavirus</i>	Hepatitis delta virus	Vertebrados

La designación “sentido negativo” de un genoma viral de RNA se refiere a su forma de codificación. En los virus con genoma RNA de sentido positivo, o polar, el RNA puede traducirse si tiene capuchón metilado en su extremo 5´ (Cap 5´) y entra al sitio interno del ribosoma. Por el contrario, los genomas virales RNA de sentido negativo, o no polar, deben transcribirse para producir la cadena codificante de sentido positivo como primer paso del ciclo de replicación viral dentro de una célula infectada, lo que explica la presencia de la polimerasa viral dentro de sus viriones (Van Poelwijk et al., 1996).

Dentro de los virus con genoma segmentado de RNA de sentido negativo, existe un subgrupo formado por virus que poseen genoma ambisentido. Éstos poseen al menos un segmento del genoma con doble polaridad, es decir, existe un marco de lectura en uno de los segmentos de RNA de sentido negativo y otro marco de lectura en la cadena complementaria (de sentido positivo) originada de su transcripción. Virus pertenecientes a la familia *Arenaviridae* y a los géneros *Phlebovirus* y *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*) y *Tenuivirus* (sin familia) poseen genoma ambisentido (van Knippenberg et al., 2005).

Características estructurales del TSWV

El genoma de TSWV consiste de tres segmentos: largo (L), medio (M) y pequeño (S) y su longitud en nucleótidos (nt) se ve representada en la figura 2. Cada segmento posee regiones no traducibles (UTRs) localizadas en los extremos 3' y 5' que rodean la unidad transcripcional (Walter & Barr, 2011).

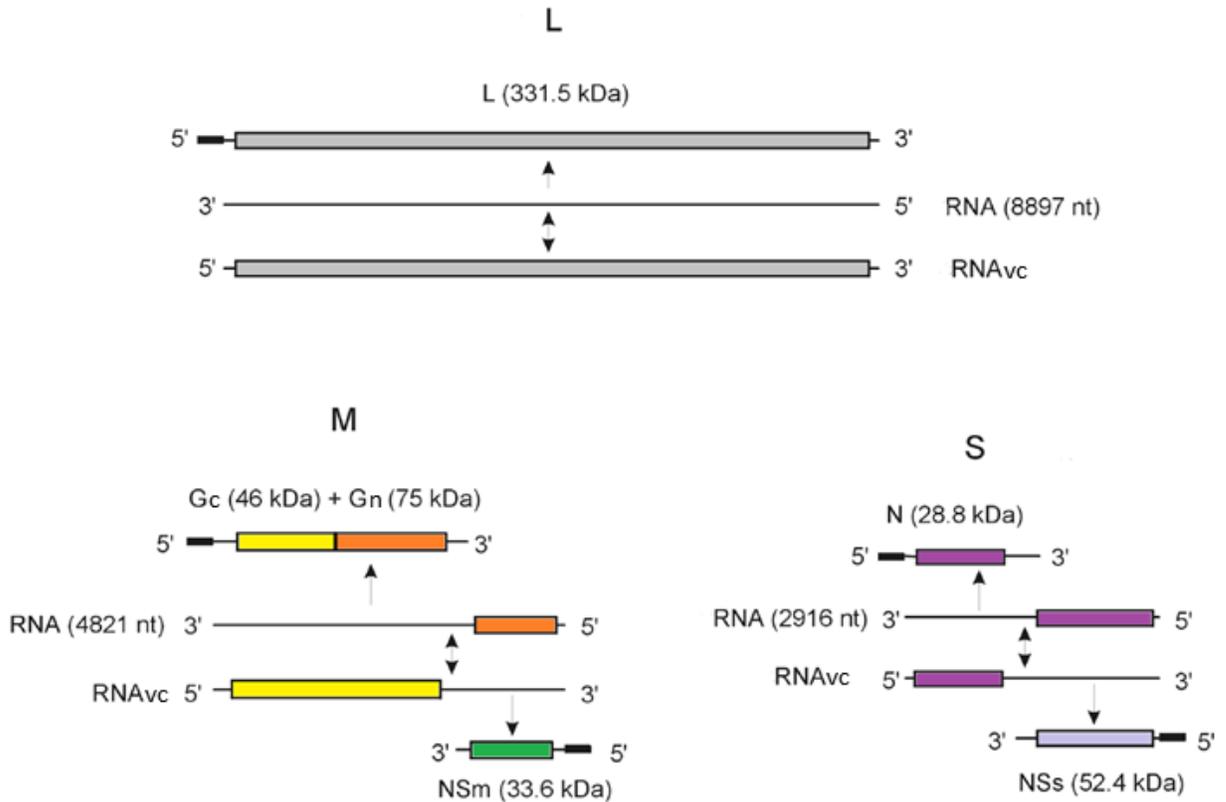


Figura 2. Organización segmentada del genoma de TSWV (L, M y S) y sentido estratégico del RNA. Tamaño aproximado del RNA viral en nucleótidos (nt) y su complementario RNAvc. Los marcos de lectura abiertos representados por cajas de color y las barras negras son secuencias guía del no templado. Modificado de Whitfield *et al.*, (2005).

En los extremos 5' y 3' existen regiones con una longitud aproximada de 65 nucleótidos (nt) con características para formar secuencias complementarias (De Haan et al. 1989; de Haan et al. 1990); (Kormelink *et al.*, 1992)), particularmente la presencia de 8 nt complementarios y conservados: 5'-AGAGCAAU y 3'-UCUCGUUA (van Knippenberg, 2005).

Los segmentos M y S son ambisentido y contienen dos genes opuestos separados por una región intergénica (RI) (Geerts-Dimitriadou *et al.*, 2012) rica en adeninas y uracilos que forma estructuras secundarias estables en forma de horquilla (de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1992; van Knippenberg, 2004). La RI de los diversos tospovirus posee secuencias conservadas (GCAAACUUUGG en el segmento M y CCAAUUUGG en el segmento S) (de Haan *et al.*, 1991); Kormelink *et al.*, 1992; Maiss *et al.*, 1991).

El segmento L es de sentido negativo, tiene una longitud aproximada de 8997 nt y codifica para la síntesis de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (de Haan *et al.*, 1991). Esta enzima tiene un peso de 331 kDa y tiene actividad como transcriptasa, replicasa y endonucleasa (Adkins *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 2003; Van Poelwijk *et al.*, 1996).

El segmento M contiene alrededor de 4821 nt con polaridad ambisentido. El RNA viral (RNA_v) codifica para la síntesis de la proteína NS_m implicada en el movimiento célula a célula mientras que el RNA complementario (RNA_{vc}) codifica para las dos glicoproteínas derivadas del proceso proteolítico (GPs): 1) Gn que poseen un extremo amino y 2) Gc que tienen una terminación carboxilo (Kormelink *et al.*, 1992 ; Whitfield *et al.*, 2004). Las glicoproteínas Gn-Gc inducen la formación membranas pseudo-circulares y pleomórficas que cubren las ribonucleoproteínas (RNPs), durante el proceso de infección (Ribeiro *et al.*, 2009).

El RNA S tiene 2916 nt y posee dos marcos de lectura abierta; el RNA_v codifica para la proteína no estructural (NS_s) y el RNA_{cv} para la nucleocápside (NP) (De Haan *et al.*, 1990). La NS_s está involucrada en la supresión del silenciamiento génico (Bucher *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2002) un mecanismo de defensa del hospedante contra el virus, mientras que la proteína NP está asociada al RNA genómico junto con la RdRp para formar ribonucleoproteínas activas (RNPs) que participan en la transcripción y la replicación del genoma viral (Kormelink *et al.*, 2011).

Proceso infectivo del TSWV

La infección ocasionada por el TSWV se inicia cuando el trips virulífero introduce a la partícula viral en la célula vegetal al insertar su estilete para alimentarse de su contenido. Después la membrana se separa de la partícula viral con lo que se libera la nucleocápside en el citoplasma y se activan las unidades independientes de transcripción y replicación que contienen el RNA así como las enzimas que intervienen en estos procesos (van Knippenberg *et al.*, 2004). Las RNPs presentes dentro del virión, que contienen principalmente RNA viral (RNA_v) y en menor cantidad RNA viral complementario (RNA_{vc}), se transcriben para formar los RNAm virales que codifican para la proteína L, las glicoproteínas precursoras y la proteína N (Kormelink *et al.*, 1992). Los RNAs mensajeros virales se traducen y las proteínas sintetizadas se acumulan en el citoplasma hasta alcanzar cierta concentración para iniciar la replicación del genoma viral. A continuación, cada segmento del genoma se copia por completo (Figura 3) con la intervención de un conjunto de proteínas N de manera similar a lo observado en la replicación del *Influenza virus A* (Portela & Digard, 2002); en esta etapa puede activarse de manera independiente el cambio a la transcripción y posteriormente nuevamente a la replicación (van Knippenberg *et al.*, 2004). En esta reciente transcripción se sintetizan los RNAs mensajeros virales que codifican las proteínas NSs y NSm con lo que se completa la síntesis de proteínas virales. Se sabe que la proteína NSs es la supresora del silenciamiento en células vegetales y de garrapatas (García *et al.*, 2006). Recientemente se demostró que en una infección mixta del IYSV y TSWV, la proteína NSs funciona como secuestrador de ciertos RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y que posee afinidad por cadenas largas de RNA bicatenario. La proteína NS del TSWV se une al RNA S ambisentido para impedir su reconocimiento y, por tanto, su degradación por las proteínas vegetales, al tiempo que mejora la traducción de los transcritos virales al circularizarse (Bag *et al.*, 2012). Los residuos de lisina presentes en la proteína NSs son los sitios donde se inicia su degradación por proteosomas después de que múltiples moléculas de ubiquitina las marcan y destruyen por enlaces covalentes (van Knippenberg *et al.*, 2013). La proteína NSs también está implicada en la regulación de la traducción, apoptosis y en la actividad de la polimerasa viral (Weber *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2009; Colón-Ramos *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2011), sugieren que la proteína NSs mejora la expresión genética del virus cuando éste infecta a su trips vector.

