



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
BEGOMOVIRUS Y FITOPLASMAS ASOCIADOS A  
UNA INFECCIÓN MIXTA EN CALABACITA  
*Cucurbita pepo* L. EN B.C.S., MÉXICO.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

**MAYELA VARGAS SALINAS**

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2017.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 23 del Mes de Noviembre del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BEGOMOVIRUS Y FITOPLASMAS ASOCIADOS A UNA INFECCIÓN MIXTA EN CALABACITA *Cucurbita pepo* L. EN B.C.S., MÉXICO."**

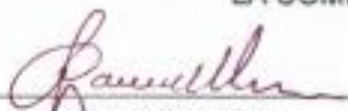
Presentada por la alumna:

### MAYELA VARGAS SALINAS

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Director de Tesis



Dra. Araceli Piroghoeyan Melkoyan  
Co-Tutora



Dra. Irasema E. Luis Vilaseñor  
Co-Tutora



Dra. Norma Yolanda Hernández Salvedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Director de Tesis**

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Co-tutor**

Dra. Arevik Phoghosyan Melkoyan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Co-tutor**

Dra. Irasema E. Luis Villaseñor

Universidad Autónoma de Sinaloa

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Dra. Arevik Phoghosyan Melkoyan

Dra. Irasema E. Luis Villaseñor

## **JURADO EXAMEN DE GRADO**

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Dra. Arevik Phoghosyan Melkoyan

Dra. Irasema E. Luis Villaseñor

### **Suplente**

Dra. María Gorety Caamal Chan

## Resumen

Desde 2010, en la región agrícola de La Paz, BCS, México, en el cultivo de calabacita (*Cucurbita pepo*) se han observado síntomas que se han asociado a una enfermedad mixta en la que pudieran estar involucrados dos patógenos (begomovirus y fitoplasmas) ya detectados en otros cultivos de la región, tales como: hojas pequeñas, severo retraso de crecimiento y deformación de frutos. Relacionados con begomovirus, se han detectado problemas de enrollamiento de la hoja, mosaicos y engrosamiento de venas; y atribuidos a fitoplasmas, amarillamiento y alta proliferación de brotes axilares. Adicionalmente, se observaron chicharritas y altas poblaciones de mosquitas blancas, insectos reportados como vectores de estos patógenos. El objetivo del presente trabajo fue identificar, caracterizar y realizar el estudio filogenético de los agentes causales de esta enfermedad, estimar el daño de la infección y llevar a cabo la identificación de los vectores. En el caso de los begomovirus, se realizó PCR con cebadores degenerados que amplifican la cubierta proteica y la región intergénica. Se obtuvo la secuencia completa del genoma con la técnica de círculo rodante, que analizada por alineamiento múltiple con otros begomovirus disponibles en GenBank, se comprobó una identidad entre el 98.8-99.1%. El aislado de BCS pertenece al begomovirus *Squash leaf curl virus* SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] GenBank MF187211A. La caracterización molecular del virus mostró que el SLCuV-BCS es un begomovirus bipartita, con componentes genómicos (A y B) de 2,638 y 2,608 pb; con 5 marcos de lectura abiertos en A y dos en B. El análisis filogenético mostró que SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] se establece entre dos grupos filogenética y geográficamente bien definidos como el clado SLCuV de Medio Oriente y SLCuV de Estados Unidos. La detección preliminar de fitoplasmas se hizo con MEB, donde se confirmó la presencia del patógeno de acuerdo a las características morfológicas observadas en los tejidos vasculares. La identificación y caracterización se realizó por PCR anidada amplificando la región del gen 16S ARNr de 1.2 kb. El análisis de alineamiento múltiple de las secuencias nt arrojó una similitud del 98.6% con '*Candidatus* Phytoplasma pruni'. Se observó la firma genética 'CAAGAYBATKATGTKTAGCYGGDCT', que establece la identidad de especie del fitoplasma. Los análisis filogenéticos ubicaron el aislado de BCS dentro del grupo 16SrIII. En la infección mixta observada en *C. pepo* de la región, están involucrados el SLCuV causante de la enfermedad del enrollamiento de la hoja de calabaza y el fitoplasma '*Ca. Phytoplasma pruni*', causante de la enfermedad X de Occidente. La estimación del daño de esta enfermedad mixta se consideró alta, al obtener valores promedio por arriba de 50% en los parámetros patométricos observados (incidencia, 71.8%; severidad, 49%; y prevalencia, 100%); además que la enfermedad se ha presentado de manera recurrente en los últimos años. Los análisis moleculares en *Bemisia tabaci* confirmaron la presencia del biotipo B y el papel de este insecto como vector al detectar el virus en ejemplares adultos. No se encontró el biotipo Q. Se caracterizó morfológicamente una chicharrita del género *Circullifer* sp. y por medio de análisis de PCR y RFLP, se detectó el fitoplasma, confirmando también su papel como vector. Esta investigación contribuye en la generación de conocimiento como el primer reporte de una infección mixta causada por begomovirus y fitoplasmas en *C. pepo* en el mundo y servirá a los organismos regulatorios fitosanitarios para que se establezcan medidas oportunas de manejo y control de la enfermedad.

**Palabras clave:** SLCuV, '*Ca. Phytoplasma pruni*', 16SrIII.

## Summary

Symptoms have been observed in the cultivation of the squash *Cucurbita pepo* in the agricultural region of La Paz, Baja California Sur (BCS), Mexico, which could be associated with a mixed disease where two pathogens (begomovirus and Phytoplasmas) were involved before and detected in other crops in the region since 2010. The symptoms associated with the mixed infection were: small leaves, severe stunted growth and fruit deformation. In addition, curled leaf, mosaic and vein thickening symptoms have been observed related to begomovirus and yellowing and high proliferation of axillary buds to Phytoplasmas. Moreover, leafhoppers and high populations of whitefly insects reported as vectors of these pathogens were observed. Thus the objective of this work was to identify, characterize and carry out a phylogenetic study of the causative agents of this disease to estimate infection damage and the identification of the vectors. In the case of begomoviruses, PCR was performed with degenerate primers that amplify the protein coat and the intergenic region. The complete genome sequence was obtained with the rolling circle technique, which by analyzing multiple alignments with other available GenBank begomoviruses obtained an identity from 98.8-99.1%. The isolate of BCS belonged to the begomovirus *Squash leaf curl virus* SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] GenBank MF187211A. The molecular characterization of the virus showed that SLCuV-BCS is a bipartite begomovirus with genomic components (A and B) of 2,638 and 2,608 bp, with 5 open reading frames in A and two in B. The phylogenetic analysis showed that SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] was established between two phylogenetic and geographically well defined groups such as the SLCuV clade of the Middle East and SLCuV of the United States of America. The preliminary detection of phytoplasmas was performed with scanning electron microscope where the presence of the pathogen was confirmed according to the morphological characteristics observed in the vascular tissues. The identification and characterization was performed by nested PCR amplifying the region of the 16S rRNA gene of 1.2 kb. The multiple alignment analysis of the nt sequences indicated a similarity of 98.6% with '*Candidatus* Phytoplasma pruni'. The genetic signature 'CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT' was observed, establishing the identity of the phytoplasma species. Phylogenetic analyzes located the BCS isolate within the 16SrIII group. Both the SLCuV causing the squash leaf curl disease and the '*Ca. Phytoplasma pruni*' causing the Western x-disease were involved in the mixed infection observed in the regional *C. pepo*. Analyzes showed damage estimation of this mixed disease, considering it high when average values were above 50% in the observed pathometric parameters (incidence, 71.8%, severity, 49%, and prevalence, 100%). In addition, the disease has recurred in recent years. Molecular analyzes in *Bemisia tabaci* have confirmed the presence of biotype B and the role of this insect as a vector when the virus was detected in adult insects. The Q biotype was not found. A leafhopper of the genus *Circulifer* sp. was morphologically characterized, and the phytoplasma was detected by PCR and RFLP analysis also confirming its role as a vector. This research contributes to the generation of knowledge as the first report in the world of a mixed infection caused by begomovirus and phytoplasmas in *C. pepo*, which will help phytosanitary regulatory bodies so that timely measures of disease management and control are established.

**Keywords:** SLCuV, '*Ca. Phytoplasma pruni*', 16SrIII.

## **Dedicatoria**

A Dios, por mi vida, mi familia, la fortaleza y guiar mis pasos en todo momento. ¡Gracias!

A mis Padres Julia Salinas D., Rogelio Vargas M. y mis ángeles, por su amor y bendiciones infinitas. Mamá, fuiste para mí el mejor ejemplo de una guerrera ante la vida. ¡Te Amo!

A mi amado esposo Eduardo Borbolla M. Gracias por tu amor, apoyo incondicional, comprensión y por compartir mis logros.

A mi amado hijo Eduardo Borbolla V., por ser mi fuente de inspiración y fortaleza.

A mi querida hermana-hija María D. Terrazas S., por escucharme, endulzar mi vida y por tu apoyo.

A mi querido hermano Roberto Vargas S. Gracias por tu apoyo, confianza y por darme ánimos.

A mis amigas y amigos de siempre, gracias por escucharme y estar siempre presentes.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo mediante de la beca No. 712459.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), por brindarme la oportunidad e instalaciones para realizar la presente investigación.

Al Dr. Ramón Jaime Holguín Peña, por ser mi tutor y guiarme, sobre todo, en el área del saber ver y contar la ciencia.

A mi cotutora, la Dra. Arevik Poghosyan Melconyan, por su disponibilidad para este trabajo y sus apreciados consejos.

A mi cotutora, la Dra. Irasema E. Luis Villaseñor, por su amabilidad y disponibilidad para este proyecto.

A la Dra. Diana Medina Hernández, por la confianza, la creencia en mí y guiarme por el camino lleno de retos que estaba buscando. ¡Gracias por adoptarme!. Por estar presente en el desarrollo de este proyecto, por compartir mis logros y por darme ánimos.

A la Dra. María Gorety Caamal Chan, por su tiempo, dedicación y acompañamiento en este trabajo.

A mis compañeros y hermanos del Laboratorio de Fitopatología: Jesús Ricardo H. Barrera, Omar Aranda López, María José Vázquez M., Ramsés Geraldo H. y Diana Rojas; gracias por compartir conocimientos, experiencias, por el buen ambiente en las jornadas de trabajo y la discusión de resultados.

Al Dr. Aarón Barraza Celis por su apoyo y orientación en Bioinformática.

A la Hidrob. María Sofía Ramos Galván, por su amabilidad y apoyo; porque hace que todo pueda fluir.

Al Biól. Ariel A. Cruz V. del Laboratorio de Microscopía Electrónica, por su apoyo y orientación en el procesamiento de muestras.

Al Dr. Dariel Tovar R. y a Patricia Hinojosa B., del Laboratorio de Fisiología Comparada, por su amabilidad, atención y por prestarnos algunos equipos, necesarios para este trabajo.

A todo el personal de Posgrado: Dra. Norma Hernández S., Lic. Osvelia Ibarra M., Lic. Leticia González R., Tania Verónica Núñez V., Lic. Claudia E. Olachea L. e Ing. Horacio Sandoval G; por todo el apoyo y disposición.

A todo el personal de Biblioteca: Ana María Talamantes C., María Esther Ojeda C., Susana Luna G. y E. Guadalupe Sánchez V. porque además de libros, artículos y asesorías, siempre nos brindan una sonrisa.

A la Maestra Diana L. Dorantes Salas gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos Catalina, Marlene y Miguel, gracias por la sana convivencia.

A todas las personas que me apoyaron para que este proyecto de tesis estuviera Listo!.

## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Lista de figuras</b> .....	viii
<b>Lista de tablas</b> .....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Importancia agronómica de la calabacita ( <i>Cucurbita pepo</i> L.).....	1
1.2 Las enfermedades begomovirales y fitoplasmáticas como limitante en la producción de cultivos de importancia agrícola.....	1
1.3 Begomovirus y fitoplasmas: agentes patógenos transmitidos por insectos vectores.....	5
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	8
2.1 Características del SLCuV y la enfermedad que causa en calabaza.....	8
2.2 Características de los fitoplasmas y distribución de las enfermedades que causan en calabaza.....	11
2.3 Sintomatología ocasionada por SLCuV en sus hospederos.....	15
2.4 Sintomatología ocasionada por fitoplasmas en sus hospederos.....	16
2.5 Las coinfecciones en los sistemas agroecológicos; una consecuencia de la interacción de dos o más patógenos en un hospedero.....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos específicos.....	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
6.1 Estudio de campo.....	21
6.1.1 Muestreo aleatorio simple y recolección de muestras.....	21
6.2 Monitoreo de insectos con trampas amarillas.....	22
6.3 Detección de begomovirus y fitoplasmas.....	23
6.3.1 Detección de begomovirus en plantas de <i>C. pepo</i> .....	23
6.3.1.1 Detección de SLCuV en calabacita y en <i>B. tabaci</i> .....	24



6.3.2	Detección de fitoplasmas .....	25
6.3.2.1	Detección de fitoplasmas por la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB).....	25
6.3.2.2	Detección de fitoplasmas por PCR en plantas e insectos .....	25
6.4	Identificación de begomovirus y fitoplasmas.....	26
6.5	Caracterización de begomovirus y fitoplasmas.....	26
6.5.1	Caracterización de SLCuV .....	26
6.5.2	Caracterización de fitoplasmas del grupos 16SrIII .....	27
6.6	Estudio filogenético de SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII.....	28
6.7	Determinación de los vectores .....	28
6.8	Patometría de infección mixta en <i>C. pepo</i> .....	29
6.8.1	Incidencia .....	29
6.8.2	Severidad.....	30
7.	<b>RESULTADOS</b> .....	31
7.1	Estudio de campo .....	31
7.1.1	Sintomatología asociada a infección mixta .....	32
7.2	Detección de begomovirus y fitoplasmas.....	35
7.2.1	Detección de begomovirus .....	35
7.2.1.1	Detección de SLCuV en calabacita y en mosca blanca.....	35
7.2.2	Detección de fitoplasmas .....	36
7.2.2.1	Detección de fitoplasmas por MEB.....	36
7.2.2.2	Detección de fitoplasmas en plantas e insectos.....	37
7.2.3	Identificación de begomovirus y fitoplasmas .....	38
7.3	Caracterización de begomovirus y fitoplasmas.....	39
7.3.1	Caracterización de SLCuV .....	39
7.3.2	Caracterización de fitoplasmas.....	45
7.4	Estudio filogenético de SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII.....	48
7.4.1	Estudio filogenético de SLCuV.....	48
7.4.2	Estudio filogenético de fitoplasmas del grupo 16SrIII.....	49
7.5	Determinación de los vectores .....	51
7.5.1	Determinación de biotipo de <i>B. tabaci</i> .....	51
7.5.2	Identificación preliminar de chicharrita .....	52
7.6	Patometría de infección mixta en <i>C. pepo</i> .....	53
7.6.1	Incidencia de SLCuV en <i>C. pepo</i> .....	54
7.6.2	Incidencia de fitoplasmas en <i>C. pepo</i> .....	55

7.6.3	Severidad.....	56
8.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	59
8.1	Identificación y caracterización molecular de begomovirus y fitoplasmas coinfectando <i>Cucurbita pepo</i> en BCS.....	59
8.1.1	<i>Squash leaf curl virus</i> (SLCuV).....	59
8.1.2	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' .....	62
8.2	Filogenia de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] y ' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' (16SrIII) .....	63
8.2.1	Análisis filogenético de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] .....	63
8.2.2	Análisis filogenético del ' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' grupo 16SrIII.....	64
8.3	Los insectos vectores que contribuyen en la coinfección de <i>C. pepo</i> en BCS .....	65
8.3.1	Las mosquitas blancas, vectores de begomovirus .....	65
8.3.2	Las chicharritas vectores de fitoplasmas .....	66
8.4	SLCuV y el fitoplasma del grupo 16SrIII en coinfección en el hospedero <i>Cucurbita pepo</i> 67	
8.4.1	<i>Squash leaf curl virus</i> (SLCuV), un begomovirus prevalente del Nuevo Mundo y migratorio del Viejo Mundo.....	67
8.4.2	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' del grupo 16SrIII tiene múltiples hospederos .....	68
8.5	SLCuV y ' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' asociados en la infección mixta .....	69
8.6	Estimación del daño y dispersión de la enfermedad mixta .....	70
8.7	Estatus fitosanitario de la enfermedad mixta .....	72
9.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	73
10.	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	75
11.	<b>ANEXOS</b> .....	89

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de transmisión persistente y propagativa de fitoplasmas en chicharritas. ....	8
<b>Figura 2.</b> Organización genómica de los begomovirus bipartitas. ....	10
<b>Figura 3.</b> Cuadrantes establecidos en área de cultivo y muestra de tejido. ....	22
<b>Figura 4.</b> Distribución de trampas amarillas para monitoreo de insectos. ....	23
<b>Figura 5.</b> Mapa de localización de las áreas de estudio. ....	31
<b>Figura 6.</b> Sintomatología observada en los campos de cultivo de <i>C. pepo</i> , asociada a begomovirus y fitoplasmas. ....	34
<b>Figura 7.</b> ADN total y detección de la RI de begomovirus. ....	35
<b>Figura 8.</b> Detección de SLCuV en <i>C. pepo</i> y <i>B. tabaci</i> . ....	36
<b>Figura 9.</b> Detección de fitoplasmas por MEB. ....	37
<b>Figura 10.</b> Detección de fitoplasmas por PCR primaria y anidada. ....	38
<b>Figura 11.</b> Detección de Genoma A y B de SLCuV, en producto de ACR. ....	39
<b>Figura 12.</b> Esquema circular de la caracterización del genoma de A y B de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]. ....	45
<b>Figura 13.</b> Análisis RFLP del fragmento de R16F2N. ....	46
<b>Figura 14.</b> La firma de fitoplasmas en secuencias de grupo 16SrIII. ....	47
<b>Figura 15.</b> Árbol filogenético de genoma A de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]. ....	48
<b>Figura 16.</b> Árbol filogenético del genoma B de SLCuV- [MX:BCS:La Paz:17]. ....	49
<b>Figura 17.</b> Árbol filogenético de ‘ <i>Ca. P. pruni</i> ’ con cepas de referencia de cada grupo 16Sr de fitoplasma y algunos subgrupos. ....	50
<b>Figura 18.</b> Confirmación del biotipo de <i>B. tabaci</i> . ....	51
<b>Figura 19.</b> Chicharritas presentes en cultivo de calabacita. ....	53
<b>Figura 20.</b> Síntomas observados de la escala de severidad. ....	56
<b>Figura 21.</b> Índice de severidad de la enfermedad del enrollamiento y amarillamiento de la hoja de calabaza, asociada a SLCuV y fitoplasmas del grupo III. ....	57

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b>	Escala de severidad de síntomas.....	30
<b>Tabla II.</b>	Porcentaje de identidad nucleotídica del genoma A de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]41	
<b>Tabla III.</b>	Porcentaje de incidencia de SLCuV en <i>C. pepo</i> .....	54
<b>Tabla IV.</b>	Porcentaje de Incidencia de 'Ca.' Phytoplasma grupo 16SrIII en calabacita.....	55
<b>Tabla V.</b>	Patometría de infección mixta SLCuV y fitoplasmas 16SrIII en <i>C. pepo</i> .....	58

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia agronómica de la calabacita (*Cucurbita pepo* L.)