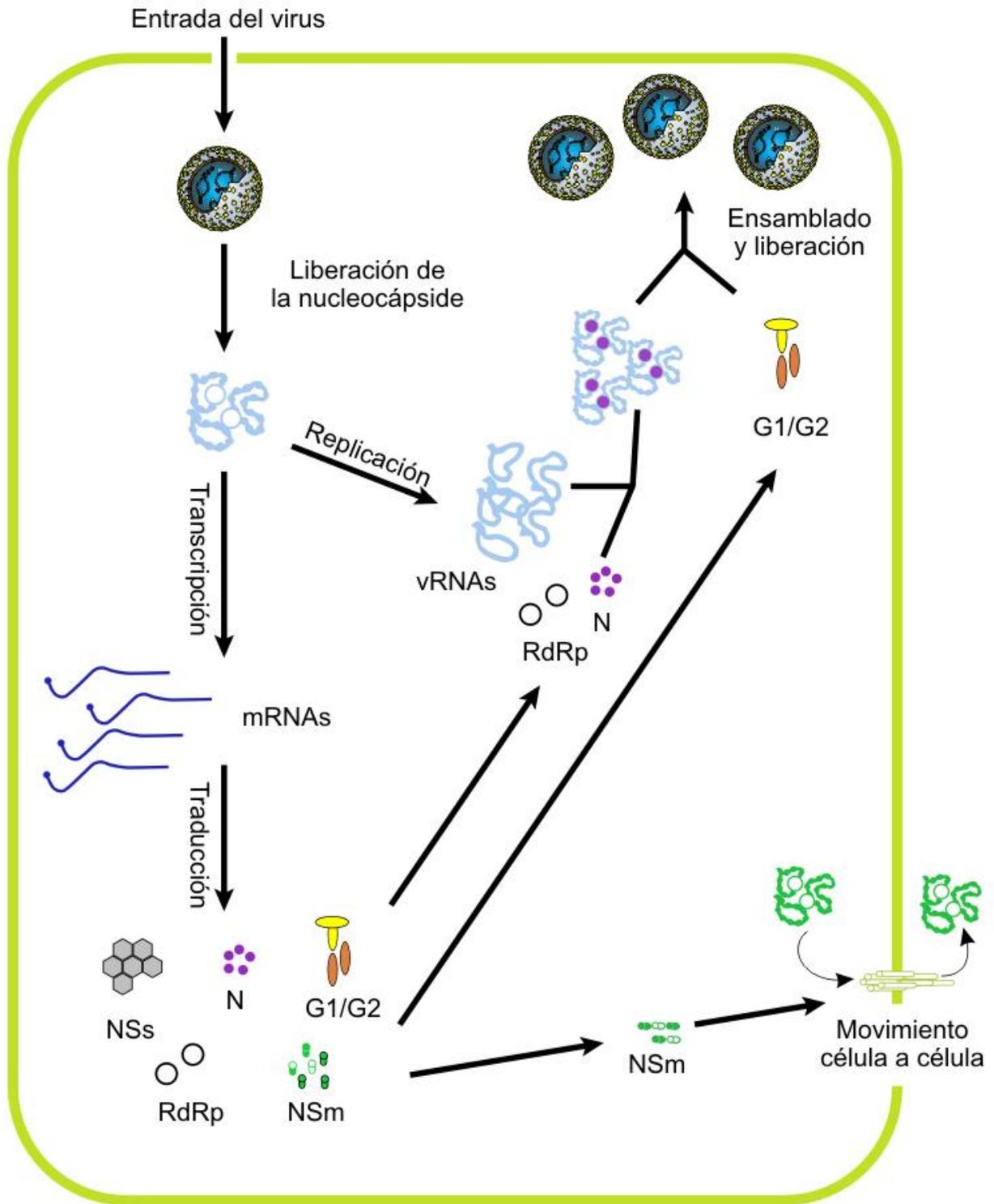


Figura 3. Ciclo de TSWV dentro de la célula vegetal (Modificado de van Knippenberg., 2005),

Los segmentos replicados son cubiertos por la proteína N y algunas proteínas RdRp para formar nuevas RNPs, las cuales son transportadas a las células vecinas por las proteínas de movimiento célula-célula (NSm) (Soellick *et al.*, 2000). Las NSm inducen la formación de estructuras tubulares al interactuar con las proteínas de la planta (von Bargen *et al.*, 2001) que facilitan la translocación de las RNPs virales a través de la pared celular modificando los plasmodesmos (Kormelink *et al.*, 1994); Storms *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2009). De esta manera la infección avanza a las células vecinas provocando el movimiento sistémico del virus, mismo que de acuerdo con Bag *et al.*, (2012), se facilita debido a que la NSs suprime la resistencia del hospedante en las interacciones sinérgicas.

Las proteínas estructurales, incluyendo las glicoproteínas, se acumulan en el aparato de Golgi para su maduración (Kuismanen *et al.*, 1984). En una etapa posterior las partículas del virus doblemente envueltas se fusionan en el retículo endoplásmico, agrupándose en las membranas donde usan las glicoproteínas contenidas en la cisterna del aparato de Golgi para madurar y salir (Kikkert *et al.*, 1999). Las partículas virales con envoltura se acumulan individualmente en vesículas membranales para ser adquiridas por los trips al momento de alimentarse y ser transmitidas a otras plantas (Kikkert *et al.*, 2001).

La “marchitez manchada” causada por TSWV es considerada una enfermedad emergente que causa significativas pérdidas en el rendimiento y calidad de productos vegetales, leguminosas y ornamentales de muchas partes del mundo (Pappu *et al.*, 2009).

TSWV en México

En México, el TSWV ha causado grandes pérdidas en cultivos ornamentales y hortalizas, de estas últimas, el jitomate, pimiento y lechuga han sido los más afectados. La detección del TSWV en el país se ha realizado principalmente con técnicas serológicas usando anticuerpos específicos (Ochoa *et al.*, 1996; Llamas *et al.*, 1998; De la Torre *et al.*, 2002). Basados en la caracterización biológica, los aislamientos de tomatillo, chile y crisantemo se ubicaron en el patogrupa TSWV-L (causante de lesiones locales necróticas, sin movimiento sistémico) (De la Torre, *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia y severidad del TSWV en cultivos hortícolas que sugiere una variabilidad genética. No existen publicaciones de secuencias mexicanas que nos permitan entender la filogenia de los aislamientos. En la actualidad existen dos factores importante para que la enfermedad “marchitez manchada” sea una seria amenaza en México: 1) la rápida y eficiente dispersión del vector el Trips (*Frankliniella occidentalis*) y 2) su amplia gama de hospederos; así como la severidad del aislamiento.

Las pérdidas ocasionadas por la diseminación de una variante severa de TSWV puede llegar a ser impactante dada la importancia del cultivo afectado para la alimentación, exportaciones y la generación de empleos.

La amenaza que representa TSWV y su vector para los cultivos, hace necesario que se implementen medidas para prevenir los daños. Sin embargo desconocemos la situación real del problema en México.

A partir de 90's se dieron a conocer los primeros reportes en ornamentales y algunos reportes en hortalizas. Más reciente ha sido la detección en *Zea elegans* una ornamental de origen Mexicano. Todos los reportes solo han sido caracterizados usando ensayos serológicos y algunas pruebas biológicas en cultivares diferenciales de *Casium annuum* denominados patogrupos PL (síntomas locales necróticas, sin movimiento sistémico). Los estudios de los aislamientos virales a nivel molecular son aún muy incipientes.

Es por ello que el profundizar en el estudio del genoma de las cepas de TSWV presentes en México, puede contribuir a tener conocimiento de la situación de la enfermedad, así como reportar las regiones del genoma útiles para diferenciar el tipo de cepa y conocer el origen de los aislamientos.

I. OBJETIVO GENERAL

Caracterización biológica y molecular, aislamientos de *Tomato spotted wilt virus* colectados en México.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar biológicamente los aislamientos mexicanos de TSWV a través de los síntomas inducidos en plantas indicadoras.
2. Realizar la caracterización molecular de los aislamientos de TSWV en México.
3. Obtener las secuencias de nucleótidos del RNA de los segmentos M y S RNA para los aislamientos Mexicanos.
4. Establecer relaciones de filogenia con otros aislamientos de TSWV reportados en el mundo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de los aislamientos

Los aislamientos analizados en la presente investigación provienen de plantas infectadas con TSWV que fueron colectadas por parte de técnicos especialistas de la campaña de hortalizas del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG) así como muestras remitidas al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario CESAVEG durante los años 2007 al 2012 (Cuadro 3). Las muestras trabajadas para la caracterización biológica y molecular se colectaron en los veranos 2010 y 2011 procedentes de los estados de Guanajuato y Querétaro que mostraban síntomas de manchas necróticas, manchas anulares, deformaciones y marchitez característicos de TSWV.

Todas las muestras de tejido foliar se sembraron en cajas de Petri con medios de cultivo PDA para hongos y BK para bacterias. Analizamos para fitoplasmas y viroides por PCR y RT-PCR, respectivamente, usando iniciadores universales (R16's, P1-P7 y PSTVd). Para conocer si había otros virus diferentes de TSWV en las muestras, se realizó DAS-ELISA con antisueros obtenidos en Adgia Inc. (Elkhart, IN) para los virus detectados en diferentes cultivos de la zona de estudio: ToMV, BWYV, BBWV, PVY, PVX, PDV, PRNV, SLRV, CyRSV, AMV, CMV, CymMV, TMV, TAV, TRSV, TBRV y TEV e INSV-TSWV.

Las muestras de lechuga, pimiento y jitomate donde se detectó solamente al TSWV fueron analizadas nuevamente por DAS-ELISA usando anticuerpos policlonales que reconocen la nucleocápside de este virus adquiridos en Adgia Inc. (Elkhart, IN) con el propósito de corroborar su presencia. Una vez comprobada la presencia del TSWV en las muestras de las tres especies vegetales, éstas fueron maceradas en un buffer constituido de sulfito de sodio 0.01M pH 7.0 y congeladas con nitrógeno líquido para conservarlas a -80° C en un ultracongelador hasta su procesamiento.

Caracterización biológica de los aislamientos

Fuente de inóculo

El tejido foliar de lechuga, pimiento y jitomate positivo solamente a TSWV que fue macerado en buffer y mantenido en ultracongelación fue utilizado como fuente de inóculo. Los tubos se descongelaron y su contenido se vertió en un mortero estéril al cual se le añadió

carborundum y se mezcló uniformemente. Para inocular se sumergió un hisopo en el macerado con carborundum y se procedió a frotar el tejido foliar de las plantas indicadoras manteniendo en todo momento el mortero con inóculo sobre hielo para mantenerlo frío. El exceso de inóculo se lavó con agua destilada.

Inoculación en plantas indicadoras

Para determinar las características biológicas de los aislamientos de TSWV de lechuga, pimiento y jitomate, se germinaron semillas de dieciocho especies de plantas que representan siete familias de plantas diferenciales (Cuadro 4) en charolas de unicel con sustrato estéril y fueron colocadas en cuarto de crecimiento a 28° C con un fotoperiodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad. A los 30 días después de la siembra se realizó el trasplante a vasos de unicel de un litro de capacidad conteniendo suelo estéril. Siete días después del trasplante de las plántulas se realizó la inoculación mecánica de las mismas de la manera antes descrita. Las plantas inoculadas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 23 a 28° C con una intensidad de luz de 2.36 a 3.94 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Los tratamientos de cada especie fueron inoculada por cada aislado de virus y cinco plantas por cada especie se consideraron una repetición. En el experimento se establecieron dos repeticiones en diferente tiempo.

La expresión de síntomas en las plantas inoculadas se evaluó por 25 a 30 días posterior a la inoculación. Las infecciones locales y sistémicas se confirmaron por la observación de síntomas en la hoja inoculada y hojas recién emergidas, por ejemplo; los anillos cloróticos y concéntricos en la hoja inoculada, sin desarrollo de síntomas en las hojas emergidas fue considerada como infección local y la infección sistémica cuando las manchas cloróticas, seguidas de mosaicos y/o manchas necróticas en hojas recién desarrolladas. Las hojas infectadas fueron evaluadas por ensayos serológicos usando anticuerpo policlonal dirigido a la nucleocápside (N) de la firma comercial Adgia Inc. (Elkhart, IN).