La calabacita (*Cucurbita pepo* L.) pertenece a la familia *Cucurbitaceae* y constituye una de las principales hortalizas que se cultiva en todo el mundo; desde regiones templadas, hasta subtropicales y tropicales (Paris y Maynard, 2008). En América Latina y el Caribe, diferentes especies de *Cucurbita* se consumen como parte de la dieta diaria desde la época precolombina (Romay *et al.*, 2014), debido al importante valor nutricional que aportan el consumo de sus flores, frutos inmaduros y maduros, así como semillas. Por esta razón, *C. pepo* es la especie económicamente más importante de las cinco especies más cultivadas de este género (Brown y Myers, 2002).

Su producción mundial la encabeza China, con 7.1 millones de toneladas al año; mientras México, que ocupa el 7mo. sitio, aporta 2.2%, con 400,000 t. A nivel nacional, la calabacita se cultiva en 30 estados de la república; de los cuales, Sonora ocupa el primer lugar en producción anual, seguida de Puebla y Sinaloa con 94,776 t, 59,453 t y 45,058 t, respectivamente. En el caso de Baja California Sur, ésta se cultiva en 350 ha, con una producción aproximada de 7,940 t (SIAP, 2016).

## 1.2 Las enfermedades begomovirales y fitoplasmáticas como limitante en la producción de cultivos de importancia agrícola

Los begomovirus y los fitoplasmas son patógenos que ocasionan enfermedades devastadoras, mismas que afectan a un gran número de especies de plantas. Los primeros constituyen un riesgo significativo para cultivos de gran relevancia monetaria, causando pérdidas en el rendimiento que oscilan entre los 20 y 100% (Brown y Bird, 1992; Ferro *et al.*, 2017); los segundos, se han asociado a padecimientos en más de mil especies de plantas en todo el mundo, entre ellas más de 200 económicamente importantes (Bai *et al.*, 2006; Seemüller *et al.*, 2002).

Los cultivos de cucurbitáceas de diferentes regiones del mundo han sido afectados por diferentes especies del género *Begomovirus*, mismas que pueden ocasionar una

sintomatología similar. Por ejemplo, en la India se detectó el *Pumkin yellow vein mosaic virus* (PYVMV) en plantas de calabaza; las cuales, una vez afectadas, mostraron un amarillamiento en la vena que se une y forma parches cloróticos, además de que sus flores cayeron prematuramente reduciendo en gran medida la producción (Muniyappa *et al.*, 2003). Se ha reportado que este virus ocasiona pérdidas de 90% y la incidencia ha alcanzado hasta 100% (Maruthi *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009).

Entre 1997 y 2000, en Yemen se documentó que el *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) afectó cultivos de sandía (*Citrullus lanatus* T.) con un rango de incidencia de 90-100% (Bananej *et al.*, 2002). Años después se reportó en Palestina, donde ocasionó daños severos en sandía y pepino (*Cucumis sativus* L.), con una incidencia que osciló entre 25 y 98% (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014b).

En América Latina también se han registrado daños por begomovirus, como los ocasionados por el *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCV) en campos de cultivo de melón en el Valle de Zacapa, Guatemala, donde el rango de incidencia fluctuó entre 70 y 80%. En este caso, las hojas mostraban síntomas de clorosis y rizado, mientras que la fruta manifestó reducción de tamaño (Brown *et al.*, 2001). Tiempo después, el *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV) fue aislado en Venezuela, donde ha causado afectaciones y se ha documentado que es el principal limitante de la producción de melón y sandía (Romay *et al.*, 2015).

No obstante, uno de los begomovirus con más amplia distribución es el SLCuV. Originario de América, recientemente ha sido introducido al Viejo Mundo donde, en regiones como la de Jordania, ha ocasionado una incidencia de 95% en cultivos de calabaza (Al-Musa *et al.*, 2008).

En América del Norte se tienen registros del virus de la hoja arrugada de cucurbitáceas, *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCV), en zonas de Estados Unidos como Arizona y Texas; al igual que de México, como el caso de Coahuila, con afectaciones en hospederos de calabaza y diferentes variedades de melón (*Cucumis melo* L.) (Brown *et al.*, 2000). Otras plantas dañadas son el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Brown *et al.*, 2002).

En los años 70 en Sinaloa, México, se observó por primera vez la enfermedad begomoviral del chino del tomate, que fue recurrente durante el periodo comprendido entre 1976 y 1983, coincidiendo con una alta e inusual población de mosquita blanca. Posteriormente, Brown y Nelson (1988) determinaron que el agente causal de la enfermedad era el begomovirus *Chino del tomate virus* (CdTV). Recientemente, el WmCSV fue aislado de plantas sintomáticas de sandía en el estado de Sonora, México (Domínguez-Durán *et al.*, 2017), lo que representa un riesgo potencial para nuestra región, ya que en países del Medio Oriente se han reportado infecciones mixtas entre este virus y el *Squash leaf curl virus* (SLCuV) (Sufrin-Ringwald y Lapidot, 2011).

En este contexto, en Baja California Sur ya se ha documentado la presencia y afectación de begomovirus como el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010), *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), principalmente en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), dentro de áreas agrícolas comerciales (Holguín-Peña *et al.*, 2003, 2004).

En este punto es importante mencionar que los cultivos de diversas plantas, además de ser hospederos de patógenos virales, son afectados por otros microorganismos nocivos como son las bacterias. Esto es porque las especies que se desarrollan, ya sea en un ecosistema natural o agrícola, se encuentran en contacto continuo con diversos microorganismos; muchos de los cuales son patógenos de varias especies y pueden coexistir en una sola planta hospedera, dependiendo de la capacidad del patógeno para establecerse y coexistir. A este fenómeno se le conoce como “coinfección” o “infección múltiple” (Syller, 2016).

Doi *et al.* (1967) demostraron que los agentes etiológicos de muchas enfermedades de tipo amarillamiento podrían ser bacterias parecidas a micoplasmas y no virus, como antes se creía, por los síntomas y su mecanismo de transmisión vía insectos. Su nombre inicial, Organismos Similares a Micoplasmas (MLO, del inglés, Mycoplasma Like Organisms), se debió a que estos microorganismos eran similares a los micoplasmas en su morfología, ultraestructura y ausencia de pared celular (fitoplasmas). Desde entonces, se

han descrito fitoplasmas asociados a enfermedades en un amplio número de plantas en todo el mundo.

En Pakistán, se reportó que plantas de lentejas (*Lens culinaris* L.) son afectadas por fitoplasmas que pertenecen al grupo 16SrII subgrupo C. En este caso, los síntomas se caracterizan por la malformación de flores, clorosis, hojas pequeñas y proliferación extensa de las ramas (Akhtar *et al.*, 2016).

En Brasil, las áreas de cultivo de maíz (*Zea mays* L.) y coliflor (*Brassica oleracea* L.) se ven afectadas por fitoplasmas. En el primer caso por el grupo 16SrI subgrupo B, el cual ocasiona síntomas de enanismo y enrojecimiento de la hoja (Bedendo *et al.*, 2000); y, en el segundo, se reportó que fitoplasmas del grupo 16SrIII subgrupo J han causado señales de retraso en el crecimiento, malformación de la inflorescencia y enrojecimiento de las hojas con una incidencia superior al 25% (Rappussi *et al.*, 2012).

Por otra parte, en muchas áreas de cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) ubicadas en México, se manifiesta el síndrome de la punta morada, que reduce el rendimiento y la calidad. Un factor clave de éste, es la presencia de fitoplasmas y el inadecuado manejo de su insecto vector (Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2009).

En estudios recientes, el ‘*Candidatus* Phytoplasma hispanicum’ (16SrXIII-A) fue descubierto en plantas enfermas de teresita (*Catharanthus roseus* L.) ubicadas en Yucatán, México; las cuales mostraban presencia de amarillamiento foliar y virescencia (Davis *et al.*, 2016).

Con respecto a la península de Baja California, desde 2007 se han documentado enfermedades relacionadas con fitoplasmas, por ejemplo en San Quintín, donde se observó que las plantas de tomate (*L. esculentum*) tenían clorosis general, grave retraso en el crecimiento, hojas pequeñas y excesiva formación de brotes axilares. Entonces se determinó que los fitoplasmas asociados a la enfermedad pertenecen al grupo 16SrI subgrupo B (Holguín-Peña *et al.*, 2007).



Durante ese mismo año, mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, Lebsky y Poghosyan (2007) reportaron en Baja California Sur la presencia de fitoplasmas en el tejido del floema de plantas de chile (*C. annuum*) y tomate (*L. esculentum*), con un tamaño de entre 400 y 2000 nm.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta ahora, no se conocen métodos efectivos de control para enfermedades causadas por fitoplasmas; sólo en cultivos de alta importancia económica como la vid o frutales perennes, se realizan programas de monitoreo y detección temprana a partir de aspectos epidemiológicos (Perrilla, 2013).

### **1.3 Begomovirus y fitoplasmas: agentes patógenos transmitidos por insectos vectores**

Los vectores juegan un papel importante en la dispersión de las enfermedades ocasionadas por begomovirus y fitoplasmas. Se sabe que la distribución global de los primeros está directamente relacionada con el insecto vector polífago y cosmopolita, mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), cuyo mecanismo de transmisión es de tipo circulativo. Esto implica la adquisición del virus, el cual pasa vía pared del tracto digestivo hasta la hemolinfa, y la posterior inoculación del mismo a la planta, en la que es necesario el paso del microorganismo de la hemolinfa a las glándulas salivales (Liu *et al.*, 1997; Palmer y Rybicki, 1998).

Se estima que la especie de mosca blanca es capaz de afectar a más de 900 plantas entre cultivadas y silvestres. Se ha catalogado con una invasividad de hasta 200 km de radio (Berry *et al.*, 2004; Deying *et al.*, 2006) y clasificado como una de las plagas más destructivas de cultivos en el planeta (Oliveira *et al.*, 2001). Su interacción con el virus inicia cuando el insecto lo adquiere de una planta infectada. Si el microorganismo infeccioso es capaz de persistir el tiempo suficiente, puede ser transportado a un nuevo hospedero y transmitido en la célula (Whitfield y Rotenberg, 2015).

Estos vectores son esenciales para los begomovirus porque rompen la pared celular y los depositan directamente en el citosol. Dada su preocupación como plaga agrícola mundial, las poblaciones de mosca blanca son monitoreadas continuamente en diferentes

lugares y cultivos mediante el uso de cebadores dirigidos al gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (mtCOI), como los diseñados por Shatters *et al.* (2009).

Las subunidades del gen de la citocromo oxidasa o regiones espaciadoras internas de los genes ribosómicos han sido utilizadas para la identificación de especies de insectos de forma confiable (Srinivasan *et al.*, 2013). Mediante el análisis de las secuencias de este gen, se ha logrado establecer que *B. tabaci* es un complejo de 11 grupos bien definidos, compuestos de 24 especies morfológicamente indistinguibles (De Barro *et al.*, 2011). Han sido definidos por marcadores de ADN que difieren genéticamente, así como la gama de hospederos, la resistencia a insecticidas y la capacidad para transmitir virus a las plantas (Brown, 2000).

Los biotipos B y Q se reportan como los más predominantes y perjudiciales; el primero definido por parámetros de alta aptitud, y el segundo por ser mayormente eficiente en la transmisión de begomovirus (Sánchez-Campos *et al.*, 1999).

En begomovirus monopartitas como TYLCV y bipartitas como SLCuV y WmCSV, son adquiridos y transmitidos de manera horizontal por *B. tabaci* biotipo B; sin embargo, no se ha transmitido del biotipo B al biotipo Q (Ghanim *et al.*, 2007). En TYLCV también se ha documentado la transmisión transovárica en dos generaciones (Ghanim *et al.*, 1998).

De acuerdo con Rosell *et al.* (1999) en el análisis de la transmisión del SLCV, el virus pasa al hemocele y a las glándulas salivales mediante el canal alimenticio, aunque el paso por esta vía reduce la cantidad, revelando que parte del inóculo se pierde con las excretas del anfitrión. Cuando el insecto se alimenta, en aproximadamente dos horas el virus pasa del intestino a la hemolinfa, con un periodo mínimo de latencia de 6 a 8 horas.

Por otra parte, Bosco *et al.* (2009) señalan que la transmisión de fitoplasmas por insectos vectores es la forma más importante para condiciones naturales, que implica necesariamente la especificidad del patógeno con el hospedero.

Hasta ahora los insectos vectores conocidos de fitoplasmas se limitan a chicharritas y psílicos (*Cicadellidae*, superfamilias *Cicadelloidea*, *Fulgoroidea* y *Psyllidea*)

(Weintraub y Beanland, 2006). Pero, debido a la capacidad de alimentarse (monófago, oligófago o polífago) y de reproducirse (en una, pocas o muchas plantas), el problema puede agravarse. Similar ocurre con los fitoplasmas que pueden ser generalistas o especialistas (infectando varias especies de plantas, algunas o una), y ser transmitidos por uno o varios insectos vectores (Bosco *et al.*, 2009).

Para tal efecto, el insecto vector introduce su aparato bucal chupador en el tejido vegetal (Fig. 1) y vierte enzimas digestivas en las células cribosas del floema, de donde absorbe los nutrientes junto con los fitoplasmas que ahí se encuentran (Ammar y Hogenhout, 2006). Después transcurre un periodo de latencia que puede ir de los 12 días, hasta los meses, dependiendo de la especie de insecto, de la cepa de fitoplasma y de factores abióticos como las temperaturas (Marzachi *et al.*, 2004). Durante esta fase, el vector aún no transmite al fitoplasma; para que el vector sea infeccioso, dicho fitoplasma debe pasar por el intestino medio, a la membrana basal que entra en el hemocel, para moverse a través de la hemolinfa e infectar diferentes órganos del hospedero y llegar a las glándulas salivales que le permitirán la transmisión (Weintraub y Beanland, 2006).

Finalmente, para que la transmisión tenga éxito, el genoma de los fitoplasmas codifica genes de síntesis de folato, que les permite adaptarse a diferentes ambientes de plantas e insectos en los que habitan (Oshima *et al.*, 2004), logrando alterar su expresión génica en respuesta a la conmutación del anfitrión entre planta e insecto (aproximadamente 33% de los genes cambia de acuerdo al hospedero) (Oshima *et al.*, 2011).

Estos patógenos pueden infectar también los órganos reproductivos del vector, ocasionando una transmisión transovárica (Bressan *et al.*, 2005). Con ello logran tener un efecto negativo en la aptitud del vector o un efecto positivo cuando hay un aumento de la fecundidad y longevidad (Beanland *et al.*, 2000). En consecuencia, los insectos infectados permanecen así el resto de su vida (Bosco y Tedeschi, 2013).

Ante este problema, durante los últimos años se ha incrementado la importancia de su monitoreo y control, debido a su papel como vectores de virus y fitoplasmas. En algunas regiones del norte y centro de México, se ha confirmado la presencia de 10 géneros durante

la temporada invernal: *Aceratagallia* spp., *Agallia* spp., *Circulifer tenellus* Baker, *Dalbulus* spp., *Draeculacephala* spp., *Empoasca* spp., *Hordnia* spp., *Graminella* spp., *Scaphytopius* spp. y *Texananus* spp.; siendo el género *Agallia* el de mayor cantidad de individuos (Velásquez-Valle *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Mecanismo de transmisión persistente y propagativa de fitoplasmas en chicharritas. Tomado de Reveles-Torres *et al.* (2014).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Características del SLCuV y la enfermedad que causa en calabaza

El virus del enrollamiento de la hoja de calabazas, *Squash leaf curl virus* SLCuV, fue inicialmente reportado como la enfermedad del enrollamiento de la hoja de calabaza (SLCD, squash leaf curl disease, por sus siglas en inglés). Se observó por primera vez en cultivos de calabaza y otras cucurbitáceas en Arizona, California, y norte de México, en el periodo comprendido entre 1977 y 1978, con síntomas como enrollamiento de la hoja hacia arriba, enanismo, engrosamiento de las venas y alta mortalidad (Flock y Mayhew, 1981).

Posteriormente, en Imperial Valley, Cohen *et al.* (1983) demostraron que el enrollamiento de la hoja de calabaza era ocasionado por un geminivirus, el SLCuV, que se presenta en monómeros con un tamaño de 22 nm, en dímeros de 22x38 nm y en trímeros.

Determinaron también que el insecto vector es la mosca blanca y que lo transmite por un mecanismo circulativo. Desde entonces se sabe que la mayoría de sus hospederos pertenecen a la familia *Cucurbitaceae*.

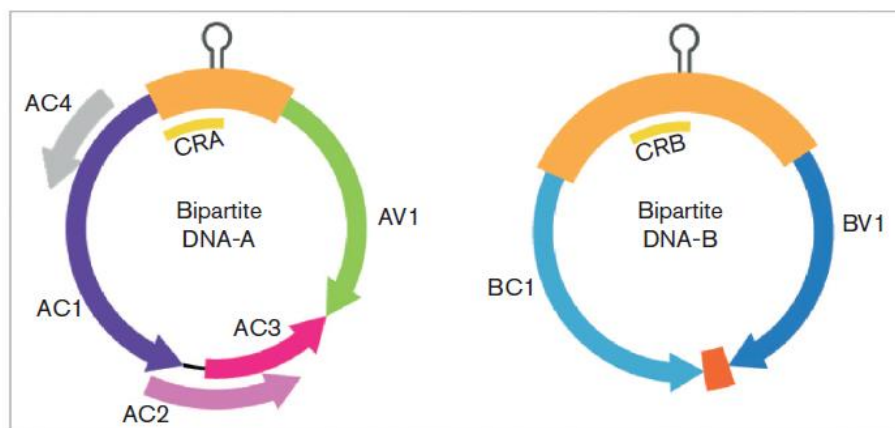
En ese mismo año, Dodds *et al.* (1984) documentaron que la eficiencia de transmisión del virus con mosca blanca es de 100% y que también se puede transferir por inoculación mecánica, aunque con baja eficiencia. Tiempo después, el biotipo A del complejo de *B. tabaci*, originaria del suroeste del desierto de USA y Sonora, fue el vector asociado a esta enfermedad; la cual, con la posterior introducción del biotipo B, se hizo prevalente entre 1987 y 1988, aproximadamente (Costa *et al.*, 1991). Esta afección perjudicó seriamente los cultivos de cucurbitáceas en el sureste de Estados Unidos (Brown, 2007).

La caracterización molecular y biológica del SLCuV fue realizado con aislados recolectados en cultivos de calabaza (Lazarowitz, 1991; Lazarowitz y Lazdins, 1991). Se trata de un begomovirus bipartita (Fig. 2) cuyo genoma tiene una región intergénica en la que se encuentra una secuencia nanonucleotídica invariable TAATATT(↓)AC, conservada para todos los miembros de la familia a la que pertenece *Geminiviridae*; con dos moléculas de ADN monocatenario circular, denominado ADN-A y ADN-B, que poseen un tamaño de 2.5 a 3 kb. En ambos genomas hay unidades de transcripción divergentes. Los genes están separados por una región intergénica (RI) de aproximadamente 300 bases, y en ésta se localiza la región común (RC), que contiene una secuencia de 200 nucleótidos, conservada en los dos componentes virales. En un segmento de 30 nt, esta región puede formar una estructura en horquilla rica en G y C en el tallo, y una secuencia conservada rica en A y T en el asa, que contiene los elementos modulares del origen de replicación ORI.

Por otro lado, el ADN-A (Fig. 2) contiene un marco de lectura abierto (ORF, open reading frame, por sus siglas en inglés) en la cadena viral AV1, que codifica la proteína de la cápside CP y cuatro ORF's en la cadena complementaria: AC1 codifica la proteína Rep; AC2 codifica la proteína TrAP, un activador de transcripción; AC3 codifica la proteína REn (Replicación Enhancer), potenciadora de replicación; y AC4, ubicada dentro de AC1

con un marco de lectura diferente, que codifica una proteína determinante de la patogenicidad (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Lazarowitz, 1991).

Las proteínas codificadas en el genoma A son esenciales para la replicación del virus (Rep) y el encapsulamiento del material genético, para su posterior movimiento. El ADN-B (Fig. 2) contiene dos ORF's. En la cadena viral, el gen BV1 codifica la proteína lanzadera nuclear (NSP, del inglés nuclear shuttle protein), que controla el transporte viral entre el núcleo y el citoplasma y viceversa. La cadena complementaria BC1 codifica la proteína del movimiento (MP, Movement Protein), responsable del movimiento del virus de célula a célula, capaz de alterar el límite de exclusión de los plasmodesmos (Lazarowitz y Breachy, 1999).



**Figura 2.** Organización genómica de los begomovirus bipartitas. Las posiciones y direcciones de los ORF's se indican con las flechas en ADN-A y el ADN-B. Tomado de Zerbini *et al.* (2017).

En años recientes, las afectaciones del SLCuV han sido reportadas en diferentes regiones del mundo, como Estados Unidos, México, Latinoamérica, en varios países del Medio Oriente, India, Taiwán y China.

Lapidot *et al.* (2014) documentaron que desde el año 2000, los begomovirus SLCuV y el WmCSV, que afectan cucurbitáceas, fueron introducidos en la Cuenca Mediterránea Oriental; y que desde entonces han estado apareciendo e incrementándose, sobre todo en los últimos años, en Egipto, Jordania, Líbano, Palestina e Israel. En este

último, se observó SLCuV por primera vez en 2002, convirtiéndose ya en epidemia para 2003 (Antignus *et al.*, 2003). Mientras tanto, en Egipto, se aisló por primera vez de plantas de calabaza en 2004 (Farang *et al.*, 2005).

Por su parte, Abudy *et al.* (2010) realizaron la caracterización biológica de aislados de SLCuV obtenidos de países como Israel, Yemen, Sudan e Irán. En el estudio obtuvieron resultados similares a los de Lazorowitz (1991) y documentaron un amplio rango de hospederos, como: *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata* D., *Cucurbita* spp., *Cucurbita maxima* H., *Cucurbita argyrosperma* H., *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis* L., *Ecballium elaterium* L., *Momordica charantia* L., *Nicotiana benthamiana* D., *Nicotiana Glutinosa* L., *Nicotiana Tabacum* L., *Datura stramonium* L., *Chenopodium quinoa* W. y *Phaseolus vulgaris* L. No obstante, sus hospederos estuvieron delimitados principalmente en seis familias: *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* y *Brassicaceae* (Abudy *et al.*, 2010; Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Anfoka *et al.*, 2017; Farrag *et al.*, 2014a; Singh *et al.*, 2008).

## **2.2 Características de los fitoplasmas y distribución de las enfermedades que causan en calabaza**

Los fitoplasmas pertenecen a un grupo monofilético en la clase *Mollicutes* (del latín *mollis*, que significa suave; y *cutes*, que es piel). Son capaces de colonizar y multiplicarse tanto en organismos de insectos como en el floema de plantas. Están asociados a cientos de enfermedades que causan alteraciones morfológicas y fisiológicas en plantas ornamentales, hortícolas, maderables, frutales y cultivos en todo el mundo (Bai *et al.*, 2006; Perrilla, 2013). Tienen el genoma más pequeño entre los organismos autoduplicados, que consiste en ADN de doble cadena, de cromosoma circular, estimado en un rango de entre 0.53 y 1.35 Mb, con bajo contenido de G + C (entre 21.4 y 33%) y ADN extra-cromosomal plasmídico, con un tamaño de 1.7-7.4 kb (Bertaccini *et al.*, 2014; Kube *et al.*, 2008).

Se considera que como resultado y consecuencia de su parasitismo en el floema, un medio rico en nutrientes, el genoma de los fitoplasmas ha sufrido una evolución reductiva, perdiendo muchos genes relacionados con su metabolismo al carecer de subunidades

esenciales para la vida, como la pentosa fosfato y la ATP-sintetasa; es probable que asimile la mayoría de los metabolitos desde la célula hospedera (Bové, 1997; Oshima *et al.*, 2004). A pesar de ello, mantiene los genes para las funciones básicas, como replicación de ADN, transcripción, traducción y traslocación de proteínas (Kakizawa *et al.*, 2001).

Mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), se ha observado que los fitoplasmas son pleomórficos, con un tamaño promedio de entre 100 y 1000 nm. De igual forma, se ha visualizado su ultraestructura: su membrana plasmática, citoplasma, granos de ribosoma, filamentos de ADN, así como su modo de dividirse y su interacción con la célula vegetal. Su morfología les permite pasar por los tubos cribosos del floema y los plasmodesmos en el sistema vascular de las plantas y así generar la infección sistémica (Maramorosch *et al.*, 1970).

También, diferentes estudios han demostrado que los fitoplasmas inhiben el transporte de carbohidratos por el floema de las plantas infectadas, lo que conduce a la acumulación de una cantidad anormal de carbohidratos en las hojas maduras y marcada reducción en hojas jóvenes y raíces (Catlin *et al.*, 1975). Sin embargo, el mecanismo por el cual los fitoplasmas inducen enfermedad en las plantas, no ha sido dilucidado.

Para la detección e identificación molecular de fitoplasmas se utilizan cebadores universales y de grupo determinado, de la región específica del gen 16S rRNA, o de la región intergénica 16S-23S ribosomal, utilizando ADN genómico de plantas infectadas o de insectos vectores (Lee *et al.*, 2000).

En 2004, el grupo de trabajo IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy del Programa de Investigación Internacional para Micoplasmología Comparativa (IRPCM, del inglés International Research Programme for Comparative Mycoplasmatology) propuso establecer para los fitoplasmas un nuevo género: ‘*Candidatus (Ca) Phytoplasma*’, que tiene una secuencia de firma única del gen 16S rRNA ‘CAAGAYBATKATGKTKTAGCYGGDCT’, identificada en GenBank con el número M3079 (IRPCM, 2004; Firrao *et al.*, 2004).



Debido a que en las últimas décadas el número de grupos de fitoplasma ha aumentado drásticamente, Zhao y Davis (2016) confirmaron los criterios para nuevos grupos y subgrupos; los cuales se encuentran basados en el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés restriction fragment length polymorphism) de amplicones de PCR, de la secuencia R16F2N, del 16S ARNr; comparando 17 endonucleasas de restricción y la obtención del coeficiente de similitud.

La herramienta bioinformática iPhyClassifier (Zhao *et al.*, 2009) ha permitido el análisis con mayor confiabilidad, teniendo en la actualidad 42 *Candidatus* (*Ca*) Phytoplasma reportados; como el *Ca. Phytoplasma pruni*, ubicado dentro del grupo 16SrIII, que se reportó por primera vez en USA como la enfermedad X del melocotón (Stoddard *et al.*, 1951). Aunque hasta los años 70 fue atribuido a fitoplasmas mediante la técnica de microscopía electrónica (Nasu *et al.*, 1970) y su reconocimiento como grupo llegó hasta 1992 (Lee *et al.*, 1992).

Las afectaciones por fitoplasmas a plantas del género *Cucurbita* han sido reportadas en diferentes regiones del mundo, como en el caso de Queensland, Australia, donde Stretten *et al.* (2005) reportaron que en campos de producción de calabaza (*C. maxima* y *C. moschata*), las plantas presentaron síntomas de la enfermedad de la hoja amarilla. Asimismo, detectaron e identificaron que el fitoplasma asociado a la enfermedad, es el '*Candidatus* Phytoplasma australiense', perteneciente al grupo 16SrI.

Por otra parte, en Egipto se reveló que los campos de cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.), tomate (*L. esculentum*) y calabaza (*C. pepo*) fueron aquejados por fitoplasmas que pertenecen al grupo 16SrII subgrupo D. Se observó una distribución generalizada en los 20 campos de calabaza, 20 de berenjena y en los 40 campos de tomate estudiados, con un índice de incidencia de 1 a 5%. Los análisis indicaron que el fitoplasma estuvo presente en todos los campos de cultivo (Omar y Foissac, 2012).

En una provincia de Irán, Salehi *et al.* (2015) realizaron investigaciones en plantas de pepino y calabaza que exteriorizaban síntomas de filodia, identificando que éstas eran afectadas por fitoplasmas que pertenecen al grupo 16SrII; mismo grupo que fue reconocido

en el insecto vector *Orosius albicinctus* D. Con este vector lograron inocular positivamente a plantas de pepino (*Cucumis sativus*), calabaza (*Cucurbita pepo*), alfalfa (*Medicago sativa* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), sésamo (*Sesamum indicum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), caléndula (*Calendula* L.), berenjena (*Solanum melongena*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y perejil (*Petroselinum crispum* L.). Estos investigadores concluyeron que los fitoplasmas que ocasionan filodia en calabaza y pepino pertenecen a subgrupos diferentes; en el primer caso corresponde al 16SrII subgrupo D, mientras que en el segundo, a 16SrII subgrupo M.

Recientemente en la India, Rao *et al.* (2017) reportaron que la enfermedad de escoba de brujas, observada en el 7% de las plantas de *C. pepo* de un campo experimental, está asociada a fitoplasmas del grupo 16SrI-B ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’.

Del mismo modo, en diversas regiones de Latinoamérica se han detectado e identificado fitoplasmas en cultivos de calabaza. En Brasil, Montano *et al.* (2007) señalaron que los fitoplasmas del grupo 16SrIII están asociados con la enfermedad denominada escoba de brujas en plantas de esponja vegetal o calabaza esponja (*Luffa cylindrica* L.), miembros de la familia de las cucurbitáceas. Otros síntomas que observaron fueron: amarillamiento, retraso generalizado de crecimiento, malformación de frutos y semillas abortadas.

Previamente, también Montano *et al.* (2000) encontraron que este mismo grupo de fitoplasmas causaron afectaciones en plantas de chayote (*S. edule*), otro miembro de las cucurbitáceas, con síntomas característicos de la enfermedad de escoba de brujas. Sin embargo, se determinó que el fitoplasma asociado era del grupo 16SrIII subgrupo J.

También en Sao Paulo, Brasil, Melo *et al.* (2009) documentaron que en un campo de cultivo comercial de *C. pepo*, las plantas eran afectadas por fitoplasmas que pertenecen al grupo 16SrIII, exhibiendo problemas de deformación de hoja y escoba de brujas.

Como se observa hasta el momento, los grupos de fitoplasmas que utilizan como hospedero la calabaza son el 16SrI, 16SrII y 16SrIII; los cuales ocasionan síntomas

específicos que complican la detección visual del agente patogénico, esto sin incluir a los hospederos que son asintomáticos.

En cuanto a nuestro país, en años recientes se detectó en el estado de Tlaxcala, la ocurrencia de una enfermedad asociada a fitoplasmas que pertenecen al grupo 16SrIII en plantas de amaranto, con síntomas de escoba de brujas (Rojas-Martínez *et al.*, 2009).

Otras afectaciones reportadas están asociadas a fitoplasmas, como las ocasionadas por los grupos 16SrI y 16SrII en plantas de papa (Leyba *et al.*, 2002). A su vez, en cultivos importantes de chile y tomate ubicados en los estados de Sinaloa y Guanajuato, se identificó que el fitoplasma '*Candidatus* Phytoplasma asteris', grupo 16SrI, está relacionado con síntomas de enfermedad como escoba de brujas, proliferación de brotes y hojas pequeñas (Santos-Cervantes *et al.*, 2008).

En la Península de Baja California, se han reportado las afectaciones asociadas a fitoplasmas del grupo 16SrI subgrupo B en cultivos de tomate y chile (Holguín-Peña *et al.*, 2007; Lebsky y Poghosyan, 2007). Con todo, no se encontraron reportes en México (incluida la Península de Baja California) de fitoplasmas asociados a plantas de *C. pepo*; a pesar de que el cultivo de calabaza se realiza de manera frecuente en la región y que es hospedero de determinados grupos de fitoplasmas, lo que abre la posibilidad de que sea infectado por dichos patógenos.

### **2.3 Sintomatología ocasionada por SLCuV en sus hospederos**

La sintomatología que presentan las plantas afectadas por el SLCuV fue documentada inicialmente por Flock y Mayhew (1981) en cultivos de calabaza y otras cucurbitáceas, como enfermedad del enrollamiento de la hoja de calabaza, con síntomas característicos del enrollamiento de la hoja hacia arriba, enanismo, engrosamiento de las venas y alta mortalidad.

Otros autores reportan que las plantas de calabaza infectadas con SLCuV muestran síntomas como enrollamiento de la hoja, amarillamiento, moteado, retraso en el crecimiento y reducción de la fruta (El-DougDoug *et al.*, 2009; Idris *et al.*, 2006).

Por su parte, Farrag *et al.* (2014a) revelaron que el virus del enrollamiento de la hoja de calabaza pudo transmitirse a 16, de 22 especies probadas. Los síntomas observados en plantas de diferentes especies que han sido inoculadas con SLCuV, difieren con respecto al hospedero: en *C. quinoa* causó moteado y retraso del crecimiento; en *C. sativus* cv. Beitalpha, *C. lanatus* cv. Giza1 y *C. pepo* cv. Eskandarany provocó mosaico y enrollamiento de las hojas; en cultivos de *P. vulgaris*, mosaico y rizado de la hoja hacia abajo, excepto el cv. Top Crop, que mostró severa ondulación de la hoja hacia arriba, distorsión de la vena y retraso en el crecimiento; y en hojas jóvenes de caupi *Vigna unguiculata* L. se observaron malformación de hojas, mosaico y enrollamiento de la hoja.

Las cepas de SLCuV aisladas de 23 cultivos de cucurbitáceas (calabaza, pepino y melón) en los ciclos de 2008 y 2009 en Palestina, ocasionaron síntomas como: encrespado, ampollamiento, amarillamiento, hojas moteadas y pequeños frutos deformes. En cuanto a los rangos de incidencia, éstos oscilaron entre 24 y 100% (Ali-Shtayeh *et al.*, 2010). Es importante mencionar que en la caracterización de este virus, se ha observado que las proteínas del movimiento codificadas en el componente B son importantes para determinar el rango de hospederos y la sintomatología; por lo que la expresión de síntomas depende del hospedero, estado de desarrollo y condiciones favorables (Igham *et al.*, 1995).

#### **2.4 Sintomatología ocasionada por fitoplasmas en sus hospederos**

Los fitoplasmas son reconocidos como causantes de alteraciones florales y vegetativas en plantas vasculares, que habitan en el interior de las células del floema e interfieren con el metabolismo de hormonas vegetales ocasionando extremas malformaciones (Lee *et al.*, 2000). Pese a ello, los síntomas de las enfermedades asociadas a fitoplasmas varían dependiendo del hospedero, la cepa de fitoplasma y los factores ambientales. Los más comunes o relacionados con estos patógenos son: clorosis, color purpura en las hojas y brotes, alta proliferación de brotes axilares, retraso de crecimiento, declinamiento general, esterilidad de flores, elongación anormal de entrenudos, amarillamiento, virescencia (enverdecimiento de pétalos), filodia (transformación de los órganos florales en estructuras foliares) y, en algunos casos, la muerte de la planta (Bertaccini *et al.*, 2014; Dickinson *et al.*, 2013).

Las plantas de maíz infectadas por fitoplasmas clasificados en el grupo 16SrI subgrupo B han mostrado enrojecimiento de la hoja y enanismo (Bedendo *et al.*, 2000); similar a lo observado en cultivos de coliflor afectados por fitoplasmas del grupo 16SrIII subgrupo J, donde se presentó retraso en el crecimiento, malformación de la inflorescencia y enrojecimiento de las hojas (Rappussi *et al.*, 2012).

En plantas de lentejas afectadas por fitoplasmas que pertenecen al grupo 16Sr II subgrupo C, se registró la malformación de flores, clorosis, hojas pequeñas y proliferación extensa de las ramas (Akhtar *et al.*, 2016). Por otra parte, Montano *et al.* (2007) reportaron que fitoplasmas del grupo 16SrIII infecta plantas de esponja vegetal (*L. cylindrica*), en las que se describieron síntomas como amarillamiento, retraso generalizado de crecimiento, malformación de frutos, semillas abortadas y escoba de brujas.

### **2.5 Las coinfecciones en los sistemas agroecológicos; una consecuencia de la interacción de dos o más patógenos en un hospedero**

En la naturaleza, las plantas que están infectadas por dos o más patógenos al mismo tiempo son frecuentes, y las interacciones entre los agentes nocivos pueden ser sinérgicos o antagónicos, ocasionando epidemias y consecuencias impredecibles. Por lo tanto, una coinfección es ocasionada por dos o más fitopatógenos en un mismo hospedero (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Reveles-Torres *et al.*, 2012).

Hasta ahora la gran diversidad de fitopatógenos que se han registrado en los últimos años ha provocado una alta incidencia de coinfecciones (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010); las cuales tienen un impacto en la dinámica de la enfermedad y la evolución del microorganismo patógeno, como lo son las interacciones virus-virus.

En 2002, Brown *et al.* asentaron que pares heterólogos de los componentes del *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV) ADN-A y B para SLCV y *Squash mild leaf curl virus* (SMLCV) producen recombinaciones viables, en ocasiones más virulentos que los ascendientes. Es por ello que la alta frecuencia de infecciones mixtas de begomovirus en diferentes hospederos permite la aparición de nuevos virus derivados de la recombinación entre las especies (Marwal *et al.*, 2012).

Para 2013, Anaya-López *et al.* evaluaron la resistencia de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante una coinfección con los virus del mosaico dorado del chile PepGMV y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV). La resistencia obtenida fue clasificada como retraso de síntomas, remisión de síntomas y plantas asintomáticas. Con ello determinaron que los niveles de ADN viral y la severidad de los problemas observados en las plantas están positivamente correlacionados.

Asimismo, Rentería-Canett *et al.* (2011) hicieron ensayos en plantas de chile (*C. annuum* var.) Sonora Anaheim para determinar el tipo de interacción entre dos begomovirus; concluyendo que PepGMV y PHYVV, en infección mixta, causan síntomas más severos, que en una infección simple, donde se observa disminución de los niveles de ADN viral. Así, en plantas co-infectadas, las concentraciones de ADN viral incrementaron significativamente, mostrando una interacción sinérgica entre los virus, donde el ADN-A de PepGMV fue componente clave en esta interacción.

En fitoplasmas, las infecciones mixtas también han sido documentadas. Por ejemplo, en regiones de Rusia, plantas de trébol (*Trifolium* L.) y alfalfa (*M. sativa*) que presentaban señales características de fitoplasmas fueron analizadas. De 161 muestras, 103 resultaron positivas. Estos patógenos se ubicaron en diferentes grupos: el 31.1%, en 16srI (la mayoría subgrupo C), agente causal del síntoma de filofia; y 47.6% en 16SrIII (en su mayoría del subgrupo B). Otros grupos encontrados fueron 16SrVI-A, 16SrXII-A (asociado a escoba de brujas) y el 2.9% de las muestra presentó coinfecciones entre los fitoplasmas de los grupos 16SrIII-B y 16srI-C (Girsova *et al.*, 2017).

En México los cultivos de papa han sido severamente afectados por enfermedades asociadas a fitoplasmas, con problemas como el síndrome de la punta morada y afectaciones en los brotes y tubérculos en germinación; en ambos casos la producción se redujo, al afectar la viabilidad de los tubérculos utilizados como semillas. Al respecto Leyva-López *et al.* (2002) y Santos-Cervantes *et al.* (2010) llevaron a cabo análisis de RFLP, los cuales indicaron que los primeros síntomas se asocian a fitoplasmas que pertenecen al grupo 16SrI; mientras que las complicaciones en los brotes y en los tubérculos en germinación, son ocasionadas por el fitoplasma que pertenece al grupo

16SrII. En análisis posteriores, se identificó la presencia del grupo 16SrXIII-D en las mismas muestras. Las conclusiones señalan que estos fitoplasmas coexisten en la misma planta de papa, es decir, ocasionan una infección mixta.