Extracción de RNA de plantas

Para la extracción de RNA de plantas infectadas con virus, se tomaron 100 mg de tejido fresco, lechuga, pimiento y tomate. Se maceró el tejido vegetal en mortero y pistilo en nitrógeno líquido hasta obtener un molido homogéneo. Se llenó un tubo Eppendorf de 1.5 mL hasta una tercera parte con tejido molido y se agregó 1mL de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y agitó

perfectamente en vortex, se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 200 μL de cloroformo y agitó en vortex aproximadamente durante 30 segundos (Fisher Vortex Genie 2TM, Fisher Scientific). Se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y centrifugó a $\sim 12,000 \text{ xg}$ (12,000 rpm) durante 15 minutos en microcentrífuga (Centrifuge 5415c, Eppendorf o Sepctrofuge 16M, Labnet) a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo. Se agregó 500 μL de isopropanol frío e incubó a -20°C durante al menos 20 minutos, se centrifugó $\sim 12,000 \text{ xg}$ durante 10 minutos a 4°C y desechó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 70% y dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a $\sim 5,000 \text{ xg}$ (7,500 rpm) durante 15 minutos a 4°C . Se eliminaron los residuos de etanol por inversión y se dejó secar la pastilla de RNA en campana hasta sequedad. Se resuspendió en 30 μL de H_2O desionizada estéril tratada con DEPC. Se cuantificó por NanoDrop 2000 Uv-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Transcripción Reversa (RT)

Para ensayos de detección se utilizó la Reverso Transcriptasa SuperScript IITM o M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se agregaron 1 μg de RNA y adicionaron los siguientes reactivos: Oligo reverso a una concentración final de 10mM, la mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) a una concentración final 0.1 μM cada uno y H_2O para un volumen final de 14.5 μL . Para cada región del segmento viral M y S, usamos un oligo reverso diferente por cada amplificación deseada (Cuadro 2). La mezcla anterior se incubó durante 5 minutos a 65°C , se incubó en hielo durante 2 minutos y se dio un pulso en la centrífuga. Se adicionaron los siguientes reactivos: Buffer de síntesis de la primera cadena 5X a una concentración final de 1X, DTT a una concentración final de 5 mM y se adicionó 0.5 μL de RT SS o M-MLV IITM 20 U/ μL (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se agitó en vortex y dio un pulso de centrífuga para bajar la reacción. Se incubó en termomixer (Thermomixer compact, Eppendorf) o en termociclador (2720 Thermocycler, Applied Biosystems) durante 50 minutos a 37°C y almacenó a -20°C o utilizó para procedimientos posteriores.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron diferentes polimerasas para llevar a cabo las amplificaciones, las dos más comunes que se utilizaron durante éste trabajo fue la Taq DNA Polymerase recombinant 5U/ μL (Invitrogen) y la enzima de alta fidelidad Phusion R® Hot Start II 2U/ μL (Finnzymes). Se utilizó

el buffer de la casa comercial a una concentración 1X final, MgCl₂ a una concentración de 1.5 a 2 mM final y dNTPs a una concentración de 0.1, 0.2 o 0.4 μM final. Los oligos 5' (iniciador) y 3' (reverso) se utilizaron a una concentración 0.4 a 0.5 μM final y se agregó H₂O a un volumen final de 20 o 25 μL por reacción. A cada par de oligonucleótidos se les realizó un PCR de gradiente para determinar su temperatura de alineamiento.

El templado de DNA obtenido por PCR podía consistir en una gran variedad de muestras como DNA de cadena sencilla obtenida por RT, DNA plásmidico, DNA bacteriano, DNA de un producto de PCR, etc. El programa del termociclador utilizado fue de un ciclo inicial de desnaturalización de > 94°C durante 1 minutos, seguido de 25 a 30 ciclos de desnaturalización a > 94°C durante 15 segundos, la temperatura de alineamiento fue diferente para cada par de oligos utilizados por 30 segundos y extensión 72°C durante 1 minuto por kilobase a amplificar, finalizando con un ciclo de extensión a 72°C durante 5 a 7 minutos.

Diseño de oligonucleótidos específicos

Para amplificar cada región del genoma de los segmentos M y S, se diseñaron algunos oligos, para el caso del pimiento en el segmento IR-Gn/Gc y la NP de todos los aislamientos (cuadro 2). Su localización y composición se basó en regiones conservadas de secuencias publicadas de aislamientos de TSWV en diferentes partes del mundo.

Clonación y transformación de productos de PCR

Los productos de DNA amplificados del tamaño esperado, se extrajeron de un gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed™. Utilizamos columnas de purificación Qiagen PCR® (Qiagen, Inc.). Los productos amplificados por PCR que se utilizaron, fueron obtenidos con la enzima de alta fidelidad Phusion®, estos fragmentos son carentes de extremos cohesivos, dadas las características modificadas de la enzima. Posteriormente utilizamos los reactivos de clonación pGEMT easy (Promega) o pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific) que sirve como vector de entrada para fragmentos con extremos romos o cohesivos. Se realizó la ligación utilizando la enzima del equipo de reactivos y/o la T4 DNA ligasa 100U/μL (Invitrogen). El procedimiento para ligación fue el siguiente, se adicionó buffer de ligación a una concentración final 1X, se agregó 25 ng/μL vector, 1 μL de producto de PCR y se adicionó H₂O a un volumen final de 10 μL por reacción. Se dejó incubando la ligación a 16°C durante toda la noche. Para la transformación de los productos de ligación, se utilizó la bacteria *Escherichia coli* cepa DH5α

electro o quimicompetentes. Se tomaron 5µL del producto de ligación y se añadieron a un volumen de 20 a 50 µL de células. Se transformó por electroporación en celdas Biorad en un electroporador Micro Pulser™(BioRad) a 2.5 kV. Se transformó por choque térmico en termomixer (Eppendorf) a 42°C y se dió un choque de temperatura durante 45 segundos. Para la recuperación bacteriana se adicionó 1mL de medio SOC e incubó durante 1 h a 37°C con agitación de 200 a 300 rpm. Se centrifugó durante 2 minutos a ~ 5, 000 xg (8,000 rpm), se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en un volumen aproximado de 100µL. Se sembró en cajas Petri con medio Luria-Broth a una concentración final de 100 mg/mL de carbenicilina, se dejó incubando toda la noche a 37°C. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en un secuenciador tipo Sanger.

Los aislamientos mexicanos secuenciados se depositaron en el GenBank, su código es: TSWV lechuga S (KJ20102) y M (KJ20103); TSWV pimiento S (KJ20105) y M (KJ20106) ; y TSWV tomato S(KJ20108) and M(KJ20109).

Alineamiento y ensamblaje

La identidad de la secuencias fue analizada en el programa de BLAST, disponible en “National Center for Biotechnology Information”(NCBI). Las secuencias se ensamblaron y editaron usando el programa Geneious (Biomatters) y la alineación con la versión 2.0 de ClustalW (Larkin *et al.*, 2007).

Predicción de estructuras secundarias

Para los análisis de predicción, utilizamos las regiones intergénicas usando el programa MFold 3 (Zuker, 2003). Las estructuras secundarias fueron proporcionadas por el software con su correspondiente Gibbs de energía libre (dG) para cada estructura.

Cuadro2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del segmento M y S de aislamientos mexicanos de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

Oligo	Región genómica	Secuencia (5'→ 3')	Localización	Tamaño (bp)
M1-f	Nsm-IR	AGAGCAATCAGTGCATCAGAAATATAACC	1-28	1493
M1-r	Nsm-IR	GATACTATCAGAGTGGTACTGCTTATTG	1521-1548	
M2-f	IR-Gn/Gc	CTTCAGACAAGGTGAGAGAAATC	1328-1350	1981
M2-r	IR-Gn/Gc	ATGGCTCAAACAACCCAATGTTTG	3331-3354	
MP	Nsm- Gn/Gc	GCAAGCTGATAATTCCTAAAGG	864-885	1351
MP	Nsm- Gn/Gc	AAGGAGATGACATGTCTTGGG	2123-2143	
M3-f	Gn/Gc	GGACAGCCTGGAACATAAAAAGCATCC	3302-3327	1470
M3-r	Gn/Gc	AGAGCAATCAGTGCAAACAAAAACC	4797-4821	
S1-f	NSs	AGAGCAATTGTGTCAGAATTTGTTC	1-26	463
S1-r	NSs	AGCTGGAATCGGTCTGTAATATCAG	489-513	
S2-f	NSs-IR	TTGATAACTCTGTTCTGGCACTATC	360-384	1080
S2-r	NSs-IR	TTATTTTGATCCTGAAGCATACG	1464-1483	
S3-f	IR-NP	CTTTGCCAGAGGAGAAATTTAAATTTTC	1351-1377	1514
S3-r	IR-NP	AGAGCAATCGTGTCAATTTTGTGTTC	2891-2916	
S4-f	NP	CTACCTCCAGCATTATGGC	2318-2337	485
S4-r	NP	CGACTGCGGGATACAGAGTT	2822-2841	

*Todos los oligos fueron sintetizados en el IBT-UNAM

Análisis filogenético

Para determinar la relación filogenética de los aislamientos mexicanos de TSWV con los aislamientos mundiales. Usamos las secuencias de RNA completas de TSWV del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se orientaron y alinearon, usando el paquete estadístico que tiene el programa Geneious (Biomatters) y MEGA versión 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Mediante este último programa se estimó la distancia genética entre las secuencias y para generar árboles filogenéticos en los que cada rama represente la distancia entre las secuencias y las unidades el número de eventos de sustitución.

Los árboles sin raíz se generaron usando el programa Clustal X (Thomson, 1997) con el método de neighbor-joining (NJ) y visualizarlos en el programa Geneious (Biomatters). La robustez de los dendogramas se estimó usando 1 000 reiteraciones. Las distancias genéticas entre grupos de aislamientos se calculó mediante el programa MEGA 2.1 (Kumar, *et al.*, 2004) por el método de 2 parámetros de Kimura (Kimura 2-parameter), con este mismo programa se estimó el número de sustituciones no sinónimas y sinónimas por sitio mediante el método de Pamilo-Bianchi-Li con 1000 réplicas.

III. RESULTADOS

Aislamientos del virus

El diagnóstico fitosanitario del laboratorio CESAVEG trabajó 526 muestras de lechuga, pimiento y tomate correspondientes a siete estados de la República Mexicana en los años 2007-2012 (Cuadro 3). El 20% resultaron positivas a TSWV y con una incidencia por cultivo de 20% para lechuga, 37% en pimiento y 43% en tomate. Los estados con mayor número de positivos fueron Guanajuato con 54% y Querétaro con 33%.

Las muestras positivas a TSWV fueron negativas a la presencia de hongos, bacterias, fitoplasmas y el viroide de la papa (PSTVd). Además usaron ensayos serológicos con anticuerpos policlonal ELISA (Agdia, Elkhartm IN) para diagnosticar a: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato X virus* (PVX), *Potato Y virus* (Y), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) y *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) los cuales también resultaron negativos.

Los aislamientos de TSWV fueron aleatoriamente seleccionados, pimiento de Guanajuato en el 2008; lechuga y tomate de Querétaro en el 2009. A cada aislamiento se les asignó la nomenclatura del cultivo de donde fueron aislamientos, TSWV-L, TSWV-P y TSWV-T (lechuga, pimiento y tomate), respectivamente.

Sintomatología

El cultivo de lechuga en campo se vio severamente afectado por la infección viral. Los síntomas comenzaron con manchas de color marrón oscuro en las hojas hasta extenderse a las hojas internas, causando la necrosis. Las plantas infectadas al inicio de su desarrollo mueren después de una semana de la infección. Las que sobreviven a la infección desarrollan una necrosis sistémica en las hojas internas, lo que hace un producto invendible. La incidencia en campo puede producir pérdidas de hasta 90%.

En el invernadero, los primeros síntomas del tomate fueron manchas de color marrón claro, acortamiento de entre nudos, rizado en las hojas más jóvenes, necrosis y enseguida la marchitez. Los tallos comenzaron a desvanecerse y además mostraron algunas manchas anulares.

En los frutos verdes se distinguió por los anillos necróticos de color marrón que al madurar se convierten en manchas rugosas ubicadas cerca del pedúnculo.

Cuadro 3. Diagnóstico de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en los cultivos de lechuga, tomate y pimiento durante los años 2007 a 2012.

Año	Estado	Número de plantas positivas a TSWV/ total de plantas procesadas		
		TSWV-lechuga	TSWV-tomate	TSWV-pimiento
2007	Guanajuato		1/110	2/110
	Jalisco		1/110	
2008	Guanajuato		2/108	3/108*
	Jalisco		1/108	
	Hidalgo		1/108	
	Michoacán			2/108
	Querétaro			5/108
	San Luis Potosí		1/108	1/108
				16/108
2009	Guanajuato		4/103	8/103
	Querétaro	6/103*	6/103*	2/103
	Michoacán		1/103	
	Jalisco		1/103	
				28/103
2010	Guanajuato		6/49	3/49
	Jalisco			1/49
	Zacatecas		1/49	
				11/49
2011	Guanajuato	6/83	4/83	4/83
	Querétaro	6/83	5/83	2/83
	Michoacán		1/83	
				28/83
2012	Guanajuato	3/73	6/73	4/73
	Querétaro		1/73	1/73
	Michoacán		1/73	
	San Luis Potosí		1/73	
				17/73
Total		21/104	45/104	38/104
				104/526

^a Diagnóstico de TSWV por la técnica inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) a tres especies principalmente *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*.