Las coinfecciones entre begomovirus y fitoplasmas ya han sido reportadas en diferentes estudios. En un sistema de cultivo de tomate, Swarnalatha y Reddy (2014) observaron que las plantas presentaban síntomas asociados con el fitoplasma denominado big bud (gran brote), así como otros asociados con la enfermedad del enrollamiento de la hoja de tomate (TLCD); registrando un porcentaje de incidencia que osciló entre 27.5 y 74.3%, con una incidencia de afectación por fitoplasma de entre 5.7 y 13.9%. Sin embargo, la coinfección fue de 1.2-7.2%. Al emplear la técnica de PCR dúplex para la detección simultánea de begomovirus y fitoplasmas, evidenciaron que la ToLCD es ocasionada por el begomovirus *Tomato leaf curl Nueva Delhi virus* (ToLCNDV) y el big bud, por el ‘*Ca. Phytoplasma Australasia*’ del grupo 16SrII.

Por su parte, Kumar *et al.* (2014) realizaron el análisis de plantas de soya y dos especies de malezas: *Digitaria sanguinalis* (pasto) y *Parthenium hysterophorus* L. (herbácea), mismas que evidenciaron hojas pequeñas, clorosis, mosaico y escoba de brujas. Su estudio indicó la presencia de begomovirus y fitoplasmas, identificados como el virus del mosaico amarillo del frijol mungo de la India (MYMIV, en inglés *Mungbean yellow mosaic India virus*), y el ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’. También se determinó como vector putativo de fitoplasmas a la chicharrita *Empoasca motti* P. y como vector del virus, la mosquita blanca *B. tabaci*.

En estudios efectuados en Baja California Sur, se ha reportado la coexistencia de fitoplasmas con virus, como la coinfección de fitoplasmas con dos virus, el *Papaya mosaic virus* (PapMV) y *Papaya ring spot virus* (PRSV), procedentes de Veracruz e Irapuato (Lebsky *et al.*, 2010). Asimismo, infecciones mixtas entre fitoplasmas y dos begomovirus en plantas de tomate y chile: en las primeras, los síntomas fueron más severos y se determinó que eran ocasionados por fitoplasmas, TYLCV y PepGMV; y en las segundas, se documentó la infección mixta entre fitoplasmas del grupo 16SrIII (X-disease), con TYLCV y ToChLPV (Lebsky *et al.*, 2011). Ante estas evidencias, es probable que la

coinfección de *Cucurbita pepo* con los agentes patógenos fitoplasma y el virus SLCuV, esté presente en la región.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La complejidad de las infecciones mixtas asociadas a dos o más patógenos en el cultivo de calabacita no ha sido estudiada, por lo que es importante identificar y caracterizar los agentes causales asociados a este tipo de enfermedades, así como identificar los vectores relacionados con la dispersión y epidemiología de la enfermedad.

### **4. HIPÓTESIS**

Si están coexistiendo dos patógenos de diferente taxón (begomovirus y fitoplasmas) en un mismo hospedero y se asocian con altas poblaciones infectivas de sus respectivos vectores, entonces se presentará una enfermedad mixta con altos índices de daño.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

Identificar y caracterizar los agentes causales que ocasionan una enfermedad mixta en *C. pepo* en tres áreas, dentro de dos ciclos de cultivo.

#### **5.2 Objetivos específicos**

Objetivo 1. Identificar, caracterizar y realizar estudios filogenéticos de los agentes causales de la enfermedad mixta en *C. pepo*.

Objetivo 2. Identificar los vectores que transmiten los agentes de la infección mixta en *C. pepo*.

Objetivo 3. Realizar estudios patométricos de infección mixta en *C. pepo*.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Estudio de campo

La investigación se llevó a cabo en campos de cultivo comerciales de calabacita (*C. pepo*) establecidos a campo abierto en el estado de Baja California Sur: Los Planes (Rancho El Gordo), El Carrizal (Agrícola Ángel del Norte) y El Pescadero (Rancho La Mesa), en las coordenadas geográficas 23°55'58.82"N, 109°54'33.82"O, 23°48'1.86" N, 110°17'39.50" O y 23°23'40.08" N, 110°10'29.93"O, respectivamente. La recolección de datos y muestras biológicas se realizaron en los dos ciclos de cultivo de 2016 (primavera-verano y otoño-inverno).

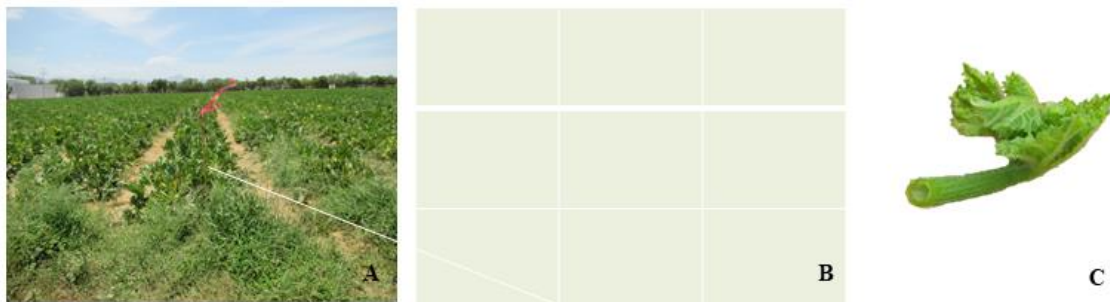
El estudio se realizó por muestreo dirigido, en campos agrícolas en los que se observó la sintomatología reportada que está asociada a ambos patógenos. Por lo tanto, los criterios de selección se basaron en la detección de síntomas como: amarillamiento, retraso generalizado del crecimiento, deformación de la hoja, hojas pequeñas, esterilidad de flores y malformación de frutos.

#### 6.1.1 Muestreo aleatorio simple y recolección de muestras

Para los estudios de patometría, se realizó muestreo aleatorio simple, donde cada una de las áreas de cultivo estudiadas se dividió en nueve cuadrantes para un análisis detallado y se registraron los datos de 45 plantas (Anexo A); cinco al azar en cada cuadrante, considerando la presencia o ausencia de sintomatología y la escala de severidad (Tabla I). Las áreas estudiadas fueron divididas en nueve cuadrantes, para lo cual se colocaron estacas de madera, con cinta topográfica atada en el extremo superior (Fig. 3A) para que al ser movida por el viento, se pudiera observar a la distancia y asegurar la permanencia dentro del cuadrante (Fig. 3B) al momento de obtener las muestras.

Se recolectaron cinco muestras en cada cuadrante para un total de 45 por área, en cada ciclo de cultivo de los dos analizados. Además de los datos requeridos para determinar los índices de incidencia y severidad, se obtuvo muestra de tejido joven de cada planta, principalmente de hojas próximas al meristemo apical, tal como se observa en la Figura 3C. La muestra fue colocada en un tubo Eppendorf de 2 mL debidamente

etiquetado, con etanol al 70%. Los ejemplares se trasladaron al laboratorio en hielera para almacenarse a 4°C y procesarse posteriormente.



**Figura 3.** Cuadrantes establecidos en área de cultivo y muestra de tejido. A) Marca para establecer el límite del cuadrante en el cultivo de Los Planes. B) Representación de los cuadrantes establecidos y localización de una de las marcas. C) Muestra de tejido de planta de calabacita.

## 6.2 Monitoreo de insectos con trampas amarillas

Con la finalidad de establecer la relación entre los insectos observados y la patología en los campos de cultivo, se colocaron trampas cromáticas adhesivas de color amarillo de 30 x 20 cm para monitoreo de mosquita blanca y chicharritas, insectos reportados como vectores de los fitopatógenos estudiados. En promedio, se colocaron 9 trampas por área de cultivo: 4 por ha, a la altura del segundo tercio de la planta, a partir de la floración, y una se ubicó en la vegetación nativa colindante. De éstas se tomaron insectos que corresponden a 3 diferentes chicharritas y se almacenaron en etanol al 70%, en tubos Eppendorf debidamente etiquetados. La mosquita blanca se obtuvo directamente de las hojas, al colocar un frasco de vidrio con etanol al 70% debajo del envés de las que estuvieran infestadas para que, al sacudirlas, el insecto cayera dentro de éste. En ambos casos, las muestras se almacenaron a 4°C para ser procesadas posteriormente.

Las trampas se colocaron en las diferentes áreas de cultivo, se distribuyeron tal como se muestra en la figura 4 (A y B), de acuerdo a lo establecido, para cuantificar los adultos de mosquita blanca y chicharritas. El material biológico de mosquita blanca se recolectó directamente del envés de las hojas (Fig. 4C) de *C. pepo*.



**Figura 4.** Distribución de trampas amarillas para monitoreo de insectos. A) Distribución de las trampas colocadas en el área de cultivo de Los Planes. B) Trampa colocada en área de cultivo de El Carrizal. C) Hoja de la que se recolectaron insectos adultos de mosquita blanca.

### 6.3 Detección de begomovirus y fitoplasmas

Previo a la detección de begomovirus y fitoplasmas, se realizó la extracción de ADN genómico del tejido de plantas de calabazas sintomáticas y asintomáticas, por medio del método CTAB modificado (Anexo B). En el caso de los insectos también recolectados en los diferentes campos de cultivo, a través de las trampas amarillas o directamente del envés de las hojas, éstos se procesaron por el método CTAB modificado por Zhang *et al.* (1998) (Anexo B).

Para medir la pureza y concentración del ADN genómico, se llevó a cabo la cuantificación de los productos con el uso de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Anexo B). Con la técnica de electroforesis en gel, se visualizaron los productos; en un gel a base de agarosa al 1%, se tiñeron con SYBR Safe (S33102, Invitrogen TM), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-HCl) a 80 volts, por 30 minutos. Se utilizó el marcador 1 kb Plus DNA Lader (Invitrogen™). Para documentar la técnica de electroforesis, se usó un fotodocumentador BioDoc-It de UVP Imaging System.

#### 6.3.1 Detección de begomovirus en plantas de *C. pepo*

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR, se utilizó para la detección de begomovirus, usando los oligonucleótidos degenerados diseñados por Rojas *et al.* (1993): PAL1v1978 (5'-GGCCCACAT(C/T)GTCTT(C/T)CC(A/C/G/T)GT-3') y PAR1c496 (5'-GGGCTT(C/T)CT(A/G)TACAT(A/G)GG-3') (Anexo C); dirigidos a regiones conservadas de los genes que codifican para las proteínas Rep y CP. Debido a la separación de estas regiones en begomovirus monopartitas y bipartitas, es posible discernir entre ellos, amplificando un fragmento de 1.4 kb para monopartitas y 1.1 kb cuando se trata de begomovirus bipartitas.

Para la detección de la cubierta proteica CP se recurrió a los cebadores AV494(5'-GCC(C/T)AT(G/A)TA(T/C)AG(A/G)AAGCC(A/C)AG-3') y AC1048(5'-GG(A/G)TT(A/G/T)GA(G/A)GCATG(T/A/C)GTACATG-3') (Anexo C); dirigidos a la región conservada del gen que codifica esta proteína, amplificando 550 pb. Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar.

#### **6.3.1.1 Detección de SLCuV en calabacita y en *B. tabaci***

Mediante PCR, se hizo la detección de SLCuV en ADN genómico de 270 plantas muestreadas con los cebadores SLCVA-2295F(5'-CAGATAATTGAATGAGGCAG-3')/Xho-SLCVA-R(5'-GTACTCGAGAATCATGAA-ATAAAATTC-3') o SLCVA2314R (5'-CTGCCTCATTCAATTATCTG-3')/Xho-SLCVA-F (5'-CATGATTCTGAGTACATAATTTAC-3') (Lapidot *et al.*, 2014) (Anexo C), que amplifican aproximadamente la mitad del genoma de SLCuV.

Por otra parte, se llevó a cabo la detección de SLCuV por PCR, en ADN genómico de *B. tabaci*, utilizando un par de cebadores dirigidos al gen de la CP de este virus: SqA1R (5'-AGCTGTATCTTGGGCAACAGA-3') y SqA2 (5'-TATCTCCCATCTTGGCAAGG-3') (Sobh *et al.*, 2012), que amplifican un producto de 601 pb. Los resultados obtenidos se enviaron a secuenciar.

### **6.3.2 Detección de fitoplasmas**

#### **6.3.2.1 Detección de fitoplasmas por la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las muestras de hojas y tallos de plantas de *C. pepo*, sintomática y asintomáticas, fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5%, en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2 M (pH 7.2-7.4), a 4°C durante 24 horas. Se lavaron en el mismo amortiguador por un lapso de 20 minutos y se deshidrataron en soluciones graduales de alcohol al 30, 50, 70, 96 y 100%. Finalmente, se colocaron en acetona al 100% durante 20 minutos. Después del paso de deshidratación, las muestras se secaron en dióxido de carbono a punto crítico (Samdri PVT-3B), se cubrieron con paladio y se analizaron en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi-S-3000N) a 5, 10, 15 y 20 kV.

#### **6.3.2.2 Detección de fitoplasmas por PCR en plantas e insectos**

La detección de fitoplasmas se realizó por PCR, en ADN genómico de plantas e insectos. Se utilizaron cebadores universales diseñados sobre la región 16SrRNA-23SrRNA y dirigidos a fragmentos de secuencias conservadas del ARN ribosomal 16S. En reacciones primarias de PCR, se utilizaron los cebadores P1(5'-AAGAATTTGATCCTGGCTC-AGGATT-3')/P7(5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'), que amplifican 1830 pb; seguida de PCR anidada con dilución de 1:10-1:40 de acuerdo a la concentración del producto anterior, con los oligonucleótidos P1A(5'-ACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC-3')/P7A(5'-CCTTCAT-CGGCTCTTAGTGC-3'), que amplifican un fragmento de 1800 pb (Smart *et al.*, 1996); seguida de otra PCR anidada con dilución de acuerdo a la concentración, con los primers R16F2N(5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3')/R16R2(5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCC-CG-3'), que amplifican un fragmento de 1250 pb (Gundersen y Lee, 1996). Estos cebadores son utilizados comúnmente para la detección y clasificación de un gran número de fitoplasmas desconocidos (Anexo C). Otra estrategia realizada fue la documentada por Montano *et al.* (2007), con cebadores universales P1/P7 y R16F2N/R2, y específicos para el grupo 16SrIII de fitoplasmas de la enfermedad X. Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar.

## 6.4 Identificación de begomovirus y fitoplasmas

Las secuencias resultantes se alinearon en la plataforma de herramienta básica de alineamiento local (BLAST, en inglés Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, en inglés National Center for Biotechnology Information), para encontrar la similitud nucleotídica con las secuencias en la base de datos, y obtener la significancia estadística de las coincidencias; así como su estatus en el listado del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, en inglés International Committee on Taxonomy of Viruses) actualizado. Se utilizó paquetería bioinformática como: MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), Geneious 10.2.2, ApE-A plasmid Editor v2.0.51 (M. Wayne Davis) y BioEdit versión 7.2.5. Las secuencias obtenidas de fitoplasmas se analizaron con la paquetería mencionada y en la plataforma iPhyClassifier. <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>

## 6.5 Caracterización de begomovirus y fitoplasmas

### 6.5.1 Caracterización de SLCuV

Se aplicó la técnica de amplificación por círculo rodante (ACR) (RCA, del inglés Rolling Circle Amplification) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, usando el kit comercial TempliPhi GE Healthcare (Merck KGaA, Germany) que utiliza ADN polimerasa de bacteriófago Phi29 para amplificar exponencialmente plantillas de ADN circulares de una o dos cadenas.

Para amplificar el ADN-A se valió de los oligos (Anexo C) SLCVF-SalI (5'-TATAGTCGACGTTGAACCGGATTTGAATG-3')/SLCVR-SalI(5'-TATAGTCGACCTGAGGAGAGCACTAAATC-3') (Ahmad *et al.*, 2013), que amplifican el genoma completo; mientras que para el ADN-B se utilizaron dos pares de oligos SLCV-DNA-B1-F(5'-GTGGTTATGCAAGGCGTCGACCCAAC-3')/SLCV-DNA-B1-R(5'-GCAAACCTG-AAGCTATCGTCGGCGAAGC-3') y SLCV-DNA-B2-F (5'-GCTTCGCCGACGATAGCTTCAGTTTGC-3')/ SLCV-DNA-B2-R (5'-GTTGGGTCGACGCCTTGCATAACCAC-3') (Lapidot en Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a), donde cada uno amplifica aproximadamente la mitad del genoma.

Para la confirmación del genoma del SLCuV se realizó RFLP, para lo cual se seleccionaron endonucleasas de restricción de uno, dos o más sitios de corte, de acuerdo al genoma. Las enzimas utilizadas para el genoma A fueron: *EcoRI*, *BamHI*, *Clal* y *HpaII*; y para el genoma B: *EcoRI*, *XbaI* y *HpaII*. Los patrones de bandeo se observaron en gel de agarosa al 2%; de forma similar se analizaron los productos obtenidos de ADN plasmídico para la confirmación de los genomas, antes de la secuenciación.

Los productos de PCR de SLCuV amplificados y los cortes lineales con las enzimas mencionadas, se ligaron y clonaron con el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo C). Los amplicones obtenidos, se enviaron a secuenciar por ambos extremos a Genewiz, USA, donde proporcionan servicios utilizando el método de secuenciación de Sanger. Las secuencias se alinearon en la plataforma BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica para encontrar su similitud nucleotídica con las depositadas en la base de datos y obtener la significancia estadística de las coincidencias. Se procedió al ensamble de las secuencias para los genomas completos y su análisis para la caracterización.

Se obtuvieron las secuencias con las que se encontró una mayor similitud al genoma obtenido, otros begomovirus que afectan calabaza o variantes de SLCuV que atacan otros cultivos y las secuencias de otros begomovirus reportados en el estado de Baja California Sur. Cabe mencionar que sólo se consideraban si aparecían dentro del listado del ICTV actualizado. Se utilizó paquetería bioinformática como: MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), Geneious 10.2.2, ApE-A plasmid Editor v2.0.51 (M. Wayne Davis) y BioEdit versión 7.2.5.

### **6.5.2 Caracterización de fitoplasmas del grupos 16SrIII**

Se aplicó la técnica de RFLP para analizar los productos de PCR obtenidos con un tamaño de fragmento aproximado de 1250 pb de ADN de plantas sintomáticas, asintomáticas y de chicharritas, con los cebadores generales R16F2N/R16F2R. Las enzimas empleadas para estos análisis fueron *PstI*, *AluI* y *EcoRI*. Este procedimiento se utiliza para confirmar la presencia de fitoplasmas y descartar falsos positivos con respecto a la bacteria *Bacillus*

spp. Los patrones de bandeo se observaron en gel de agarosa al 2%, de acuerdo a lo descrito.

Los productos de PCR amplificados de fitoplasmas, se ligaron y clonaron de acuerdo a lo mencionado anteriormente (Anexo C). Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar por ambos extremos. Las secuencias resultantes se alinearon en la plataforma BLAST y se utilizó paquetería bioinformática como: BioEdit versión 7.2.5, MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), Geneious 10.2.2 e iPhyClassifier.