*Aislamientos caracterizados para este trabajo denominados L para lechuga, T para tomate y P para pimiento.

El cultivo de pimiento en invernadero se vio afectado por el deficiente desarrollo, con lesiones cloróticas, deformación y rugosidad de hojas. La enfermedad causada por TSWV en tomate y pimiento fue el motivo de preocupación de numerosos invernaderos.

Una vez introducido, TSWV se extendió de manera eficiente por todo el invernadero. En el monitoreo rutinario de los invernaderos para detectar el vector, no se encontró la presencia de Trips. TSWV también puede ser transmitido de manera mecánica y las prácticas agrícolas realizadas en los invernaderos con herramientas o manos pudieron ser la causa de su propagación (Figura 4).

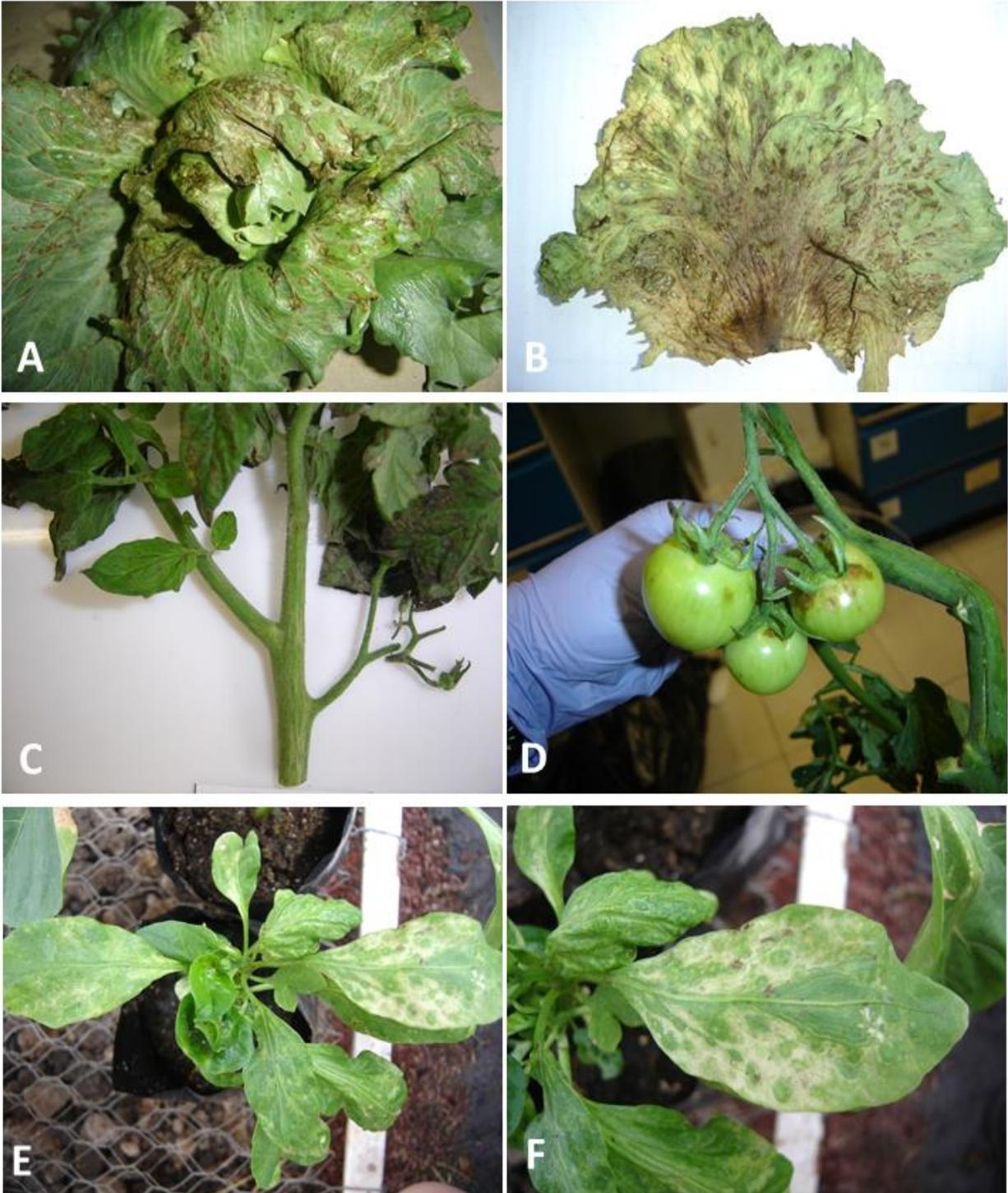


Figura 4. Síntomas de *Tomato spotted wilt virus* en infecciones naturales. (a-b) planta lechuga al final de la cosecha con manchas necróticas invendible y hojas con necrosis seca extendida al centro. En invernadero (c) plantas de tomate con manchas necróticas en las hojas y (d) manchas

4necróticas en los frutos. (e-f). La planta chaparrada de pimiento con manchas anulares y deformación de hojas.

La inoculación de TSWV con sales cuaternarias de amonio utilizado como desinfectante de herramientas en los invernaderos, resultó ser el buffer más eficiente para inocular el virus mecánicamente en hospederos diferenciales.

Biocaracterización de los aislamientos de TSWV en México

Al realizar la caracterización biológica de los aislamientos mexicanos de TSWV (L, P y T) en las diferentes especies hospederas, se observaron una gran variedad de síntomas. Estos aislamientos provenientes de dos estados de la república Mexicana se inocularon en dieciocho especies de plantas que representan siete familias. Los síntomas se registraron diariamente durante un período 45 días. Los resultados se muestran en el cuadro 4.

Los tres aislamientos de TSWV causaron la infección sistémica en las familias *Amaranthaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* y *Poaceae* a semanas de la inoculación. La capacidad de infección de los aislamientos mexicanos de TSWV fue muy similar entre 11 a 14 especies diferenciales (50 a 64%). La mayor diferencia estuvo en su capacidad para producir la necrosis. El aislado TSWV-L tuvo la mayor capacidad de producir necrosis en 12 especies (55%), en contraste con TSWV-P y T, que sólo en 4 especies (19%). TSWV-L produce más lesión necrótica (manchas, anillos en hojas o tallos), sobre todo en las especies de solanáceas (*Datura stramonium*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana glutinosa*, *N. benthamiana* y *N. rustica*) y por lo tanto, se considera un aislado agresivo de amplio rango de hospederos. Este aislado produce necrosis en las plantas de 7 a 10 días después de la inoculación (dpi) en todas las especies estudiadas.

Hubo siete especies de plantas que no presentaron síntomas visibles al inocular los aislamientos mexicanos de TSWV (*Chenopodium quinua*, *Citrullus lanatus*, *Cucumis sativum* L., *Solanum lycopersicum* cv. Plumty, *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *C. annuum* cv. Huixchol) a los 45 días post inoculadas. Por lo tanto, se consideraron como no hospedantes para estos aislamientos de TSWV.

Inesperadamente, sólo TSWV-L fue capaz de infectar *Zea mays* produciendo un patrón de deformación en forma rizo helicoidal en las hojas más jóvenes (Figura 5).

Cuadro 4. Síntomas virales de los aislamientos Mexicanos (L, P and T) de TSWV en 21 plantas diferenciales (7 familias/18 especies) a los 45 días de inoculados.

Hospedante	Familia	Especies	Aislamientos TSWV ^a					
			Lechuga (TSWV-L)		Tomate (TSWV-T)		Pimiento (TSWV-P)	
			Local	Sistémica	Local	Sistémica	Local	Sistémica
Amaranthaceae		<i>Gomphrena globosa</i> L.	CL, NL	Mo, NS, W	CL	WS	NL	Mo
Asteraceae		<i>Lactuca sativa</i> L.	CL, NL	St, NS, W, D	-	-	-	-
Chenopodiaceae		<i>Chenopodium quinoa</i> L.	WS	WS	WS	WS	WS	WS
Cucurbitaceae		<i>Citrullus lanatus</i> L.	WS	WS	WS	WS	WS	WS
		<i>Cucumis sativum</i> L.	WS	WS	WS	WS	WS	WS
		<i>Cucumis melo</i> L.	CL	WS	CL	Mo	CL	WS
		<i>Curcubita pepo</i> L.	CL	C, NS	CL	C	WS	C
Solanaceae		<i>Datura stramonium</i> L.	CL, RS, W	St, LD, Mo, RS, NR, N	CL	Mo	CL	NSi
		<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Miroma	WS	C, Mo, NR, SN, W	WS	C, Mo, W	WS	C, Mo, NR, SN, W
		<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Shael	WS	C, Mo, N	WS	C, W	WS	C, Mo
		<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Plumty	WS	WS	WS	WS	WS	WS
		<i>Nicotiana benthamiana</i> L.	CL, Mo	St, NS, W, D	WS	NS, W	WS	NS, W
		<i>N. clevelandii</i>	WS	WS	WS	WS	WS	WS
		<i>N. rustica</i> L.	CL, NL	St, C, LD, W, Mo, NR, N	CL	Mo, NR	CL	Mo, NR
		<i>N. glutinosa</i> L.	WS	N, NS, W, D	CL	Mo	WS	C, Mo
		<i>N. tabacum</i> cv. Xanthii	WS	WS	WS	WS	WS	WS
		<i>Petunia hybrid</i> L.	CL	C, Mo, W, D	CL	C, Mo	CL	C, Mo
		<i>C. annuum</i> cv. Huixchol	WS	WS	WS	WS	WS	WS
		<i>C. annuum</i> cv. Taurus	CL	C, Mo, N, SN	CL, NS	C, Mo, N, SN	WS	WS
		<i>C. annuum</i> cv. Mulato	CL, NS	LD, Mo, NR, N, NS, SN, D	CL, NS	LD, Mo, NR, N, NS, SN, D	CL, NS	LD, Mo, NR, N, NS, SN, D
Poaceae		<i>Zea mays</i> CIMMYT SL1	CL	C, LD, Mo, NS	CL	Mo	CL	Mo
Fabacea		<i>Phaseolus vulgaris</i>	CL	Mo	CL	Mo	CL	Mo

^a Cinco plantas por cada especie se inocularon mecánicamente en las hojas recién emergidas. La Fuente de inóculo fue la sávia de *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* seleccionadas de plantas infectadas con TSWV, reportadas en el Cuadro 3. Los síntomas fueron: **CL** lesiones cloróticas; **NL** lesiones necróticas; **Mo**, mosaicos o moteado; **NS**, puntos necróticos; **W**, marchitez; **WS**, no infectada; **St**, achaparramiento; **C** clorosis; **RS**, mancha anulares; **LD**, deformación; **NR**, anillos necróticos; **N**, necrosis en hojas; **SN**, necrosis en tallos; **D**, muerta.