### **6.6 Estudio filogenético de SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII**

La historia evolutiva se dedujo utilizando el método Neighbor-Joining con la prueba de bootstrap (1,000 repeticiones). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando la técnica de probabilidad compuesta y los análisis evolutivos se hicieron en el programa MEGA7.

Una vez realizado el estudio de similitud con las diferentes secuencias disponibles en la plataforma BLAST y enlistadas en el ICTV, se llevó a cabo el análisis filogenético de las secuencias del genoma completo de SLCuV con las secuencias que presentaron mayor similitud, otros begomovirus que afectan calabaza o variantes de SLCuV que perjudican otros cultivos, y las secuencias de otros begomovirus reportados en el estado de Baja California Sur.

Después de revisar la similitud con secuencias de diferentes grupos de fitoplasmas, se hizo el estudio filogenético del fitoplasma identificado perteneciente al grupo 16SrIII, que muestra cómo la secuencia se agrupa con sus parientes más cercanos, su ubicación entre los diferentes grupos y su respectiva distancia evolutiva de los demás grupos.

### **6.7 Determinación de los vectores**

Debido a su importancia como plaga agrícola distribuida en el planeta, las poblaciones de mosca blanca son monitoreadas continuamente en diferentes lugares y diferentes cultivos, mediante el uso de cebadores dirigidos al gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (mtCOI). Muchas de las secuencias públicas disponibles de este gen eran de un fragmento de ~800 pb; con esos datos, Shatters *et al.* (2009) desarrollaron otros cebadores como



Btab-Uni (universales), que amplifican un fragmento de mtCOI de numerosos biotipos de *B. tabaci* y géneros, a través de un perfil de amplificación. Asimismo, diseñaron cebadores específicos para los biotipos B, Q y Nuevo Mundo (Anexo C) para una rápida identificación de biotipos. Estos últimos se utilizaron en este estudio para realizar la determinación del biotipo de *B. tabaci*

La identificación previa de las chicharritas se realizó mediante un análisis morfológico, considerando las especies reportadas en otros estudios, como vectores de fitoplasmas.

### **6.8 Patometría de infección mixta en *C. pepo***

Los análisis de patometría para la estimación de daños se realizaron con parámetros como incidencia, severidad, ocurrencia y prevalencia de la enfermedad. Para hacer la recolección de datos se tomó en consideración si las plantas presentaban o no la sintomatología reportada para los patógenos estudiados; el grado de severidad de acuerdo a la escala establecida (Tabla I), así como un registro fotográfico de las plantas muestreadas. Se diseñó un formato (Anexo A) en el que se registraron los datos necesarios para determinar el porcentaje de incidencia y el porcentaje de severidad. Las muestras se recolectaron mediante un muestreo aleatorio simple. Los análisis estadísticos se efectuaron con pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney, con un intervalo de confianza de 95%.

#### **6.8.1 Incidencia**

Para determinar el porcentaje de incidencia se consideraron los datos de plantas con sintomatología, entre el total de plantas observadas, utilizando la fórmula 1 (Salehi *et al.*, 2015):

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{No.de plantas sintomáticas}}{\text{No.de plantas observadas}} \times 100 \quad (1)$$

Los resultados se ajustaron con los obtenidos por PCR; es decir, las amplificaciones positivas de un fragmento del genoma A del SLCuV que abarca parte de los genes Rep,

Ren, AC4 y todo el gen Trap. En el caso del fitoplasma, se consideró positivo cuando se produjo la detección del fragmento del gen 16Sr y el análisis RFLP, que confirman la presencia de este patógeno. Posteriormente, se analizaron los datos obtenidos de incidencia de enfermedad en calabacita para determinar diferencias estadísticamente significativas en las diferentes áreas de cultivo, a través de pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis, con un intervalo de confianza de 95%.

### 6.8.2 Severidad

La severidad de la enfermedad o porcentaje de severidad, se determinó utilizando la fórmula, con la escala modificada de la categoría, según Van der Plank (1963). En ella se asignaron valores a partir de la observación de síntomas descritos para ambos patógenos en plantas de *C. pepo*. Después se registraron los datos en las diferentes áreas de cultivo de acuerdo a la escala de severidad.

**Tabla I.** Escala de severidad de síntomas

<b>Nivel de daño</b>	<b>Síntomas</b>
<b>0 = Sano</b>	Sin síntomas visibles y con un desarrollo normal
<b>1 = Leve</b>	Amarillamiento, moteado y/o mosaico
<b>2 = Moderado</b>	Amarillamiento y/o ligero enrollamiento de la hoja
<b>3 = Severo</b>	Amplio rango de amarillamiento, enrollamiento de las hojas, deformación de hojas, retraso en el crecimiento y clorosis pronunciada.

Los datos obtenidos, basados en la escala de severidad, se procesaron para determinar la severidad de la enfermedad o porcentaje de severidad, utilizando la fórmula 2:

$$\% \text{ Severidad} = \left( \sum i / N(\text{VM}) \right) * 100 \quad (2)$$

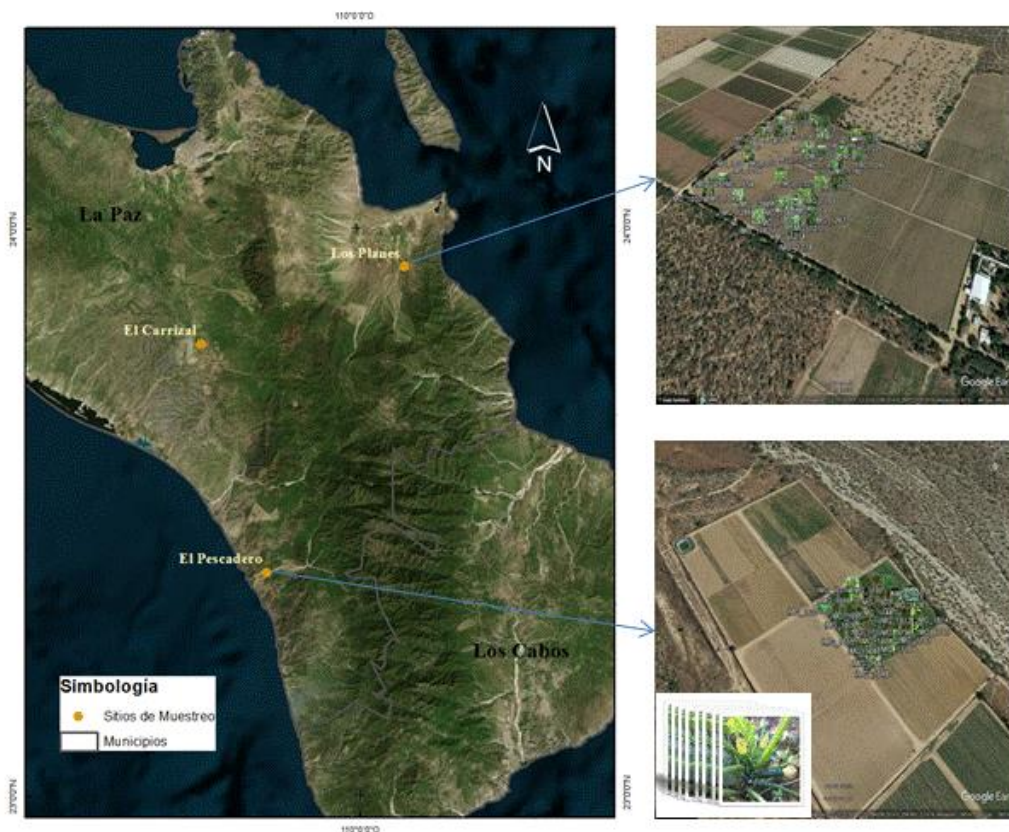
Donde: S = Porcentaje de severidad,  $\sum i$  = La suma de los valores observados, N = Número de plantas observadas, VM = El valor más alto de la escala.

Los resultados se examinaron con pruebas no paramétricas de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las localidades estudiadas.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Estudio de campo**

Los resultados del estudio de infección mixta asociado a begomovirus y fitoplasmas, realizado en tres zonas de cultivo comercial de calabacita (*C. pepo*) (Fig. 5) que se ubican a campo abierto en el municipio de La Paz, BCS; mostraron que la enfermedad está distribuida en tres áreas agrícolas del municipio, sin importar si el área está situada en el Pacífico o del lado del Golfo de California.



**Figura 5.** Mapa de localización de las áreas de estudio. Se observan con puntos en color naranja las áreas de cultivo en las que se hizo la investigación, que corresponden a San Juan de Los Planes, El Carrizal y El Pescadero. Mapa editado con el programa QGIS y Google Earth.

### 7.1.1 Sintomatología asociada a infección mixta

En las tres áreas de estudio que contempla este trabajo, se observaron los síntomas asociados a los patógenos de begomovirus y fitoplasmas, tal como se muestra en la Figura 6.

Las imágenes que aparecen corresponden a los lugares mencionados y a dos ciclos de cultivo. En el panel A se exhibe una vista del área de cultivo en Los Planes, en la que se aprecia amarillamiento generalizado, resaltando algunas hojas totalmente cloróticas. En el panel B se pueden observar los síntomas de amarillamiento y deformación de las hojas. En el panel C se muestra una planta que en su primera etapa tuvo un buen desarrollo; las hojas más viejas son de tamaño no normal, no así las hojas más jóvenes ubicadas en el centro de

toda el área que abarca la planta, pues presentan síntomas de clorosis, reducción de su tamaño, enrollamiento y deformación. En el panel D aparecen plantas que muestran clorosis y reducción generalizado de su crecimiento, síntoma asociado con ambos patógenos. En el panel E se presenta una planta observada en El Pescadero con un alto número de brotes axilares, síntoma más asociado a fitoplasmas. En el panel F se observa una planta enana con amarillamiento generalizado, moteado y gran número de brotes, registrada en Los Planes, también con problemas relacionados a fitoplasmas. En el panel G se muestran plantas con mosaicos y reducción en el tamaño de las hojas. En el panel H se puede apreciar una planta con poco desarrollo, amarillamiento, deformación y reducción en el tamaño de las hojas. En el panel I una planta enana que fue documentada en El Carrizal, clorótica, con hojas reducidas deformes, corrugadas y enrolladas, más asociada a SLCuV. En el panel J una hoja con reducción en su tamaño, con clorosis intervenal, deformada y que empieza a enrollarse. En el panel K se presenta hoja deforme, clorótica, corrugada y con mosaico, observada en el área de cultivo de El Pescadero. En el panel L aparece una hoja con enrollamiento hacia arriba, reducida en su tamaño y con engrosamiento de venas, más característica de infección por SLCuV. En el panel M se muestra una hoja con mosaicos y reducida, asociada a infección por begomovirus. En el panel N se presenta una hoja reducida, deforme, corrugada y con clorosis. Finalmente, en el panel O están hojas cloróticas con reducción en su tamaño, deformes y algunas de ellas con enrollamiento hacia arriba.

Es importante destacar que no obstante los síntomas, las muestras que dieron positivo a los análisis moleculares para fitoplasmas, dieron positivo a los análisis para virus.



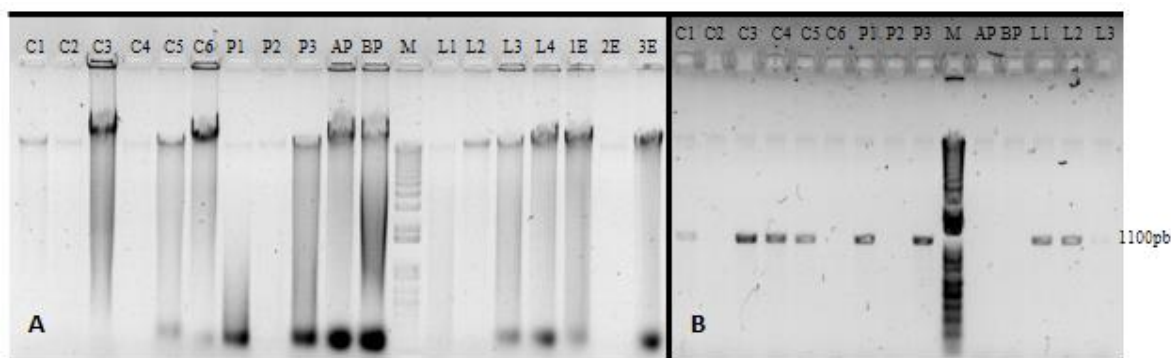
**Figura 6.** Sintomatología observada en los campos de cultivo de *C. pepo*, asociada a begomovirus y fitoplasmas.

## 7.2 Detección de begomovirus y fitoplasmas

### 7.2.1 Detección de begomovirus

Los resultados indican buena integridad del ADN (Fig. 7A) obtenido del tejido de plantas sintomáticas y asintomáticas de *C. pepo*. 95% de las muestras alcanzaron altas concentraciones, por lo que se hicieron las diluciones correspondientes. Una vez obtenido el ADN, fue utilizado como template para estudios de detección e identificación de begomovirus y fitoplasmas.

Además, se obtuvo la amplificación de un fragmento de 1100 pb (Fig. 7B) y 550 pb de los ensayos para detectar la RI y la CP con cebadores degenerados diseñados para la detección de varios begomovirus.



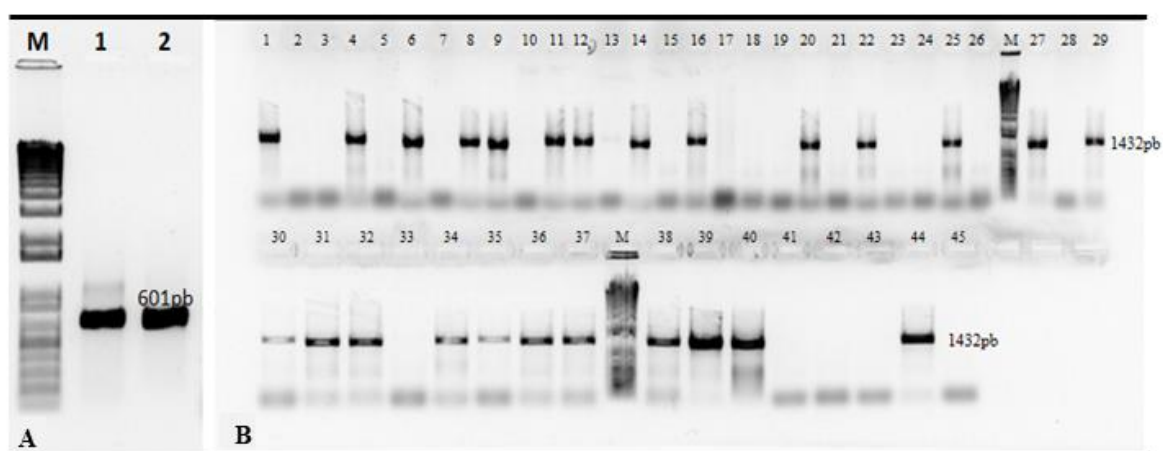
**Figura 7.** ADN total y detección de la RI de begomovirus. A) ADN genómico extraído de tejido de plantas de calabaza recolectadas en: EL Carrizal (Líneas: C1, C2, C3, C4, C5, C6, 1E, 2E, 3E), El Pescadero, (Líneas: P1, P2, P3, AP, BP) y Los Planes (Líneas: L1, L2, L3, L4). Línea M Marcador 1 kb Plus DNA Ladder. B) Producto de amplificación por PCR, utilizando cebadores degenerados PAL1v1978 y PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993) dirigidos a la RI de diferentes begomovirus, muestras positivas de EL Carrizal (Líneas: C1, C3, C4, C5), El Pescadero, (Líneas: P1, P3) y Los Planes (Líneas: L1, L2, L3). Muestra negativas de los tres lugares (Líneas: C2, C6, P2, AP, BP, L3).

#### 7.2.1.1 Detección de SLCuV en calabacita y en mosca blanca

Se observó la amplificación de un fragmento de 1432 pb (Fig. 8B) del genoma A del SLCuV, que abarca parte de los genes Rep, Ren, AC4 y todo el gen Trap, en muestras de plantas de *C. pepo* obtenidas en las tres diferentes áreas de cultivo (270 muestras). El

número de plantas positivas al análisis se presenta en la Tabla II, considerado para el porcentaje de incidencia de la enfermedad ocasionada por este virus en los campos de cultivo analizados.

Los resultados confirman que en *B. tabaci* está presente el SLCuV, al detectar su presencia en el ADN de los insectos recolectados en las tres áreas de estudio. Los análisis se hicieron con cebadores específicos dirigidos al gen de la CP de este virus SqA2F/SqA2R, que amplifican un fragmento de 601 pb (Fig. 8A).



**Figura 8.** Detección de SLCuV en *C. pepo* y *B. tabaci*. A) Línea M. Marcador 1 kb Plus DNA Ladder. Línea 1 y 2 Muestras positivas de con oligos SqA2F/ SqA2R que amplifican CP de SLCuV en ADN de *B. tabaci*. B) Producto de amplificación por PCR utilizando cebadores específicos dirigidos al genoma A del virus del enrollamiento de la hoja de calabaza Xho-SLCV-A-F/SLCVA2314R (Lapidot *et al*, 2014), que amplifica aproximadamente la mitad del genoma. Muestras positivas Líneas: 1, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 44. Muestras negativas Líneas: 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 28, 33, 41, 42, 43 y 45.

## 7.2.2 Detección de fitoplasmas

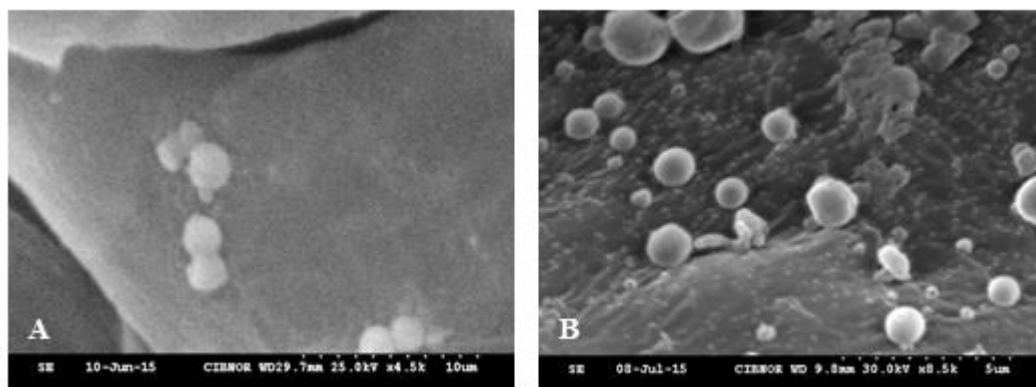
### 7.2.2.1 Detección de fitoplasmas por MEB

Para la detección de fitoplasmas se realizó, como paso inicial, el análisis de muestras mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (análisis cualitativo general). En la Figura 9 (A y B), se muestra el corte del tejido del tallo de plantas con síntomas



asociados a fitoplasmas. Se pueden distinguir cuerpos esféricos con un tamaño aproximado de entre 500 y 1,000 nm, observados a una escala de 5 y 10 micras, donde se puede visualizar la presencia de estas bacterias. Se aprecia como estos patógenos están dispersos en el tejido vascular de la planta, en aparente cumplimiento de su ciclo biológico de fisión binaria.

Aunque los ejemplares de plantas analizadas mostraban síntomas de begomovirus, éstos eran más severos y parecidos a los reportados y asociados a fitoplasmas; por lo que previo a los estudios moleculares, se observaron las muestras mediante esta técnica. Una vez que se confirmó mediante MEB que los síntomas apreciados en campo correspondían a fitoplasmas, las muestras posteriores fueron procesadas por técnicas moleculares para conocer el grupo al que pertenecen estos patógenos.

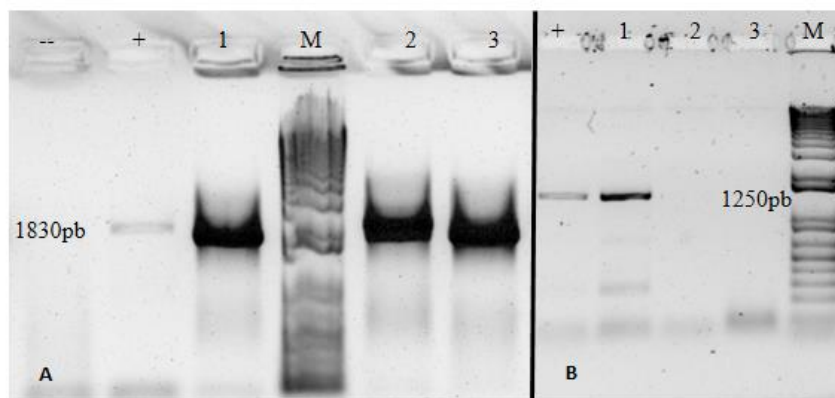


**Figura 9.** Detección de fitoplasmas por MEB. A) Se observa la presencia de fitoplasmas cumpliendo su ciclo biológico en el tejido vascular de la planta de calabaza, por fisión binaria en el hospedero. B) Fitoplasmas dispersos en tejido del tallo de plantas de *C. pepo*.

#### 7.2.2.2 Detección de fitoplasmas en plantas e insectos

Como primer resultado en los análisis de detección molecular de fitoplasmas, en los cuales se empleó el mismo ADN total usado para la amplificación de begomovirus, se alcanzó un fragmento de 1830 pb (Fig. 10A). De este producto se realizó una dilución, dependiendo de la concentración de entre 1:10 y 1:20, y se utilizó para la siguiente reacción de la cual se obtuvo un fragmento del gen 16Sr de 1250 pb (Fig. 10B). Estos exámenes también se

realizaron en las chicharritas recolectadas. Sin embargo, sólo se obtuvieron resultados positivos en las chicharrita que se identificaron con el número 3, y los ejemplares denominados 1 y 2, dieron negativo.



**Figura 10.** Detección de fitoplasmas por PCR primaria y anidada. A) Producto de PCR primaria con oligos P1/P7, donde: líneas: (--) Control negativo; (+) control positivo; 1 producto positivo de ADN de chicharrita. M, Marcador 1 kb Plus DNA Ladder; 2 y 3, muestras positivas de ADN de *C. pepo* de El Carrizal y El pescadero. B) Producto de PCR con primers R16F2N/R2. Líneas: (+) Control positivo, 1 muestra positiva y 2-3 muestras negativas de Los Planes. Para el control positivo se utilizó ADN de *C. roseaus* previamente identificada con fitoplasmas, donada para este estudio por la Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan.

### 7.2.3 Identificación de begomovirus y fitoplasmas

Los análisis por alineamiento múltiple de las secuencias en la plataforma BLAST dieron como resultado una similitud de la región intergénica IR entre el 96 y 99%. Con la cubierta proteica CP se obtuvo una similitud de entre 97-99% con otros aislados del virus del enrollamiento de la hoja de calabaza SLCuV. Con este primer resultado, se buscaron en la literatura cebadores específicos para este virus, con objeto de hacer un análisis que permitiera saber cuántas de las plantas de *C. pepo* muestreadas estaban infectadas por este virus.

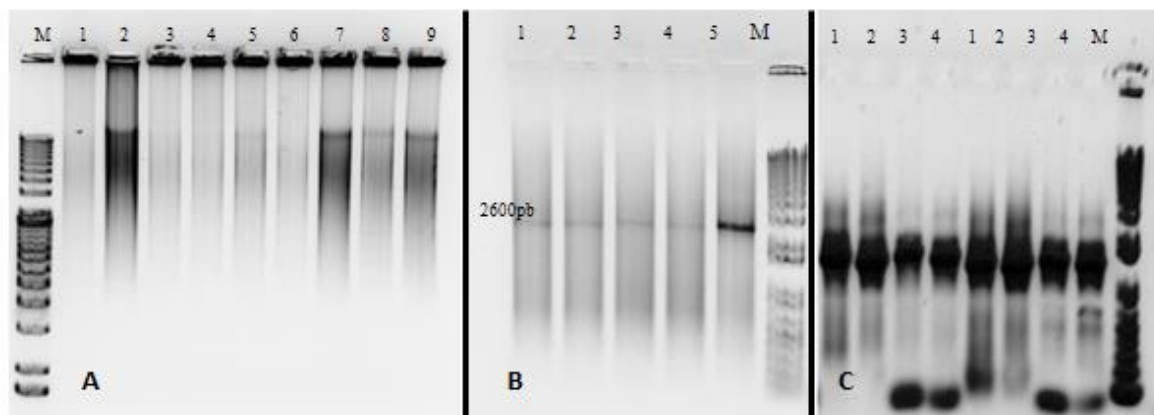
Con las secuencias obtenidas de fitoplasmas, se hicieron estudios por alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 16Sr contenidas en la

plataforma BLAST, con lo que se obtuvo una identidad de entre 98.6 y 98.9% con fitoplasmas del grupo 16SrIII. El análisis en la plataforma iPhyClassifier mostró que la secuencia comparte una similitud del 98.9% con el ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’, cepa de referencia ARNr con número de acceso GenBank JQ044393.

### 7.3 Caracterización de begomovirus y fitoplasmas

#### 7.3.1 Caracterización de SLCuV

Los resultados positivos en la detección del SLCuV en las muestras recolectadas de las tres áreas estudiadas, se utilizaron para la obtención del genoma A y B completos mediante ACR. El producto resultado de esta técnica (Fig. 11A) se utilizó como template para obtener el genoma A del SLCuV, con los oligos SLCVF-Sal I/SLCVR-Sal I, de los que resultó un amplicon de 2638 pb (Fig. 11B). De forma similar, se hizo para obtener el genoma B completo, con los cebadores SLCVB2F/SLCVB2 y SCLVB1F/SCLVB1R, donde cada par amplifica, aproximadamente, la mitad del genoma (1644 y 1316 pb) (Fig. 11C).



**Figura 11.** Detección de Genoma A y B de SLCuV, en producto de ACR. A) Línea M. Marcador 1 kb Plus DNA Ladder. Líneas: 1- 9, Producto de ACR a partir de ADN genómico de muestras de plantas de *C. pepo*, obtenidas en los 3 diferentes sitios muestreados. B) Líneas: 1-5. Producto de PCR con oligos diseñados para la amplificación del genoma A completo de SLCuV, amplificando 2600 pb. C) Líneas: (1-4 Producto de PCR con los cebadores SLCVB2F/SLCVB2 y SCLVB1F/SCLVB1R para la obtención del genoma B, a partir de dos fragmentos. Los productos obtenidos fueron procesados y enviados a secuenciar.

Los productos obtenidos del análisis de RFLP para la confirmación del genoma A y B del SLCuV con las enzimas de restricción: *EcoRI*, *BamHI* y *Clal* para genoma A, con sitios de corte únicos en los nt 1315, 1255 y 1141, respectivamente; y *EcoRI* y *XbaI* para el genoma B, con sitio de corte en el nt 457 y 1777, se enviaron a secuenciar.

Los resultados del ensamblaje del genoma A y B del SLCuV, se presentan en la Figura 12 (A y B); el acrónimo propuesto para el genoma completo del aislado de la Paz es el siguiente: SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]. Este resultado implicó el uso de la herramienta *maper* para alinear y mapear el genoma. Se hicieron 1,000 iteraciones de alineamiento y mapeo con el genoma de referencia.

En la tabla II, se presentan los datos obtenidos del análisis de la secuencia del genoma A del SLCuV- [MX:BCS:La Paz:17] No. de Acceso Gen Bank MF187211A; el porcentaje de identidad nucleotídica con cada secuencia del genoma A de los aislados disponibles en la base de datos de NCBI e ICTV elegidos para este estudio, en el que se consideraron secuencias de SLCuV aislados en diferentes regiones del mundo con las que se encontró un mayor porcentaje de identidad; otros begomovirus que afectan calabaza o variantes de SLCuV que afectan otros cultivos; así como las secuencias de otros begomovirus reportados en el estado de Baja California Sur y la región.

La mayor identidad nucleotídica del genoma A del SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] fue de 99.1%, con SLCuV aislado en Líbano; entre 98.8 y 99%, con otros aislados del Medio Oriente; y entre 97.2 y 98.2% con los SLCuV aislados en USA, como aparece en la Tabla II. Lo anterior es consistente con los criterios del ICTV (Brown *et al.*, 2015), al considerar que el nuevo aislado pertenece a la especie con la que comparte una identidad de secuencia  $\geq 91\%$  nt en la longitud completa del genoma A; y que pertenece a la cepa con la que comparte una identidad de secuencia  $\geq 94\%$  nt.

Con otros begomovirus que afectan la *C. pepo* u otros cultivos, pero que han sido identificados en el estado o en la región, puede observarse también cómo la identidad nucleotídica va disminuyendo. Por otro lado, en la misma Tabla II, se puede observar el amplio rango de hospederos de SLCuV que están delimitados, principalmente, en seis

familias: *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* y *Brassicaceae* (Abudy *et al.*, 2010; Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Anfoka *et al.*, 2017; Farrag *et al.*, 2014a, b; Singh *et al.*, 2008). Sin embargo, los miembros de la familia de las cucurbitáceas han destacado por ser los más seriamente afectados, a pesar de que se han documentado infecciones en otros cultivos de interés comercial como chile, tomate y frijol.

**Tabla II.** Porcentaje de identidad nucleotídica del genoma A de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] de BCS MF187211A por múltiples alineaciones, en comparación con otros aislados SLCuV; otros begomovirus que afectan calabaza o variantes de SLCuV que perjudican otros cultivos; así como las secuencias de otros begomovirus reportados en el estado de Baja California Sur y la región.

Begomovirus/acrónimo	SLCuV identidad nucleotídica (%)	Hospederos <sup>1</sup>	Región	GenBank acceso ADN-A	GenBank acceso ADN-B	Referencia
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[LB:09]	99.1	Sq.	Lebanon	HM368373	HM368374	Sobh <i>et al.</i> , 2012
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[JO:Hor:11]	99.0	To.	Jordán	JX444577		Ahmad <i>et al.</i> , 2013.
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[EG:Cal:06]	98.9	Sq.	Egipto (Cairo)	DQ285019		Idris <i>et al.</i> , 2006
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[JO:Sarv:11]	98.9	Chm.	Jordán	JX131281		Anfoka <i>et al.</i> , 2017
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[PL:10]	98.9	Sq., Wat., Cuc.	Palestina	KC441465		Ali-Shtayeh <i>et al.</i> , 2014a
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[IL:03]	98.8	Sq.	Israel	HQ184436		Abudy <i>et al.</i> , 2010
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[US:IV:04]	98.2	Sq.	USA (California )	DQ285016	DQ285017	Brown <i>et al.</i> , 2005b
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[US:IV:79]	98.1	ARH	USA (California )	M38183	M38182	Lazarowitz <i>et al.</i> , 1991
<i>Squash leaf curl virus</i> /SLCuV-[US:AZ:W:04]	97.2	Sq., Cm.	USA (Arizona)	AF256203	DQ285018	Brown <i>et al.</i> , 2005b
<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i> /MCLCuV- GT[GT:00]	85.3	Cm	Guatemala	AF325497	AF325498	Brown <i>et al.</i> , 2001
<i>Cucurbit leaf curl virus</i> / CuLCuV-[US:Cal:98]	80.4	Wat., Cm.	USA (California)	AF224760	AF224761	Guzmán <i>et al.</i> , 2000

<i>Cabbage leaf curl virus/CabLCV-</i> [US:Flo:96]	77.5	Sq	USA (Florida)	U65529	U65530	Abouzid <i>et al.</i> , 1992
<i>Bean calico mosaic virus</i> BCaMV- [MX:Son:86]	77.3	Bec.	México (Sonora)	AF110189	AF110190	Brown <i>et al.</i> , 1999
<i>Melon chlorotic mosaic virus/MeCMV-</i> [VN:Wat:09]	74.6	W	Venezuela	HM163576	HM163577	Romay <i>et al.</i> , 2010
<i>PepGMV-CR</i> [US:Ser:89]	73.9	To., Tab. y Dat.	USA (Arizona)	AY928516	AY928517	Brown <i>et al.</i> , 2005a
<i>Bean golden mosaic virus/BGMV-</i> [BGYMV- [GT:87]	69.9	Be.	Guatemala	M91604	M91605	Gilbertson <i>et al.</i> , 1993
<i>Tomato de La Paz virus/ToChLPV-</i> A[MX:BLP:02]	66.5	To.	México (BCS)	AY339618		Holguín-Peña <i>et al.</i> , 2003
<i>Squash leaf curl virus</i> SLCuV-[TW:PUM:05]	55.2	Sq	Taiwán	DQ866135		Tsai <i>et al.</i> , 2011
<i>Squash leaf curl Philippines virus</i> SLCuPV- [PH:BatP133:Pum:07]	55.0	Sol., Ceae.	Filipinas	EU487041		Tsai <i>et al.</i> , 2011
<i>Tomato yellow leaf curl virus/</i> TYLCV- [MX:BCS:08]	54.3	To., Pe.	México (BCS)	HM459851		Cárdenas-Conejo <i>et al.</i> , 2010
<i>Watermelon chlorotic stunt virus/WmCSV-</i> [PS:PAL:10]	53.4	W, Cuc	Palestina	KC462552		Ali-Shtayeh <i>et al.</i> , 2014b.

<sup>1</sup> Corresponde a las secuencias reportadas como especies por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Brown *et al.*, 2015; Zerbini *et al.*, 2017).

<sup>2</sup> ARH amplio rango de hospederos de SLCuV que están delimitados principalmente en seis familias: *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* y *Brassicaceae* (Abudy *et al.*, 2010; Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Anfoka *et al.*, 2017; Farrag *et al.*, 2014a, b; Singh *et al.*, 2008). Sq=Calabaza (*Cucurbita pepo*), To=Tomate (*Solanum lycopersicum*), Tab=Tabaco (*Nicotiana tabacum*) Chm=Mostaza (*Sinapis arvensis*), W=Sandía (*Citrullus lanatus*), Cuc=Pepino (*Cucumis sativus*), Cm=Melón (*Cucumis melo*), Be=Frijol (*Phaseolus vulgaris*), Pe=Chile (*Capsicum annum*), Dat= (*Datura stramonium*) y Bec=Frijol calico (*Phaseolus lunatus*), Sm=Berenjena (*Solanum melongena*), Ch=Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Pp= (*Physalis peruviana*), Ceae= (*Cucurbitaceae*), Sol= (*Solanaceae*).

Se observó que la secuencia del genoma B de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] compartió 99.1% de identidad nucleotídica con el SLCuV aislado de Líbano HM368374; así como 96.8-96.9% con el SLCuV M38182 y DQ285017, respectivamente, ambos aislados en California. La menor identidad fue de 96.4% con el SLCuV-WAZ DQ285018 de Arizona, registrando una mayor con el aislado del Medio Oriente que con los de USA, similar a lo que se observó con el componente A.

Se obtuvo la caracterización del genoma A y B (Fig. 12) de SLCuV detectado e identificado en plantas de calabacita de diferentes áreas de cultivo en Baja California Sur. Es de un begomovirus bipartita, cuyo genoma tiene una región intergénica en la que se encuentra una secuencia nanonucleotídica TAATATT(↓)AC, conservada para los miembros de la familia *Geminiviridae* a la que pertenece; con dos moléculas de ADN monocatenario circular denominadas ADN-A y ADN-B, que poseen un tamaño de 2638 nt y 2607 nt, respectivamente. En ambos genomas hay unidades de transcripción divergentes.

Los genes están separados por una RI (región intergénica), en la que se localiza la RC (región común), conservada en los dos componentes virales. El ADN-A (Fig. 12A) contiene un marco de lectura abierto en la cadena viral AV1 (213-968, 755 nt), que codifica la proteína de la cápside CP y cuatro ORFs en la cadena complementaria: AC1 codifica la proteína Rep (2493-1447, 1046 nt), que inicia la replicación del ADN viral uniéndose a los iterones dentro de la IR; AC2 (1505-1110, 396 nt) la proteína TrAP, un activador de transcripción; AC3 (1369-965, 404 nt) la proteína REn, potenciadora de replicación; y AC4 (2426-2049, 377 nt), ubicada dentro de AC1, con un marco de lectura diferente determinante de la patogenicidad.

Se encontró que la organización genómica del ADN-A, tamaño y posición de los genes fue similar a lo reportado por Ali-Shtayeh *et al.* (2014a). El análisis de los ORFs contenidos en el genoma A mostró que AV1 comparte una identidad del 99.7% con los squash de Líbano y Palestina; entre 99.2-99.6% con los aislados de Egipto, Israel y el Jordán-Sarv; 98% con los aislados en California; y con el squash de Arizona comparte la menor identidad, 96.7%.

Los ORFs de la cadena complementaria indicaron que el AC1 comparte una identidad de 98.3% con el aislado de Líbano, mientras que con otros aislados de la región como Egipto, Israel y el Jordán, entre 97 y 98%. Por su parte, con el aislado de Arizona comparte el 96.8% y la menor similitud es con el squash de California, con 97.5%.

En cuanto al ORF AC2, éste comparte una similitud de 100% con los aislados de Líbano y Egipto; 99.8% con los de Palestina y Jordán-Hor; y con los de Arizona y California 98.1 y 98.7%, respectivamente.

Los análisis mostraron que el ORF AC3 comparte una identidad de 98.3% con el squash aislado en Líbano; 98% con el de Jordán-Hor; 97.8% con los aislados de Israel y Palestina; mientras que con los aislados en California comparte entre 97.5 y 98.1%. La menor identidad que registró fue con el aislado de Arizona, con 96.8%.

Finalmente, el ORF AC4 exhibió una mayor relación con los aislados de Líbano y el Jordán-Hor, con 98.7%; 98.4% con el aislado Egipto; entre el 97.6 y 97.9% de identidad con los aislados de Palestina, California e Israel; mientras que con el de Arizona compartió la menor identidad, con 96.8%.

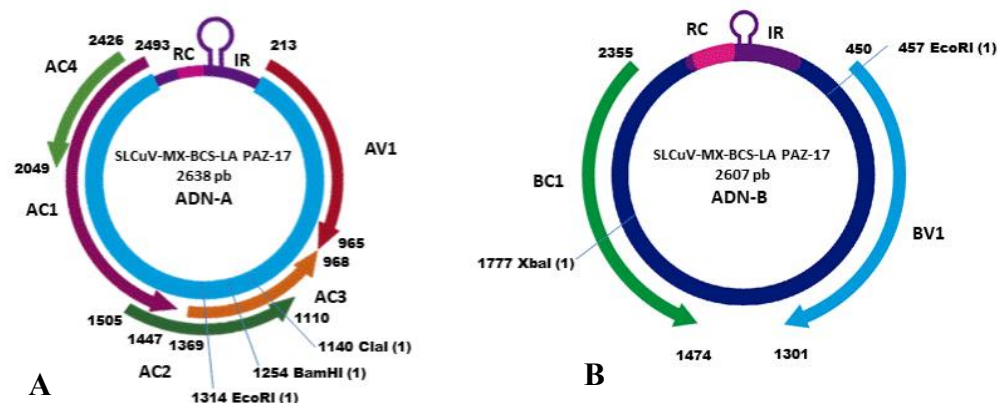
De este modo, se observó que todos los ORFs comparten el mayor porcentaje de similitud con los aislados en los países de Egipto y Medio Oriente; en cambio, es menor con los de Arizona y California.