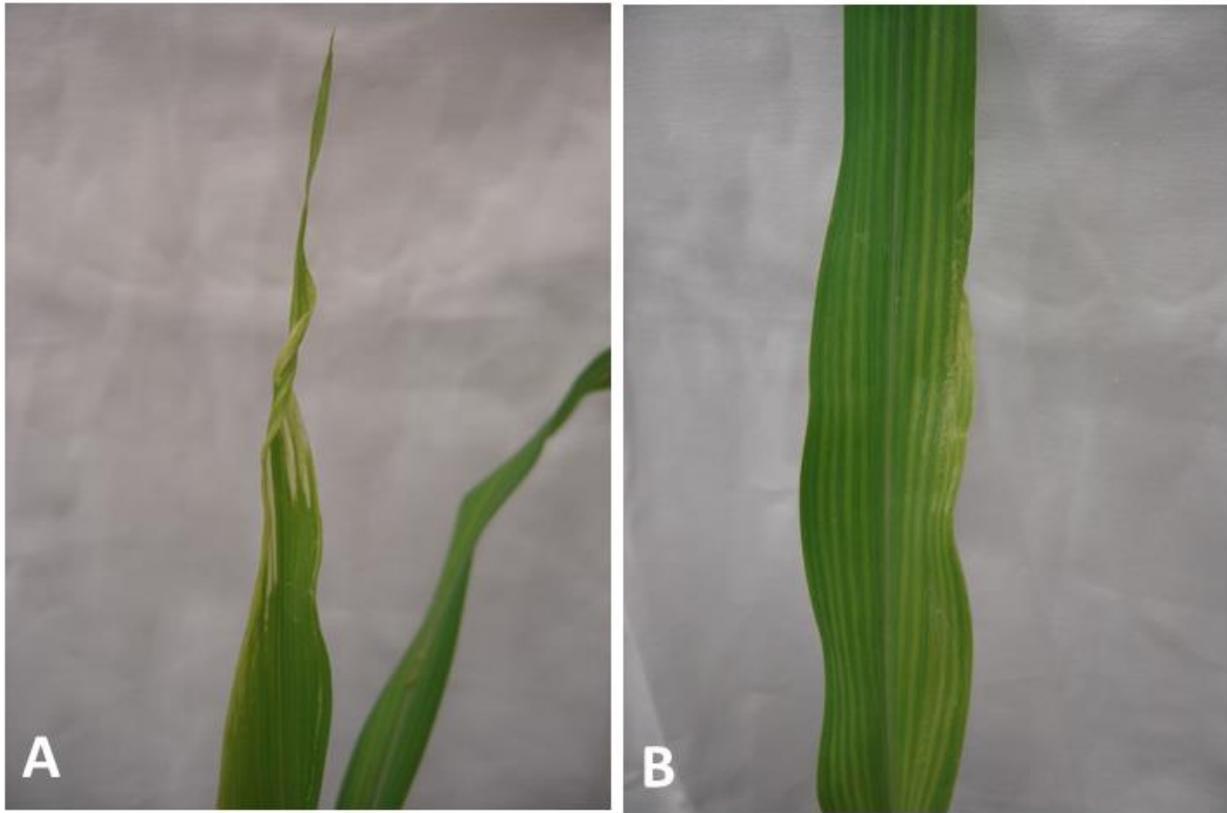


Figura 5. Planta de maíz producto de una línea susceptible a virosis (DAS 2348), inoculada con TSWV. El virus fue detectado en las hojas más jóvenes de la planta. A) hojas apicales con deformación en forma rizo helicoidal, 5 días después de la inoculación. B) clorosis y puntos necróticos en hojas laterales.

Clonación y secuenciación de RNA M del genoma de TSWV

Los segmentos completos M y S, para los tres aislamientos mexicanos de TSWV se amplificaron por RT-PCR, clonados, secuenciados y depositados en el GenBank. Se analizaron las secuencias haciendo comparaciones entre ellos y con otras secuencias disponibles en el NCBI. La longitud de nucleótidos para el segmento M de los tres aislamientos mexicanos fue de 4750 nt para TSWV-L, 4784 en TSWV-P y 4765 nt, TSWV-T. Estos números se encuentran dentro del tamaño promedio de acuerdo a las secuencias repostadas en NCBI.

Al sumar de los genomas completos M y S RNA observamos que los aislamientos mexicanos TSWV-T y TSWV-L fueron los más grandes con 7750 y 7655 nt, respectivamente, en comparación con TSWV-P con 7240 nt.

La organización y disposición de los segmentos secuenciados fue consistente con respecto a otros aislamientos de TSWV reportados en todo el mundo:

Dos marcos de lectura abierta (ORF), separados por una región intergénica rica AU se clonaron y secuenciaron. La región 5' y el extremo 3 de 100 y 84 nt de longitud, respectivamente (Figura 7-A). La región IR del TSWV-L es de 251 nt., mientras que TSWV-P y TSWV-T de 262 nt con un 95% de similitud entre ellos. La diferencia se debe a la ausencia de 11 nucleótidos en la IGR del TSWV-L que condujo a una ligera diferencia en la estructura secundaria del RNA (Figura 6)

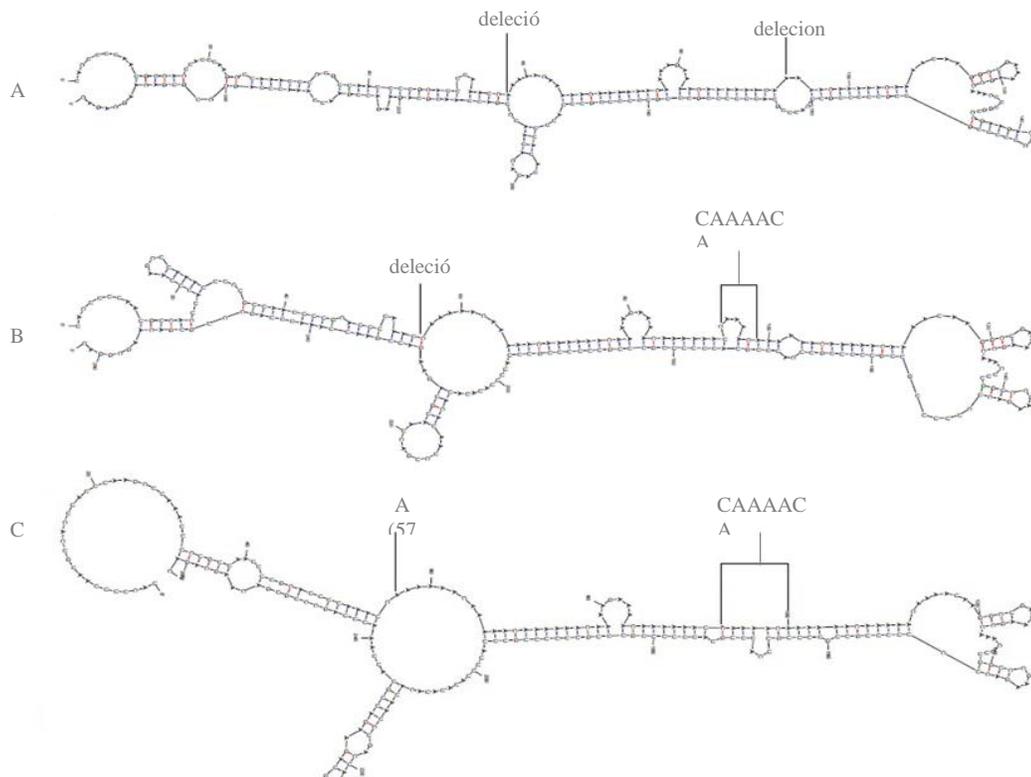


Figura 6. Predicciones de las estructuras secundarias de la región intergénica (IGR) del segmento M para los aislamientos mexicanos TSWV-L, P y T. Las diferencias de nucleótidos se muestran en el bucle de la estructura del tallo para cada aislamiento; así como su ausencia (delecciones) en el aislado L. (A) TSWV-T dG = energía liberada inicial -43,67 y al final -53,40 ; (B) TSWV-P dG = energía liberada inicial -41,73 y al final -53,10; (C) TSWV-L dG = energía liberada inicial -46,43 y al final -53,10.

La traducción *in silico* resultó en dos marcos de lectura abierto (ORF's). El primer ORF comienza en los nucleótidos 101 a 1 009 nucleótidos (nt) que codifica para la proteína de NSm con 302 aminoácidos (aa) mientras que el segundo ORF es la hebra complementaria viral que va de 1 277 a 4 684 nt y codifica para la proteína precursora Gn-Gc compuesta por 1136aa (Figura 7-A). Los tres aislamientos mexicanos se asemejan en tamaño, pero difieren en nucleótidos, en la proteína NSm la diferencia fue del 99,3% y para Gn-Gc del 97,8%.

Las diferencias de nucleótidos en la proteína NSm fueron diez sustituciones sinónimas que no alteran la traducción de aminoácidos y se ubicaron en las posiciones 180, 366, 372, 438, 489, 528, 630, 660, 687 y 873 (no se muestra en la Figura 7). Las sustituciones sinónimas fueron mayores en el aislado TSWV-L (60%) en comparación con los aislamientos de TSWV-T y TSWV-P (20% para ambos) (datos no mostrados). En la proteína NSm sólo se encontraron dos cambios no sinónimos para los tres aislamientos en las posiciones de aminoácidos 44 y 147: una leucina (L) y asparagina (N) para el aislado TSWV-L y una isoleucina (I) y lisina (L) para TSWV-T y P (Figura 7-A).

La región codificante Gn-Gc de los tres aislamientos TSWV-L, P y T se encontraron diecinueve cambios no sinónimos. De estos, cinco fueron inherentes a TSWV-L y cuatro estuvieron presentes en la primera mitad (Gn), de la bipeptina; mientras que los otros 16 se produjeron en la región de Gc y se compartieron por pares con los tres aislamientos diferenciales (Figura 7-A).

Análisis filogenético del RNA M de TSWV

Basados en los alineamientos de las secuencias obtenidas, se generaron árboles filogenéticos para cada región mediante el programa Clustal X. La longitud completa de nucleótidos de las proteínas NSm y Gn-Gc de los tres aislamientos mexicanos y se comparó con los reportados a nivel mundial. Incluyó 65 secuencia completa NSm (909 pb) y 59 de la proteína Gn-Gc (3926 pb).

La UTR 5' del segmento de RNA M de los aislamientos mexicanos no tuvieron cambios entre ellos. Sin embargo, hubo algunos cambios observados en sus extremos UTR 3', que llevaron a la separación de los aislamientos mexicanos a un grupo filogenético diferente, comparado con los aislamientos resto del otro mundo (Figura 8-B). Esto se debió a cuatro cambios únicos en esta región para los aislamientos mexicanos. (Figura 8-A).

Las muestras analizadas en esta tesis fueron colectadas en dos diferentes años (2008 y 2009), se consideró interesante verificar las diferentes proteínas por separado para conocer el comportamiento del virus. El análisis filogenético de NSm agrupó a los aislamientos mexicanos de tomate y pimiento en la misma rama, los cuales fueron colectados en diferente año. Todos los aislados de TSWV mexicanos se ubicaron en el mismo grupo donde se encuentran el tomate, pimiento, crisantemo, el tabaco y la lechuga de EE.UU, Korea, España, Japón y China. Se mostró que la agrupación no es exclusiva de una zona geográfica y tampoco por el tipo hospedero (Figura 9).