Como se observa en la figura 12B, el ADN-B contiene dos ORFs. En la cadena viral, el gen BV1 (450-1301, 851 nt) codifica la proteína lanzadera nuclear NSP, la cual controla el transporte viral entre el núcleo y el citoplasma, y viceversa; en sentido de la cadena complementaria, el gen BC1 (2355-1474, 881 nt) codifica la proteína del movimiento MP, responsable del movimiento del virus de célula a célula (Lazarowitz, 1991). Se observó que el genoma B, en su organización y tamaño de genes, es consistente con lo reportado por Sobh *et al.* (2012).

El análisis de similitud del ADN-B con otros aislados mostró que el ORF BV1 compartió identidad de 99.9% con el SLCuV de Líbano; 96.7% con SLCuV-California;



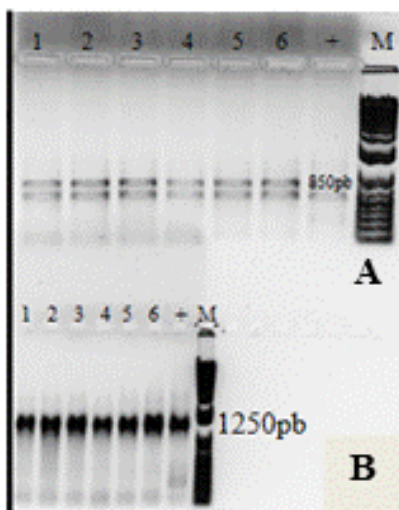
96.9% con otro SLCuV aislado en California; y la menor identidad observada fue de 96.4% con el SLCuV-WAZ Arizona. A su vez, el ORF BC1 compartió identidad de 99.2% con el SLCuV de Líbano; 99.0% con SLCuV-California; 98.8% con otro SLCuV aislado en California; y 98.5% con el SLCuV-WAZ Arizona, que fue la menor.



**Figura 12.** Esquema circular de la caracterización del genoma A y B de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17].

### 7.3.2 Caracterización de fitoplasmas

Se hizo digestión con enzimas endonucleasas al fragmento obtenido con oligos R16F2N/R2 para la confirmación de fitoplasmas por RFLP, donde la enzima *EcoRI* generó dos bandas ubicadas entre 872 y 603 pb (Fig. 13A) (Mello *et al.*, 2011). La enzima *PstI* (Fig. 13B), se utilizó para reconfirmación de fitoplasma y descartar la presencia de *Bacillus* spp., bacteria que por su cercana relación con los fitoplasmas genera falsos positivos. Ante su presencia, se pueden visualizar bandas de 850 y 650 pb, mientras que la de fitoplasma es indicada por una banda de 1250 pb. Por lo tanto, se confirmó la presencia de fitoplasmas en todas las muestras (Fig. 13A y B). Los productos obtenidos fueron procesados y enviados a secuenciar.

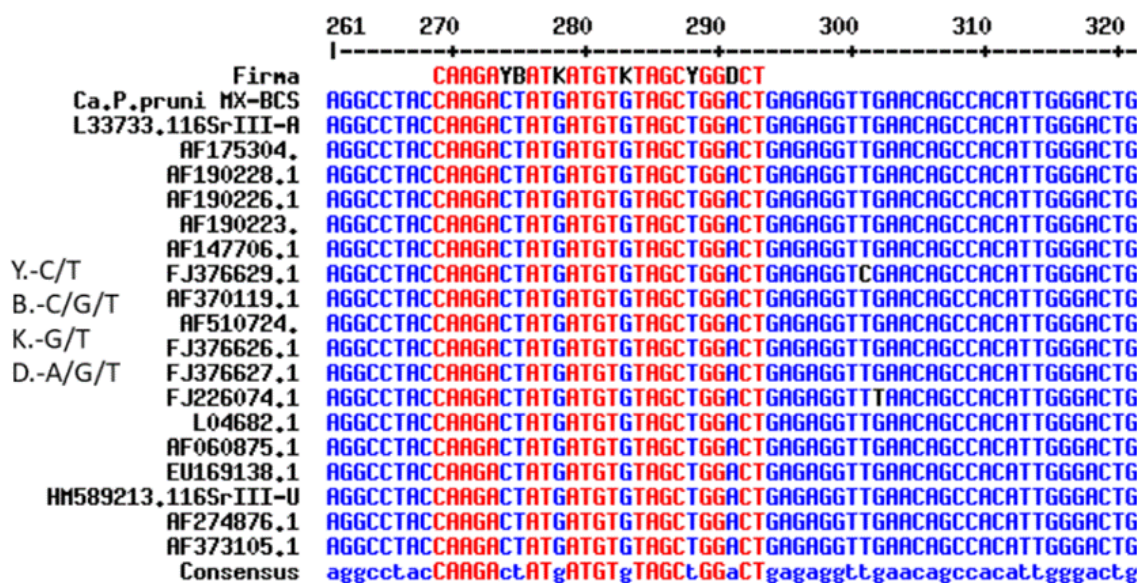


**Figura 13.** Análisis RFLP del fragmento de R16F2N. A) Producto de digestión con enzima *EcoR1* confirmando la presencia de fitoplasmas, dos bandas entre 872 y 603 pb. Línea (+) control positivo. Líneas: 1, 2 y 3 muestras extraídas de plantas de calabacita. Líneas: 4, 5 y 6 muestras de chicharritas; en ambos casos, de las 3 áreas de estudio. Línea M Marcador 1 kb Plus DNA Ladder. B) Producto de digestión con enzima *PstI*, Líneas 1-6 muestras de El Carrizal. Línea (+) control positivo. Para otra confirmación de la presencia de fitoplasma y descartar la presencia de *Bacillus* spp.

Con las secuencias obtenidas de fitoplasmas, se realizaron análisis por alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 16Sr en la plataforma BLAST y con la paquetería bioinformática mencionada en la metodología. Para lograr la secuencia de fitoplasma se hizo un ensamble con un total de 18 secuencias para la obtención de una secuencia consenso de 1159 pb; la cual es una serie parcial del gen 16Sr de fitoplasma. Se llevó a cabo un análisis de alineamiento con la firma (Fig. 14) característica de fitoplasma ‘CAAGAYBATKATGKTKTAGCYGGDCT’ (International Research Programme on Comparative Mycoplasma, 2004), en conjunto con las secuencias de fitoplasmas correspondientes a varios subgrupos del grupo 16SrIII de este patógeno. Como se observa en la Figura 14, hay concordancia entre la firma establecida para fitoplasmas por el IRPCM en 2004, las secuencias reportadas del grupo 16SrIII y la secuencia obtenida en este estudio (Anexo D); que como se sabe, la secuencia del 16S es conservada entre bacterias.

La secuencia obtenida de fitoplasmas comparte 98.6% de similitud con ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ Western X-disease, con número de acceso GenBank L04682 (Schneider *et al.*, 1993). Los resultados indican que el fitoplasma aislado de plantas de *C. pepo* pertenece a la especie ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’, cumpliendo con el criterio establecido para especies que pertenecen a ‘*Ca. Phytoplasma*’, definido por el 97.5% de similitud con la secuencia del gen 16S ARNr, establecido en 2004 por el IRPCM.

Otras secuencias del grupo 16SrIII con las que comparte alta similitud, reportadas en diferentes regiones, son: de Lituania, con número de acceso AF175304, comparte 99.1% de similitud (Staniulis *et al.*, 2000); 99.2% con KX470430 de Canadá (Arocha *et al.*, 2016), y 99.5% con KX773530 de Rusia (Girsova *et al.*, 2017).

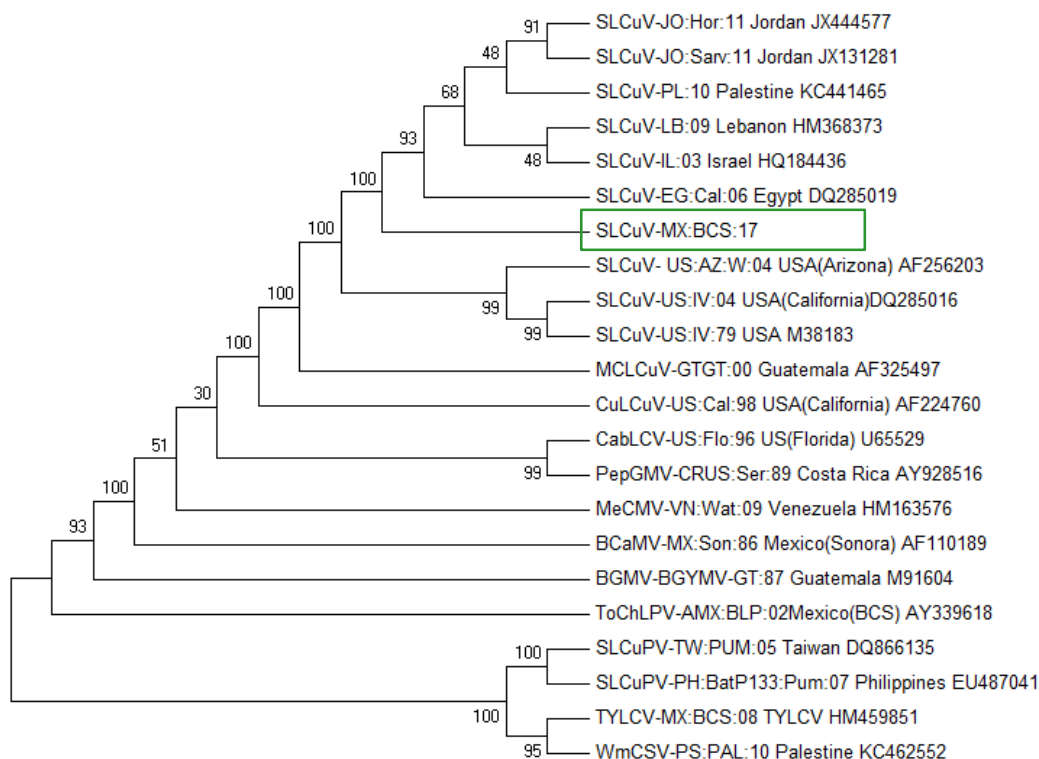


**Figura 14.** La firma de fitoplasmas en secuencias de grupo 16SrIII. Se observa análisis de secuencias del grupo 16SrIII y la secuencia obtenida que confirma la presencia de la firma establecida para fitoplasmas por IRPCM en 2004.

## 7.4 Estudio filogenético de SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII

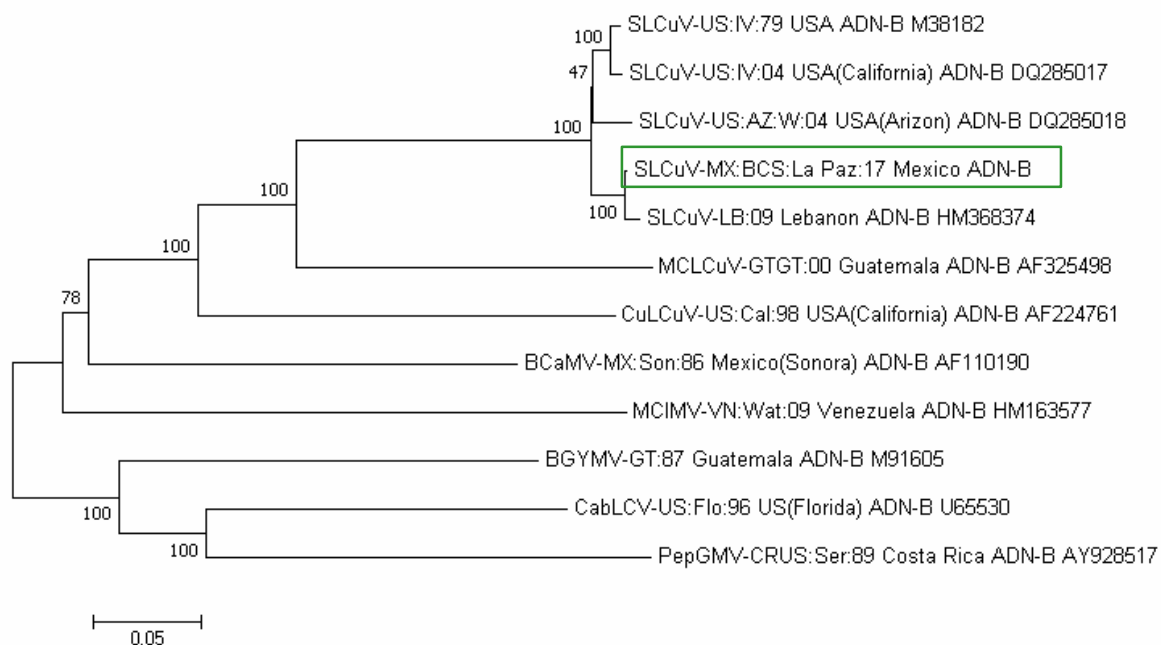
### 7.4.1 Estudio filogenético de SLCuV

La construcción del árbol filogenético se realizó con secuencias de begomovirus que afectan cucurbitáceas y otros cultivos en el Viejo y Nuevo Mundo (Tabla II). En la figura 15, se puede inferir con qué secuencias tienen mayor afinidad del genoma A de SLCuV-[Mx:BCS:La Paz:17]. Como puede constatar, se encuentra dentro del clado de los SLCuV y dentro del subclado de los SLCuV, aislados en países como Egipto, Israel, Líbano, Palestina y Jordán.



**Figura 15.** Árbol filogenético de genoma A de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]. El árbol filogenético muestra la relación predicha entre el clado de squash y dentro de ésta, una clara separación entre los virus reportados en Medio Oriente y en América; los squash reportados en Taiwán y Filipinas, se agrupan en un clado diferente. Los otros begomovirus que afectan calabaza o ubicados en la región, se observan entre ambos clados, presentando una relación más cercana. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método Neighbor-Joining, con la prueba de bootstrap (1,000 repeticiones). Las distancias evolutivas se calcularon con el método de máxima probabilidad compuesta y los estudios evolutivos se hicieron en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

La construcción del árbol filogenético se ejecutó con secuencias (Tabla II), mediante las cuales se encontró una mayor similitud con el genoma B de SLCuV- [MX:BCS:La Paz:17] de BCS (Fig. 16), otros begomovirus que afectan calabaza y las secuencias de algunos begomovirus reportados en USA y Latinoamérica.

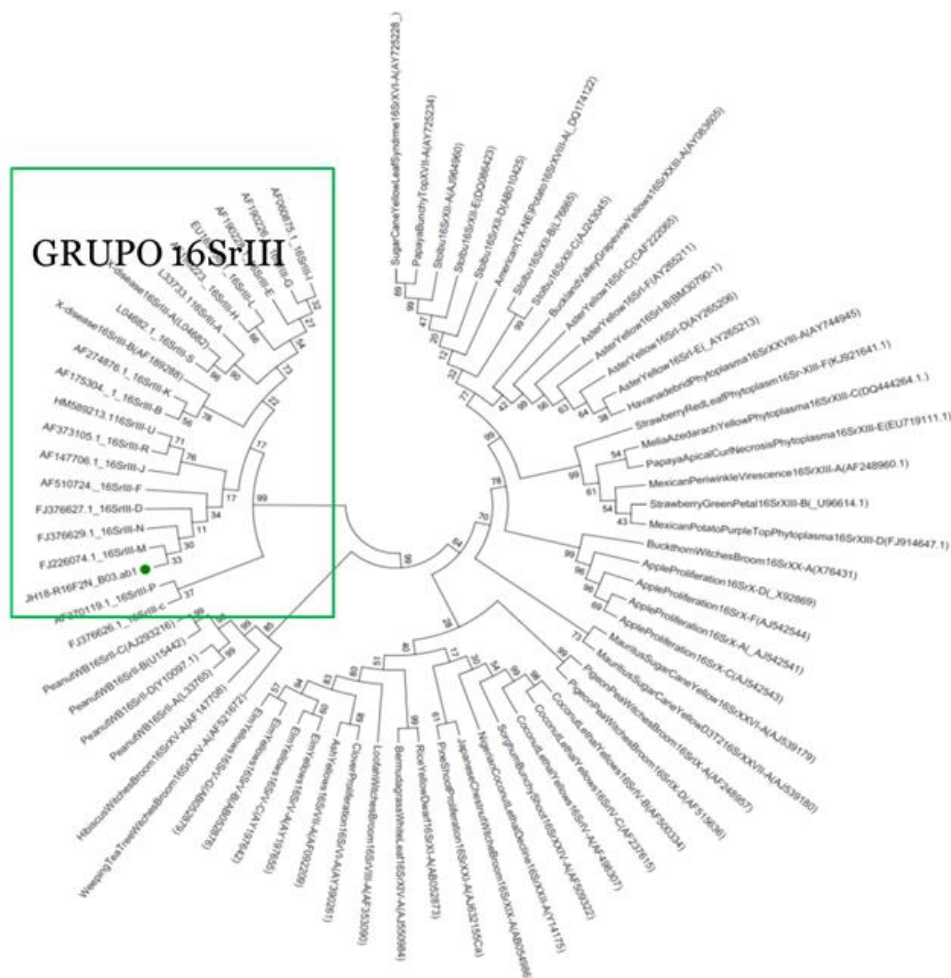


**Figura 16.** Árbol filogenético del genoma B de SLCuV- [MX:BCS:La Paz:17]. Distancia evolutiva con otros miembros del clado squash y begomovirus aislados en USA, México y Latinoamérica. En el árbol filogenético se observa una clara agrupación de aislados squash, separados de otros begomovirus. Entre el clado de los squash hay dos agrupaciones: en un brazo los aislados en USA, y en el otro se ubica la secuencia del ADN-B de SLCuV- [MX:La Paz:17], con el aislado en Líbano, mostrando una mayor homologación entre ellos. Los otros begomovirus que afectan calabaza como el MCLCuV muestran una relación más cercana con CuLCuV que con MCIMV; entre éstos se ubica BCMV, aislado en el estado de Sonora; y en un clado más separado se agrupan BGYMV, CabLCV y PepGMV, revelando una mayor distancia con la secuencia aquí obtenida y los aislado de USA. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método Neighbor-Joining, con la prueba de bootstrap (1,000 repeticiones). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta y los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA7.

#### 7.4.2 Estudio filogenético de fitoplasmas del grupo 16SrIII

La filogenia de la secuencia obtenida (Anexo D) indica en la Figura 17 que se agrupa claramente en el clado del grupo III, mientras que las secuencias de otros grupos se van

concentrando con sus respectivos parientes. En el grupo 16Sr XII se observan seis subgrupos, sin embargo están separados por un miembro del subgrupo 16Sr XVIII.



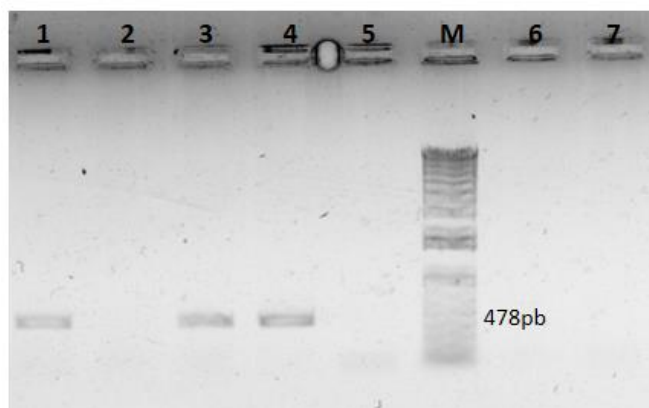
**Figura 17.** Árbol filogenético de ‘*Ca. P. pruni*’ con cepas de referencia de cada grupo 16Sr de fitoplasma y algunos subgrupos. Para la construcción del árbol se utilizó un fragmento de gen 16Sr de cepas de referencia de diferentes grupos 16Sr de fitoplasmas y algunos subgrupos. La secuencia obtenida en este estudio (JH18-R16F2N) muestra una clara agrupación con los miembros de grupos 16SrIII, y su consecuente separación evolutiva de los demás grupos y subgrupos. Otros con los que exhibe mayor similitud es con el 16SrII (B, C y D), XV y XXV. No obstante, con los que existe mayor distancia evolutiva de las secuencias utilizadas, es con los grupos 16Sr XVI, XVII y XII. El análisis evolutivo se realizó utilizando el método Neighbor-Joining (Kumar *et al.*, 2016), la fiabilidad se sometió a la prueba de bootstrap de 1,000 repeticiones y los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA7.

## 7.5 Determinación de los vectores

### 7.5.1 Determinación de biotipo de *B. tabaci*

Los resultados indican alta presencia de adultos de mosquita blanca ampliamente reconocida como vector de begomovirus, con un promedio de 70 individuos en cada trampa por día. El rango de individuos cuantificados osciló entre 20 y 134 por trampa, por día.

Se confirmó el biotipo B de *B. tabaci* en cultivos de calabacita en BCS con los cebadores BioNW-F/BioNW-R y BioQ-F/ BioQ-R y BioB-F/ BioB-R. Con los primeros dos pares de oligos, se obtuvieron resultados negativos. No obstante, con los oligos para el biotipo B, se obtuvieron resultados positivos al amplificar un fragmento de 478 pb (Fig. 18) del gen mtCOI, en muestras analizadas de los 3 campos de cultivo de *C. pepo*. Con el estudio de las secuencias del gen mtCOI de *B. tabaci*, se logró un índice de similitud de 99%, con la secuencia identificada con el número de ascensión de GenBank KT235802, reportada en China por Zhang *et al.* (2005).



**Figura 18.** Confirmación del biotipo de *B. tabaci*. Producto de PCR, líneas: 1, 3 y 4 muestras positivas con fragmento de 478 pb de mtCOI de *B. tabaci*, de todas las áreas de estudio con oligos BioBF/BioBR. Línea 2. Control negativo. Líneas: 5, 6 y 7 muestras que dieron negativo con oligos BioQF/BioQR. Carril M. Marcador 1 kb Plus DNA Ladder.

### 7.5.2 Identificación preliminar de chicharrita

Se observó mayor similitud morfológica entre la chicharrita documentada en este estudio, con el número 3 e insectos del género *Circullifer* spp, como las que se pueden apreciar en la Figura 19 (D y F), insectos reportados por diferentes autores como vectores de fitoplasmas.

El resultado de la presente investigación se considera una identificación preliminar de la denominada Chicharrita 3 como presunta *Circullifer* spp. Sin embargo, los análisis por la técnica de PCR y RFLP confirmaron la presencia de fitoplasmas en al ADN extraído de estos insectos (Fig. 13A); en las otras dos especies de chicharritas estudiadas los resultados fueron negativos. En adición, el ejemplar del que se observaron resultados positivos fue del que se registró el mayor número de individuos. En la figura 19 (A, B y C), se muestran las chicharritas recolectadas en las áreas de estudio, pertenecientes al género *Circullifer* (Fig. 19D y F), reportado como vector de fitoplasma (Fig. 19F). Los ejemplares con los que se registró mayor similitud morfológica con la denominada chicharrita 3 se observan en la figura 19 (C y E); los cuales dieron positivo a los análisis de detección de fitoplasmas.





**Figura 19.** Chicharritas presentes en cultivo de calabacita. A) Chicharrita 1. B) Chicharrita 2. C) Chicharrita 3. D) Chicharrita del género *Circulifer opacipennis* (Lethierry 1876a: lxxxiii). E) Chicharrita 3. F) *Circullifer tenellus* (Baker 1896<sup>a</sup>:24). Nota: las fotos D y F se tomaron del National Museum Wales-Departamento de Natural Sciences; fotos A, B, C y E de Vargas-Salinas M.

### 7.6 Patometría de infección mixta en *C. pepo*

La incidencia de la infección mixta osciló entre 70 y 75.5%, obtenida a partir del número de plantas donde se detectó la presencia de ambos patógenos (Tablas III y IV). En El Carrizal y El Pescadero fue de 70%, mientras que en Los Planes fue de 75.5%. Para los estudios de patometría de la infección mixta en *C. pepo*, que permitieron la estimación de daños, se utilizaron parámetros como: incidencia, severidad, ocurrencia y prevalencia de la enfermedad.

### 7.6.1 Incidencia de SLCuV en *C. pepo*

La incidencia de la enfermedad asociada a SLCuV (Tabla III), observada en las diferentes áreas de cultivo estudiadas, osciló entre 73.3 y 97.7%. Los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas. A pesar de ello, el número promedio de plantas que dieron positivo al análisis de PCR para la detección de SLCuV, fue 62; en cambio, el número promedio de plantas asintomáticas que amplificaron positivo para este análisis fue de 12.

**Tabla III.** Porcentaje de incidencia de SLCuV en *C. pepo*. Se presenta el porcentaje de incidencia asociada con la enfermedad del enrollamiento de la hoja de calabaza ocasionada por SLCuV, en diferentes campos agrícolas de Baja California Sur, México.

Localidades	Número de plantas con síntomas	Número de plantas asintomáticas	Número de plantas con síntomas /PCR + <sup>1</sup>	Número de plantas asintomáticas /PCR+	Número de plantas con síntomas /PCR-	Plantas asintomáticas /PCR-	(%) Incidencia <sup>2</sup>
El Carrizal	66	24	66	22	0	2	97.7
Los Planes	63	27	59	11	4	16	77.7
El Pescadero	63	27	62	4	1	23	73.3
Promedio	64	26	62	12	2	14	82.9

<sup>1</sup> Promedio 90 plantas en cada localidad recolectada en dos ciclos de cultivo.

<sup>2</sup> Incidencia (I) =  $\Sigma A/N \cdot 100$ ; donde: A = Número de plantas sintomáticas y asintomáticas PCR+ para SLCuV, N = Total de plantas.

Se obtuvo el porcentaje de incidencia con la amplificación de un fragmento del genoma A, del SLCuV en las muestras, tanto de plantas sintomáticas como asintomáticas. El promedio de plantas asintomáticas que dio negativo al análisis de PCR fue de 14. Sin embargo, el número promedio de plantas con síntomas que dio negativo al análisis fue 2. De las 270 plantas contabilizadas, en 192 se rastrearon síntomas y 78 resultaron asintomáticas. Empero, 37 plantas asintomáticas dieron positivo al análisis por PCR.

### 7.6.2 Incidencia de fitoplasmas en *C. pepo*

El porcentaje de incidencia asociado a infección con fitoplasmas (Tabla IV) consideró los datos de plantas con sintomatología, entre el total de plantas observadas, de acuerdo a la metodología. Mas, una vez obtenidos los resultados de PCR positivos de la amplificación del fragmento con cebadores R16F2N/R2 y análisis de RFLP, los valores se ajustaron y es lo que se consideró como incidencia.

En promedio, la incidencia de la enfermedad asociada al amarillamiento, ocasionada por fitoplasmas del grupo 16Sr III estuvo entre 70 y 75.5%, con un promedio de 72%. No obstante, la incidencia obtenida no es estadísticamente significativa entre las tres áreas de cultivo estudiadas.

**Tabla IV.** Porcentaje de incidencia de ‘Ca.’ Phytoplasma grupo 16SrIII en calabacita. Plantas con síntomas y porcentaje de incidencia asociada con la enfermedad del amarillamiento de la hoja de calabaza ocasionada por ‘Ca.’ P. pruni grupo 16SrIII, en diferentes campos agrícolas de Baja California Sur, México.

Localidades	Número de plantas con síntomas	Número de plantas asintomáticas	Número de plantas con síntomas /PCR + <sup>1</sup>	Número de plantas asintomáticas /PCR+	Número de plantas con síntomas /PCR-	Plantas asintomáticas /PCR	(%) Incidencia <sup>2</sup>
El Carrizal	66	24	63	0	3	24	70
Los Planes	63	27	63	5	0	22	75.5
El Pescadero	63	27	58	5	0	22	70
Promedio	64	26	61	3	1	23	72

<sup>1</sup> Promedio 90 plantas en cada localidad recolectada en dos ciclos de cultivo.

<sup>2</sup> Incidencia (I) =  $\Sigma A/N \cdot 100$ ; donde: A = Número de plantas sintomáticas y asintomáticas PCR+ para Fitoplasmas; N = Total de plantas.

Por su parte, el promedio de plantas con síntomas que dio positivo para la detección de fitoplasmas por PCR fue de 61; mientras que el de plantas asintomáticas que dio positivo para la detección fue de 3. Asimismo, en promedio sólo una planta con sintomatología dio negativo a la detección y el de aquellas asintomáticas que dieron negativo a la detección fue de 23. El promedio de plantas observadas con síntomas por área estudiada fue 64; mientras que las asintomáticas observadas fueron 26.

### 7.6.3 Severidad

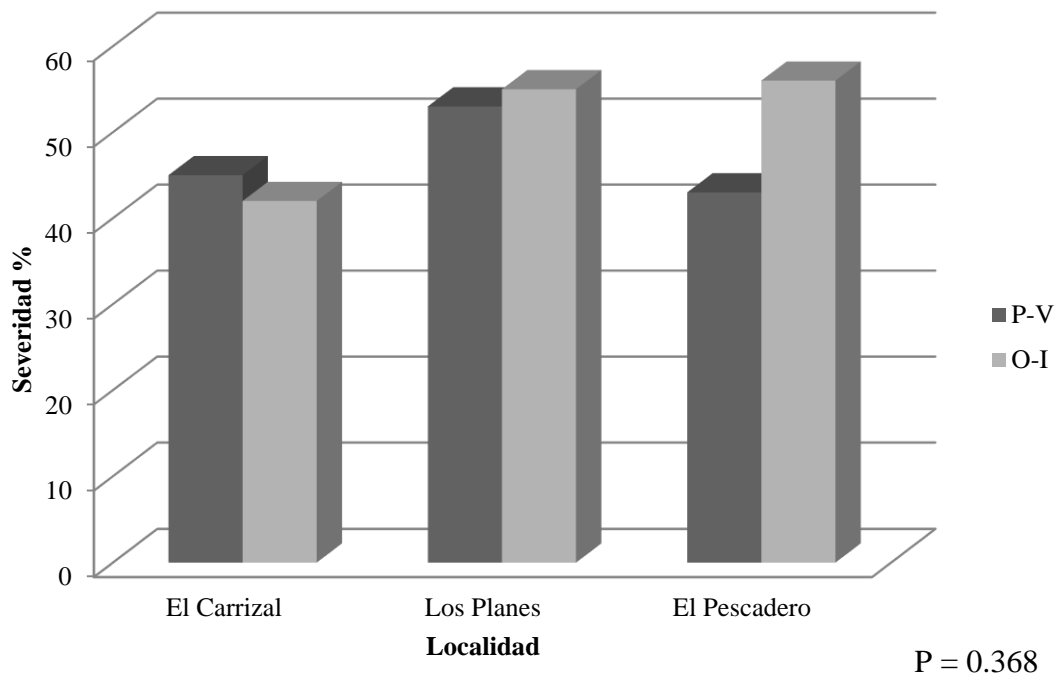
Para determinar el índice de severidad, se consideró la presencia de la sintomatología y se le asignó un valor a lo observado de acuerdo a la escala establecida en la metodología (Tabla I). En el Anexo A se observa el formato de registro de datos. A su vez, en la Figura 20 se presenta la sintomatología más recurrente que se registró en los diferentes campos de cultivo en que se recolectó la información y el criterio que se utilizó para el establecimiento de la escala de severidad.



**Figura 20.** Síntomas observados de la escala de severidad. A) Planta sana, sin síntomas visibles y con un desarrollo normal. B) Síntomas leves de amarillamiento, clorosis, moteado y mosaico. C) Síntomas moderados de amarillamiento y/o ligero enrollamiento de la hoja. D) Síntoma severo, amplio rango de amarillamiento, enrollamiento de ápice, deformación de hojas, retraso en el crecimiento y clorosis pronunciada.

El índice de severidad de la enfermedad mixta (Fig. 21), presente en los diferentes campos de cultivo de *C. pepo* y asociado a SLCuV y fitoplasmas del grupo III, en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno, osciló entre 42 y 56%. El porcentaje más alto se registró en los cultivos de Los Planes y Pescadero, en el ciclo otoño-invierno, con 55 y 56,

respectivamente; en el ciclo primavera-verano, el más elevado se observó en Los Planes. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. En El Carrizal y Los Planes, el porcentaje de severidad mostró menos diferencias entre un ciclo y otro, con 42(O-I) 45(P-V) y 53 (P-V) 55 (O-I), respectivamente; que en El Pescadero, que presentó 43 (P-V) 56(O-I).



**Figura 21.** Índice de severidad de la enfermedad del enrollamiento y amarillamiento de la hoja de calabaza, asociada a SLCuV y fitoplasmas del grupo III. Se observa el porcentaje de severidad en las áreas de cultivo muestreadas, en dos ciclos de cultivo: P-V primavera-verano, O-I otoño-Invierno 2016.

El nivel de daño ocasionado por la infección mixta en el cultivo de estudio se presenta en la Tabla V. Los parámetros que se consideraron fueron la incidencia de infección mixta asociada a SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII, que se determinó con los resultados positivos obtenidos de los análisis de biología molecular; aplicada a las muestras de plantas de *C. pepo* para la detección de estos patógenos. De ellos, se consideró el número de muestras en las que se observó la presencia de ambos.

Los resultados de severidad, se obtuvieron del promedio de los valores resultantes después de aplicar la fórmula correspondiente, debido a que desde el inicio se observó que las plantas presentaban la sintomatología reportada para ambos fitopatógenos.

Los resultados de prevalencia se determinaron a partir de los datos obtenidos de los dos patógenos, considerando su infección a los hospederos en ambos ciclos de cultivos; mientras que la recurrencia, considerando las tres áreas de estudio y la presencia de la infección mixta en las mismas.

**Tabla V.** Patometría de infección mixta SLCuV y fitoplasmas 16SrIII en *C. pepo*

Fitopatógeno	Incidencia	Severidad	Prevalencia	Recurrencia
SLCuV	82.9	49	100	100
Fitoplasmas 16SrIII	71.8	49	100	100
Infección Mixta	71.8	49	100	100

Como se aprecia en los resultados, la prevalencia y recurrencia de la enfermedad mixta es alta, presentándose en un 100%; la incidencia estuvo por arriba del 70% y la severidad alcanzó un 49%.

Sin duda, las evidencias muestran que es muy posible que se presente la enfermedad en otras áreas agrícolas no incluidas en este estudio y que esta coinfección puede seguir apareciendo en los siguientes ciclos de cultivo.

Considerando que en la zona existen todos los componentes de la triada de la enfermedad, es decir, los patógenos, confirmados en este estudio; el hospedero, en este caso la calabacita, que se distingue por su alta susceptibilidad a las infecciones mencionadas, además de que se tienen reportes de otras cucurbitáceas que han sido afectadas en diferentes regiones del mundo; y la condición climática de la región; son situaciones idóneas para que esta enfermedad se siga produciendo, si no se toman las medidas preventivas pertinentes.

## 8. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se comprobó que existe una coinfección que se presenta en forma natural en la calabacita (*C. pepo*), en la región de La Paz, BCS, México; donde los patógenos involucrados fueron identificados como el virus *Squash leaf curl virus* SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] y el fitoplasma ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’. El begomovirus SLCuV (*Geminiviridae*) es el causante de la enfermedad del enrollamiento de la hoja de calabaza (squash leaf curl disease-SLCD); mientras que ‘*Ca. P. pruni*’ de la enfermedad X de occidente (Western X disease) (Zhao *et al.*, 2009). Ambos padecimientos provocan el amarillamiento, retraso generalizado del crecimiento, deformación de la hoja o reducción de ésta, esterilidad de flores y malformación de frutos (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Bertaccini *et al.*, 2014).

Asimismo, se encontraron los vectores específicos de cada una de las enfermedades: la mosquita blanca (*B. tabaci*), biotipo B, vector de los begomovirus y la chicharrita presunta, *Circullifer* spp. (*Cicadellidae*), vector de fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2006).

La ocurrencia de enfermedades mixtas ocasionadas por un begomovirus y un fitoplasma ha sido reportada en varios cultivos de importancia comercial como chile, tomate (Lebsky *et al.*, 2011; Swamalatha y Reddy, 2014) y soya (Kumar *et al.*, 2014). Sin embargo, SLCuV y ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ 16SrIII no han sido detectados coinfectando a plantas de *C. pepo* ni a ningún otro hospedero.

### 8.1 Identificación y caracterización molecular de begomovirus y fitoplasmas coinfectando *Cucurbita pepo* en BCS

#### 8.1.1 *Squash leaf curl virus* (SLCuV)

Con los datos aquí obtenidos, se muestra el éxito en la caracterización molecular del genoma completo de SLCuV aislado de plantas de calabaza, a partir de técnicas moleculares como círculo rodante y PCR; utilizando cebadores específicos para el genoma A y B (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Lapidot *et al.*, 2014).

Los análisis de electroforesis de los productos de PCR exhibieron las bandas características para el ADN-A y el ADN-B de 2638 pb y 2607 pb, confirmando la amplificación completa del virus. La obtención de los fragmentos de digestión analizados con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *XbaI*, así como la secuenciación de ADN, corroboraron la clonación exitosa de la longitud de los genomas de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]. Los exámenes de secuencia del SLCuV completo presentan un arreglo típico de los marcos de lectura abiertos, como los demás aislados de SLCuV, por lo que estos resultados son consistentes con los obtenidos por Ali-Shtayeh *et al.* (2014a, Lazarowitz (1991) y Sobh *et al.* (2012).

Los alineamientos entre la secuencia del genoma A de SLCuV-[MX:La Paz:17] con otros genomas de SLCuV disponibles en GenBank, y además enlistados dentro de los aislados de begomovirus de ICTV, mostraron mayor similitud (97.2 a 99.1%) con los SLCuV reportados en Líbano, Jordania, Egipto, Palestina, Israel y USA. Los datos de estos análisis demuestran que el virus aislado, identificado y caracterizado en este trabajo de investigación son consistentes con los criterios para la identificación de nuevas especies o variantes de un mismo virus; basados en los porcentajes de identidad del genoma A completo, de acuerdo a los criterios de ICTV; donde identidad para especie deberá ser  $\geq 91\%$  y  $< 94\%$  para establecer variantes. Pero, la última clasificación taxonómica reconocida es la especie (Brown *et al.*, 2015).

Estos criterios y los resultados obtenidos en esta investigación indican que el begomovirus aislado de La Paz pertenece a la especie *Squash leaf curl virus*, con acrónimo SLCuV y no se establece como variante nueva; aunque de acuerdo al aislado, su nomenclatura quedaría como SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17], donde los corchetes demarcan que el aislamiento pertenece a la región de La Paz, BCS, México y que se aisló en 2017.

De acuerdo a la secuencia nucleotídica, los análisis de parentesco indican que los porcentajes de identidad más altos son con el aislado de Líbano, el Jordán, Egipto, Palestina e Israel (98.8 al 99.1%); seguidos de los del grupo de USA, aislados en Arizona y California, con una identidad del 97.2 al 98.2%. La caracterización genética