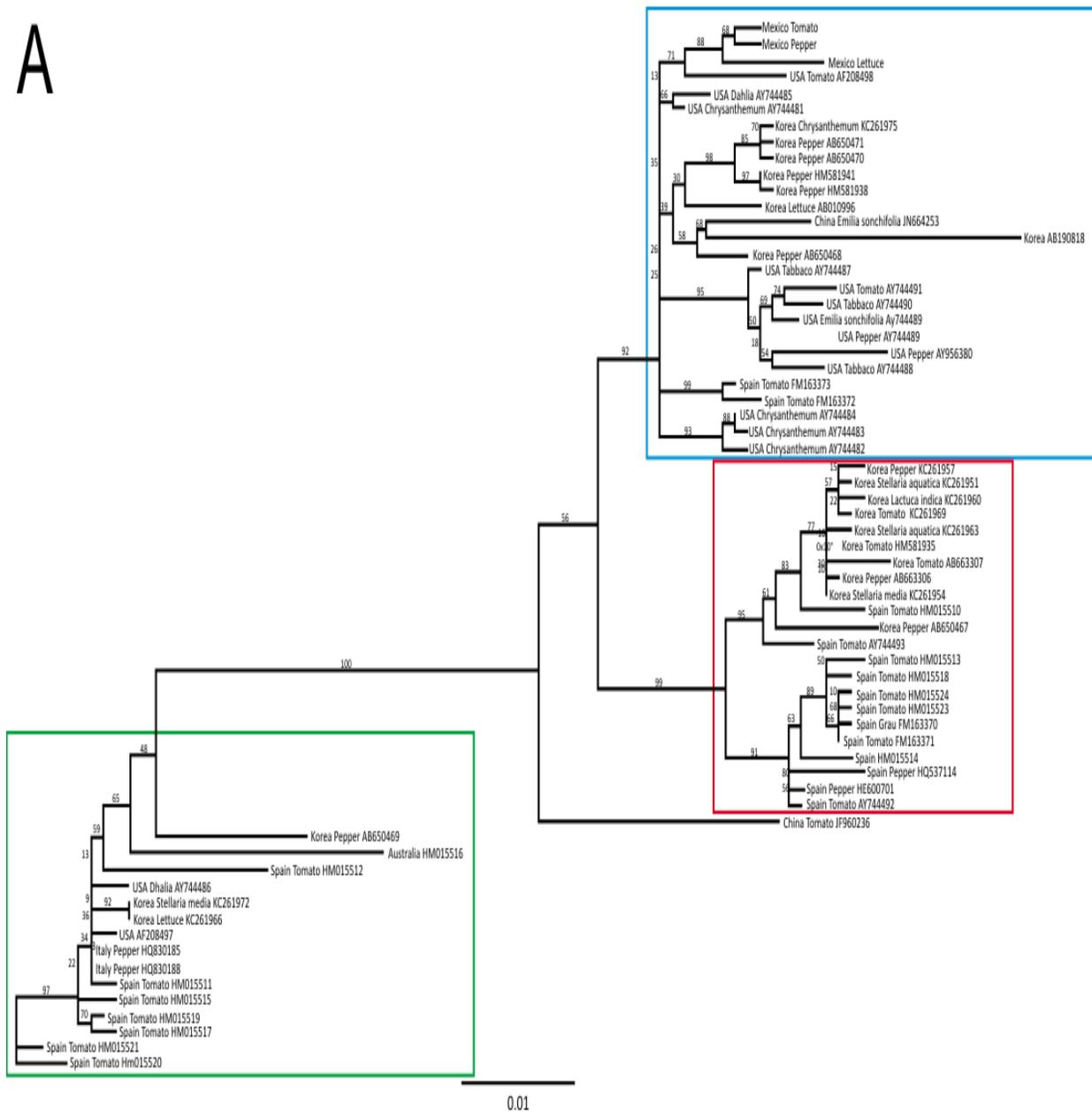


Figura 9. Análisis filogenético sin raíz del *Tomato spotted wilt virus* (TWSV) de la región genómica RNA M. Relación de secuencias basadas en la secuencia de nucleótidos. (A) Proteína no estructural (NSm) y (B) Poliproteína precursora (Gn-Gc), con otros aislamientos reportados de diversas regiones del mundo. El árbol filogenético fue construido por el método Neighbor-Joining (NJ) y Kimura 2- parámetros. La robustez de los árboles fue estimada usando 1000 reiteraciones. En los entrecodos se muestra los valores de remuestreo o “bootstrap”. Los diferentes colores de fondo indican los diferentes grupos de aislamientos de TSWV.

B



Figura 9. Continuación

Clonación y secuenciación de RNA S del genoma de TSWV

El tamaño en nucleótidos para segmento RNA S de los tres aislamientos de TSWV mexicanos fue de 2,905 para la TSWV-L, 2,456 para TSWV- P y 2,985 nt para TSWV- T. Como era de esperarse, las secuencias para cada aislado contienen ORFs. La primera tiene una orientación negativa desde el nucleótido 89 al 1483(Figura 7-B). La proteína NSs se codifica con 468 aminoácidos, también se determinó la traducción *in silico*. El segundo ORF, que va del nucleótido 1987 al 2763, que codifica para la proteína NP (258 bis). La similitud de nucleótidos para el S RNA fue de 99,1% en el NSS y el 99,9% en la NP.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos derivadas de los dos ORFs de este segmento, la NSs, asociada al silenciamiento genético, mostró cuatro cambios en las posiciones 77, 108, 155 y 405. Los dos primeros atribuido al aislamiento TSWV- P; mientras que los otros sólo para el aislado TSWV- L (Figura 7-B).

Análisis filogenético del RNA S de TSWV

El análisis filogenético basado en los alineamientos de secuencia de aminoácidos de la proteína NSs mexicana con otro 36 aislamiento del segmento completo de RNA S y 97 con solo NSs reportados en el GenBank, mostro la tendencia de separar geográficamente, y de alguna manera relacionada con el país (Figura 10A). La topología del árbol tenía un ligero cambio cuando se agregaron más de 39 secuencias, que agrupa a los asiáticos y a la mayoría de los aislamientos europeos, en su mayoría de España (Figura 10B).

La región intergénica no codificante (IGR) fue de 504 nt, rica en AU y los tres aislamientos con la misma forman de estructura secundaria típica (datos no mostrados).

La región NP del RNA S de México, Corea, Taiwán, España y EE.UU. reveló una identidad significativa de 99%. Dentro de ellos, las proteínas del segmento NP mexicanas no fueron variables (datos no mostrados).

A

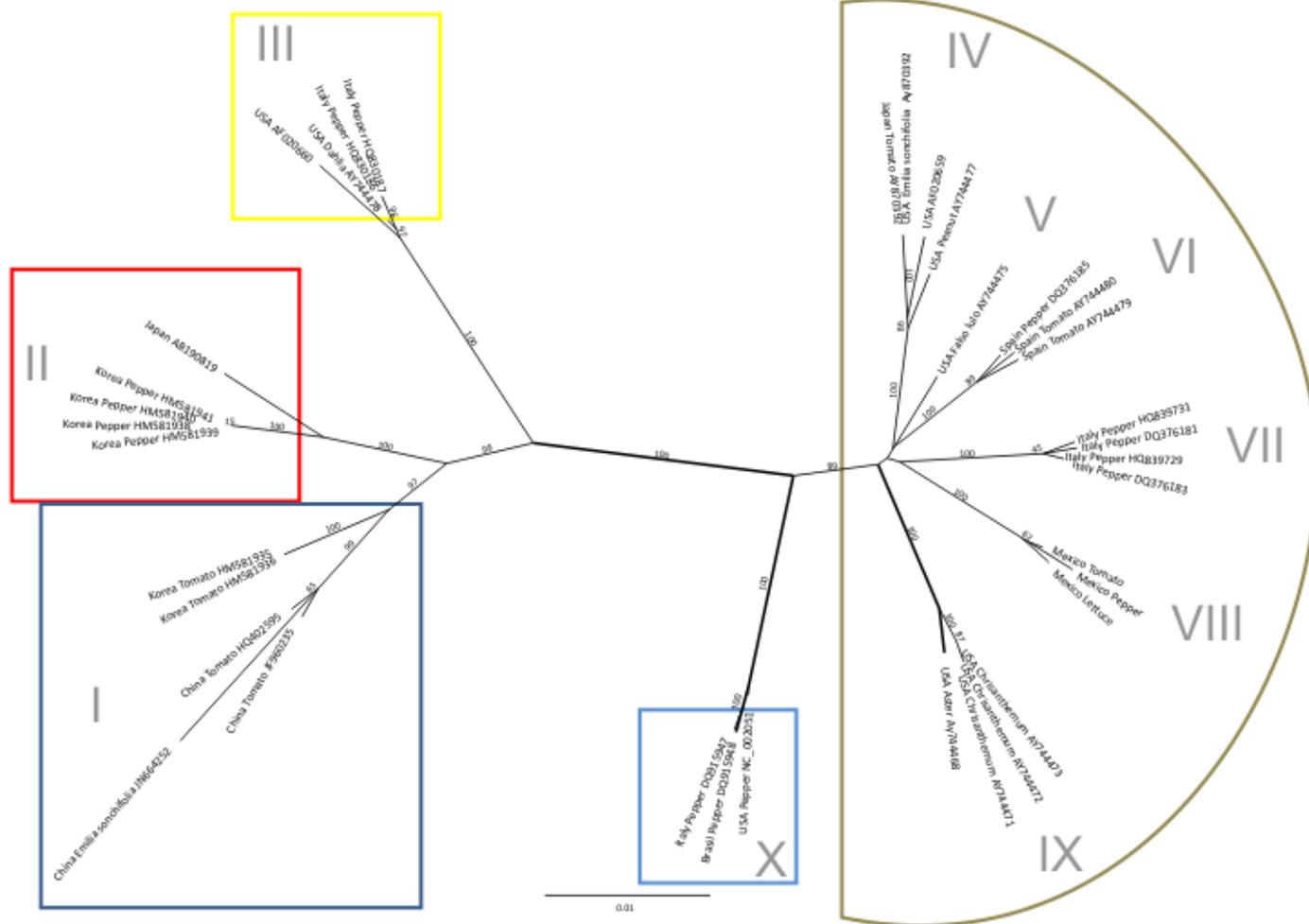


Figura10. Análisis filogenético sin raíz del *Tomato spotted wilt virus* (TWSV) de la proteína NSs. Relación de las secuencias basadas en previos reportes de nucleótidos. (A) Árbol construido con 39 aislamientos reportados y (B) con 100 aislamientos de otras partes del mundo. El árbol filogenético fue construido por el método Neighbor-Joining (NJ) y Kimura 2- parámetros. La robustez de los árboles fue estimada usando 1000 reiteraciones. En los entrecodos se muestra los valores de remuestreo o “bootstrap”. Los diferentes colores de fondo indican los diferentes grupos de aislamientos de TSWV.

B

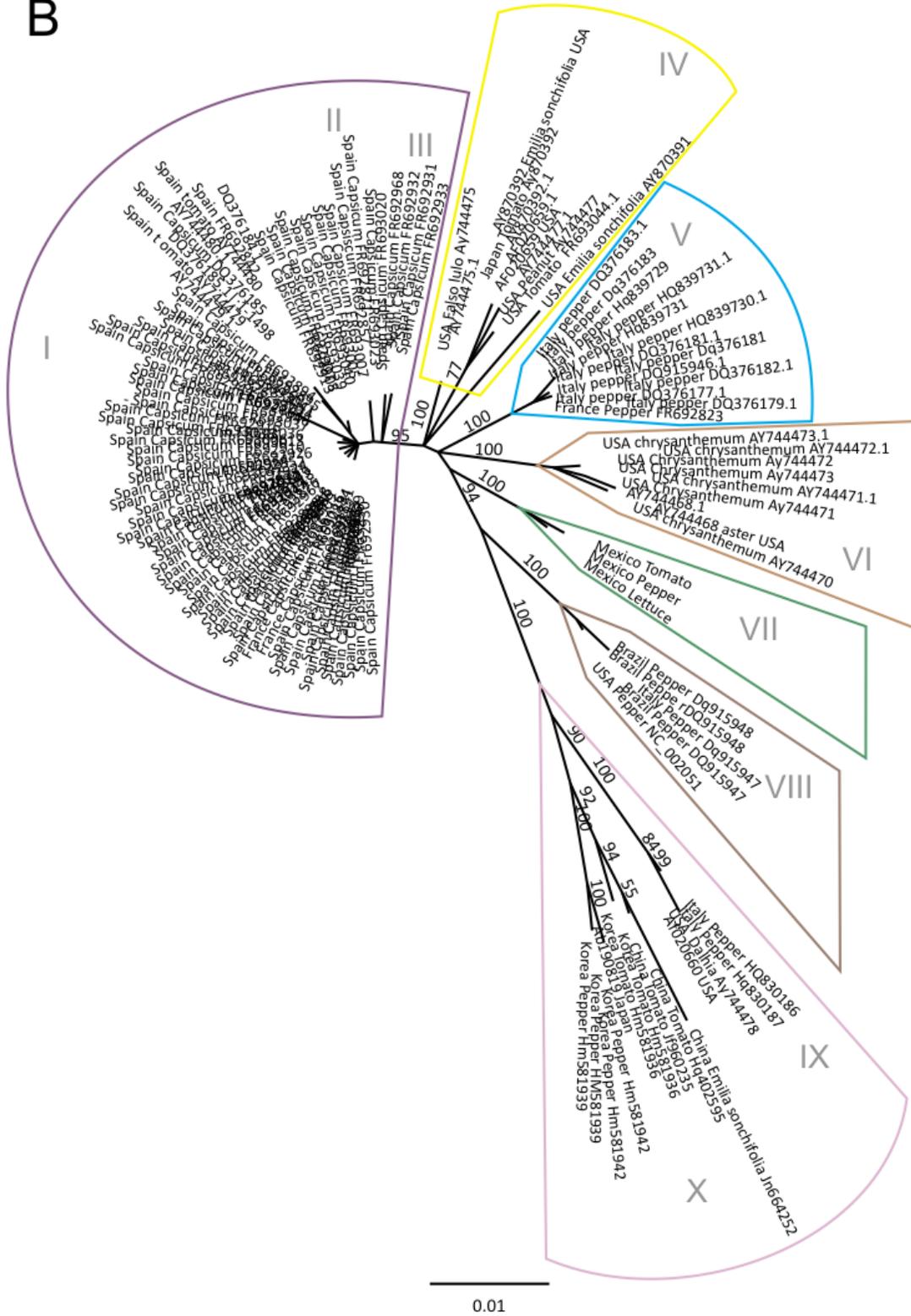


Figura 10. Continuación.

IV. DISCUSIÓN

Muchos aislamientos de TSWV se han caracterizado en diferentes partes del mundo (Antignus *et al.*, 1997; de Avila *et al.*, 1990; Chiemsombat *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2011; Naidu *et al.*, 2007; Nagata *et al.*, 2000; Boiteux *et al.*, 1993), pero ninguna de la parte sur (México), ni centro de Norte América; a excepción de una cepa proveniente de Sur América (Brasil) (De Haan *et al.*, 1989). En los últimos años TSWV ha causado grandes pérdidas en hortalizas y ornamentales en México, sobre todo en la lechuga, el tomate y el pimiento.

En este trabajo, tres aislamientos mexicanos de TSWV uno de lechuga, pimiento y tomate fueron caracterizados biológica y molecularmente. Los tres diferentes aislamientos de TSWV fueron variables en expresión y gravedad de los síntomas al utilizar dieciséis plantas diferenciales.

La caracterización biológica demostró que el aislado de TSWV-L es el más agresivo en su forma original (lechuga), así como en un conjunto de hospedantes diferenciales. Por el contrario, TSWV T y TSWV-P fueron leves en ambos tipos de hospedantes. El aislamiento agresivo de TSWV en lechuga también se ha reportado antes en Tasmania y Hawái (Wilson, 1998; Mitchell *et al.*, 1987). Los aislamientos leves de TSWV-P y TSWV-T tienen características similares de acuerdo con informes anteriores de otros aislamientos leves de TSWV que infectan pimiento y tomate en otras partes de México, como Morelos y el estado de México (De la Torre *et al.*, 2002).

Para nuestro conocimiento, el aislado de lechuga, también reportado como agresivo (Wilson, 1998), no había sido reportado que infectaba *Zea mays* (maíz) en ningún trabajo anterior. Las especies de la familia *Poaceae* como la avena y trigo, estaban creciendo dentro de la zona en la que el aislado de TSWV-L se obtuvo (Estado de Querétaro). La posibilidad de que el maíz sea un huésped alternativo para TSWV no puede descartarse. De hecho, TSWV, en un sistema de cultivo intercalado de maíz y tomate, no disminuyó su incidencia en los tomates cuando se utilizaba el maíz como una barrera para los Trips (Ramkat *et al.*, 2008). Nuestro aislamiento TSWV-L fue muy agresivo en las plantas diferenciales probadas. Por el contrario, no existen reportes experimentales de la reacción de hospederos diferenciales con los otros dos aislamientos de lechuga de Tasmania y Hawái, que puedan tener reacciones similares.

La secuencia de nucleótidos de los segmentos RNAM y S para los aislamientos mexicanos de TSWV (L, P y T) reveló que sus secuencias genómicas parciales varían muy poco entre sí mismos, debido a que están por encima del 98%. A pesar de esta similitud, el tamaño de la secuencia para el TSWV-L es más grande (7655 nt) que los otros dos, pero todavía más pequeño que el más grande de lechuga reportado de 7790 para un aislado de Korea (Lian *et al.*, 2013). La principal diferencia de los aislamientos mexicanos se ubica a nivel de nucleótidos en el segmento RNA M más específicamente en la IGR que al encontrarse defectuoso puede ser el modulador de la infección viral y 5'UTR que tiene la capacidad de interactuar con la traducción de proteínas.

En cuanto a las diferencias de aminoácidos en las tres proteínas (NSm, Gn- Gc), del segmento RNA M entre los aislamientos de México, la más variable fue la Gn-Gc (con 19 cambios no sinónimos). Esto no es extraño, ya que es una proteína altamente variable quizás no necesaria para la infección de TSWV, pero se requiere para la transmisión del virus a través de trips (Sin *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2004). Queremos destacar que cinco cambios fueron inherentes para el aislado TSWV-L agresivo. Después de analizar veinte aislamientos de los EE.UU. y España (Tsompana *et al.*, 2005), esta proteína se ha sugerido estar involucrada en la selección positiva debido a su papel en la transmisión viral. Las diferencias en Gn- Gc de TSWV para que sea o no transmitido por trips también se han reportado antes (Naidu *et al.*, 2007). Especulamos que las cinco diferencias de Gn- Gc en los tres aislamientos de TSWV podrían asociarse a la organización de selección o adaptación, junto con otras proteínas (que se examinan más abajo), ya que son específicos para el aislado de L, el único aislamiento capaz de infectar maíz. Los cambios en la proteína NSm se han reportado para un aislamiento defectuoso de pimiento incapaz transmitirse (Naidu *et al.*, 2007), tan bien en el rompimiento de resistencia en el gen *Sw-5* (López *et al.*, 2011; Margaria *et al.*, 2007). Los cambios que observamos en los aislamientos mexicanos pueden deberse a la agresividad de su huésped natural o experimental. Aún más, especulamos que la proteína NSm involucrada en el movimiento viral, podría estar relacionada con su capacidad de infectar sistémicamente a maíz, posiblemente tiene un papel debido a los cambios específicos en el aislado TSWV-L.

Los cambios en los aminoácidos (118 y 120) del NSm asociada al rompimiento de resistencia del gen *Tsw*, fueron diferentes a los mostrados (44 y 147 en la figura 8), por lo tanto podría

reforzar nuestra especulación de una posible participación de estos cambios para la infección sistémica del maíz.

A excepción de la región UTR (discutido más adelante), hay una clara demarcación geográfica o de anfitrión que fue observado en el análisis de la NSm, ni para las proteínas Gn- Gc del fragmento RNA M.

Esto podría reflejar la versatilidad a menudo reportada para adquirir cambios en la Gn-Gc, debido a la recombinación del gen para adaptarse rápidamente a nuevos genotipos del hospedante de diferente origen como se sugirió antes (Qiu & Moyer, 1999), en lugar de moverse el virus por contaminación de semilla, solo encontramos un informe que describir la presencia del virus en la cubierta de la semilla de tomate (Antignus *et al.*, 1997).

La separación de un grupo mexicano de otros grupos, de acuerdo a su UTR 3', fue una sorpresa ya que esta región está involucrada principalmente en las actividades de la transcripción (Blakqori *et al.*, 2009) y suponemos que es muy conservada, por lo que no encontrado explicación posible aparte de que la presencia de cuatro cambios detectados, en comparación con un sólo cambio en las secuencias de EE.UU., Italia, España, Corea y Japón, y ninguno en comparación con el resto de las 50 secuencias nos llevaron a la topología del árbol filogenético (Figura 9).

Por último, la secuencias de IGR alineadas para los aislamientos de TSWV México puso de manifiesto algunas características interesantes con respecto la inserción o deleción de siete nucleótidos observada en el aislado TSWV- L y con respecto a los TSWV-P y T. Se han encontrado diferencias equivalentes para nueve aislamientos de EE.UU., uno Brasileño y uno Japonés (Bhat *et al.*, 1999).

En este trabajo, sugerimos que estas estructuras posiblemente facilitan la replicación de los aislamientos al terminar la transcripción en sus diferentes huéspedes. Y no podemos descartar la posibilidad de que la falta de los siete nucleótidos en la estructura secundaria del IGR para el aislado TSWV-L podría también estar implicada con la severidad de síntomas al aumentar la replicación en su hospedante u otros.

Segmento RNA S

En la proteína NP no hubo cambios en la composición de aminoácidos de los aislamientos de México y muy pocos cambios fueron detectados a alinearlos con otras partes del mundo. Está proteína es muy conservada debido a que forma parte estructural en el complejo de

replicación Cho *et al.*, 1997). Existen informes similares en aislamientos de maní, tomate y pimiento de Georgia (Jain *et al.*, 1998). Señalado antes por Tentchev *et al.*, (2011), sustituciones en aminoácidos para el gen NP del RNA S son perjudiciales para el virus.

Una característica sobresaliente fue la posición filogenética de la proteína NSs de los aislamientos Mexicanos al mantenerse en un solo clado (Figura 10B). Esta proteína suprime el mecanismo de defensa de la planta, el movimiento viral y su replicación. Recientemente se demostró que funciona como NTPasa y fosfatasa (Lokesh *et al.*, 2010). Tal vez los cambios en esta proteína le permitan eludir los mecanismos de defensa viral a través de silenciamiento de genes, o cambiar las actividades enzimáticas en los diferentes hospederos. La representación del árbol filogenético (Figura 10) no mostro cambios, comenzando con 39 secuencias o después de incorporar 61 (reportes del RNA S en el GenBank), se separaron por clado lo que fundamenta la propuesta del origen geográfico del hospedero (Tsompana *et al.*, 2005).

V. CONCLUSIONES

La presencia de TSWV en ocho estados de la República Mexicana se confirmó por ensayos serológicos de ELISAS. Tres cultivos fueron los afectados (tomate, pimiento y lechuga). Y en México es el primer reporte de TSWV en lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Se realizó por primera vez la caracterización biológica y molecular de tres aislamientos mexicanos de TSWV, colectados en dos estados de la República Mexicana durante 2008-2009.

Los síntomas observados en las plantas indicadoras con los aislamientos mexicanos variaron en intensidad y características. Se estableció una primera caracterización de un aislado severo y dos leves.

No hubo variación en el tamaño de los aislamientos mexicanos con respecto a las ORGs de las secuencias estudiadas. Y las regiones genómicas correspondientes a los segmentos de RNA M y S fueron útiles para diferenciar los aislamientos mexicanos a través de la caracterización molecular.

El análisis comparativo biológico y molecular de los tres mexicanos aislamientos de TSWV, se diferenció en su agresividad y capacidad de infectar plantas diferenciales esto se asoció a los cambios observados en las proteínas NSS, NSm y la IGR de cada aislado.

VI. LITERATURA CITADA

- Adkins, S., Quadt, R., Choi, T. J., Ahlquist, P. and German, T. 1995. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of Tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting bunyavirus. *Virology* 207:308-311.
- Antignus, Y., Lapidot, M., Ganaim, N., Cohen, J., Lachman, O., Pearlsman, M., Raccach, B. & Gera, A. 1997. Biological and Molecular Characterization of Tomato Spotted Wilt Virus in Israel 25: 319–330.
- Badillo-Vargas, I. E., Rotenberg, D., Schneeweis, D. J., Hiromasa, Y., Tomich, J. M. & Whitfield, a E. 2012. Proteomic analysis of *Frankliniella occidentalis* and differentially expressed proteins in response to tomato spotted wilt virus infection. *J Virol* 86:8793–809.
- Bag, S., Mitter, N., Eid, S. & Pappu, H. R. 2012. Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PLoS One* 7: e44803.
- Bhat, A. I., Pappu, S. S., Pappu, H. R., Deom, C. M. & Culbreath, A. K. (1999). Analysis of the intergenic region of tomato spotted wilt Tospo 6 irus medium RNA segment 61, 161–170.
- Blakqori, G., van Knippenberg, I. & Elliott, R. M. (2009). Bunyamwera orthobunyavirus S-segment untranslated regions mediate poly(A) tail-independent translation. *J Virol* 83, 3637–46.
- Boiteux, L. S., Nagata, T., Dutra, W. E. & Fonseca, M. E. N. (1993). wild species of *Capsicum* 89–94.
- Bucher, E., Sijen, T., De Haan, P., Goldbach, R. and Prins, M. 2003. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J Virol* 77: 1329-1336.
- Chapman, E. J., Hilson, P. and German, T. L. 2003. Association of L protein and in vitro Tomato spotted wilt virus RNA-dependent RNA polymerase activity. *Intervirology* 46: 177-181.
- Chiemsombat, P., Gajanandana, O., Warin, N., Hongprayoon, R., Bhunchoth, A. & Pongsapich, P. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. *Arch Virol* 153:571–7.
- Colón-Ramos DA, Irusta PM, Gan EC, Olson MR, Song J, *et al.* 200. Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol Biol Cell* 14: 4162–4172.

- Garcia, S., Billecocq, A., Crance, J. M., Prins, M., Garin, D. & Bouloy, M. 2006. Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *J Gen Virol* 87:1985–1989.
- Geerts-Dimitriadou, C., Lu, Y.-Y., Geertsema, C., Goldbach, R. & Kormelink, R. 2012. Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PLoS One* 7: e31013.
- De Avila, a C., Huguenot, C., Resende, R. D. O., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W. & Peters, D. 1990. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* 71 (12): 2801–7.
- De Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D. & Goldbach, R. 1989. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* 70 (12): 3469–73.
- De Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D. & Goldbach, R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J Gen Virol* 71 (5): 1001–7.
- De Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D. & Goldbach, R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol* 72 (9): 2207–16.
- De la Torre, A. R., Téliz, O. D., Barrón, B. L., Cárdenas, E. L. García, E., Cárdenas M., & Valverde R. A. 1998. Incidence of weed reservoirs and vectors of tomato spotted wilt tospovirus on southern Tasmanian lettuce farms. *Plant Pathol* 47, 171–176.
- De la Torre, A. R., Cervantes, D. L., Houston, H. A., Valverde, R. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (tswv) *Agrociencia* 36: 211–221.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M. & Thomma, B. P. H. J. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 539– 548.
- Hart TJ, Kohl A, Elliott R. M. 2009 Role of the NSs Protein in the Zoonotic Capacity of Orthobunyaviruses. *Zoonoses and Public Health* 56: 285–296.
- Ibáñez, A., Díaz, R., Rafael, P., Rivera, F., Económica, I., El, E. N., Guanajuato, E. D. E., Pérez-moreno, L., Rico-Jaramillo, E. *et al.* 2004. Identificación de Virus Fitopatógenos en Cultivos Hortícolas de Importancia Económica en el Estado de Guanajuato , México. *Mex J. Phytopatology* 22: 187–197.
- Jain, R. K., Pathology, P., Pappu, S. S. & Pappu, H. R. 1998. Molecular Diagnosis of Tomato Spotted Wilt Tospovirus Infection of Peanut and Other Field and Greenhouse Crops 82: 900–904.

- Kikkert, M., Lent, J. Van, Storms, M., Kormelink, R., Goldbach, R. & Goldbach, R. O. B. 1999. Tomato Spotted Wilt Virus Particle Morphogenesis in Plant Cells *J. virology* 73:2288-2297.
- Kikkert, M., Verschoor, A., Kormelink, R., Goldbach, R., Verschoor, A. D., Rottier, P. & Goldbach, R. O. B. 2001. Tomato Spotted Wilt Virus glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *J. virology* 75(2):1012-2001.
- Kormelink, R., van Poelwijk, F., Peters, D. & Goldbach, R. 1992. Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of tomato spotted wilt virus mRNAs. *J Gen Virol* 73 (8): 2125–8.
- Kormelink, R 2011. The molecular biology of tospoviruses and resistance strategies. In: “The Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology” Plyusnin A, Elliott RM, eds. Norwhich, UK: Horizon Scientific Press.
- Morales-díaz, M. V., Alcacio-rangel, S., De la Torre, A. R (2008). Tomato spotted wiltvirus: agente causal de la marchitez del miguelito (*Zinnia elegans* Jacquin) in Morelos,Edo. México. *Agrociencia* 42: 335-347.
- Larkin, M. a, Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. a, McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, a & other authors. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–8.
- Lee, J.-S., Cho, W. K., Kim, M.-K., Kwak, H.-R., Choi, H.-S. & Kim, K.-H. 2011. Complete genome sequences of three tomato spotted wilt virus isolates from tomato and pepper plants in Korea and their phylogenetic relationship to other TSWV isolates. *Arch Virol* 156:725–8.
- Li, W., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E. & Adkins, S. 2009. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390: 110–21. Elsevier B.V.
- Lian, S., Lee, J.-S., Cho, W. K., Yu, J., Kim, M.-K., Choi, H.-S. & Kim, K.-H. 2013. Phylogenetic and recombination analysis of tomato spotted wilt virus. *PLoS One* 8: e63380.
- Llamas-Llamas, M. E., Zavaleta-Mejia, E., Gonzalez-Hernandez, V. a., Cervantes-Diaz, L., Santizo-Rincon, J. a. & Ochoa-Martinez, D. L. (1998). Effect of temperature on symptom expression and accumulation of tomato spotted wilt virus in different host species. *Plant Pathol* 47, 341–347.
- Lokesh, B., Rashmi, P. R., Amruta, B. S., Srisathiyanarayanan, D., Murthy, M. R. N. & Savithri, H. S. (2010). NSs encoded by groundnut bud necrosis virus is a bifunctional enzyme. *PLoS One* 5: e9757.
- López, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F. & Rubio, L. 2011. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* 92: 210–5.

- Maiss, E., Ivanova, L., Breyel, E. and Adam, G. (1991). Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* 72: 461-464.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D. & Turina, M. 2007. Evidence that the nonstructural protein of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the TSW gene. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 547–58.
- Milne, R. G. & Franck, R. I. B. 1984. Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae? *Intervirology* 22: 72-76.
- Mitchell, C., Gonsalves, D. & Yudin, L. S. 1987. Host list of plants susceptible to tomato spotted wilt virus (tswv). University of Hawaii, 3050 Maile Way, Gilmore 119, Honolulu, Hawaii 96822. Price.
- Morse JG, Hoddle MS. 2006. Invasion biology of thrips. *Annu. Rev. Entomol.* 51:67–89.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, a K., Prins, M., Goldbach, R. & Peters, D. 2000. Impeded Thrips Transmission of Defective Tomato spotted wilt virus Isolates. *Phytopathology* 90:454–9.
- Naidu, R. a., Sherwood, J. L. & Deom, C. M. 2007. Characterization of a vector-non-transmissible isolate of Tomato spotted wilt virus. *Plant Pathol* 57:190-200.
- Ochoa, M., Zavaleta-Mejía L., Johansen, E., Herrera, N. R. M., Cárdenas, G. A. 1996. Tospoviruses, weeds and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris). *Int. J. Pest Manage.* 42, 157–159.
- Oliveira, V. C., Bartasson, L., de Castro, M. E. B., Corrêa, J. R., Ribeiro, B. M. & Resende, R. O. 2011. A silencing suppressor protein (NSs) of a tospovirus enhances baculovirus replication in permissive and semipermissive insect cell lines. *Virus Res* 155, 259–67.
- Pappu, H. R., Jones, R. a C. & Jain, R. K. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res* 141: 219–36.
- Portela, A. and Digard, P. 2002. The Influenza virus nucleoprotein: A multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83:723-734.
- Pringle, C.R. 1991. The Mononegavirales. In *Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: 239-262.
- Qiu, W. & Moyer, J. W. 1999. Tomato Spotted Wilt Tospovirus Adapts to the TSWV N Gene-Derived Resistance by Genome Reassortment. *Phytopathology* 89: 575–82.
- Ramkat, R. C., Wangai, a. W., Ouma, J. P., Rapando, P. N. & Lelgut, D. K. 2008. Cropping system influences Tomato spotted wilt virus disease development, thrips population and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ann Appl Biol* 153: 373–380.

- Ribeiro, D., Borst, J. W., Goldbach, R. & Kormelink, R. 2009. Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology* 383:121–30.
- Sin, S.-H., McNulty, B. C., Kennedy, G. G. & Moyer, J. W. 2005. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5168–73.
- Soellick T, Uhrig J, Bucher G, Kellmann J, Schreier P (2000) The movement protein NSm of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2373–2378.
- Storms, M. M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J. W. & Goldbach, R. W. 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214: 485–93.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. & Okuno, T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus NSs 532: 75–79.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J. M. & Moury, B. 2011. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *J Gen Virol* 92, 961–73.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. & Moyer, J. W. 2005. The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Mol Ecol* 14:53–66.
- Van Knippenberg, I., Goldbach, R. and Kormelink, R. 2004. Tomato spotted wilt virus transcription in vitro is independent of translation. *Journal of General Virology* 85, 1335–1338.
- Van Knippenberg, I., Goldbach, R. & Kormelink, R. 2005. Tomato spotted wilt virus S-segment mRNAs have overlapping 3'-ends containing a predicted stem-loop structure and conserved sequence motif. *Virus Res* 110: 125–31.
- Van Knippenberg, I., Fragkoudis, R. & Elliott, R. M. 2013. The transient nature of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein expression: effects of increased stability of NSs protein on virus replication. *PLoS One* 8: e64137.
- Van Poelwijk, F., Kolkman, J. and Goldbach, R. 1996. Sequence analysis of the 5' ends of Tomato spotted wilt virus N mRNAs. *Arch Virol* 141: 177–184.

- Von Bargen, S., Salchert, K., Paape, M., Piechulla, B. & Kellmann, J.-W. 2001. Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiol Biochem* 39: 1083–1093.
- Walter, C. T. & Barr, J. N. 2011. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol* 92: 2467–84.
- Weber F, Dunn EF, Bridgen A, Elliott R. M. 2001. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology* 281: 67–74.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E. & German, T. L. 2004. Expression and Characterization of a Soluble Form of Tomato Spotted Wilt Virus Glycoprotein G N *J. virology* 78(23), 13197-13206.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E., German, T. L. 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Ann Rev Phytopathol* 43:459–489.
- Wilson, C. R. (1998). Incidence of weed reservoirs and vectors of tomato spotted wilt tospovirus on southern Tasmanian lettuce farms. *Plant Pathol* 47, 171–176.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406–3415.

VII. APÉNDICE

Medio SOC

Componentes	1000 mL
Bacto-yeast extract	5 g
Bacto tryptone	20 g
KCl	0.186 g
MgCl ₂ o MgSO ₄	0.952 g ó 2 408 g
NaCl	0.584 g
Glucose	3 603 g
H ₂ O	1000 mL

Ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio.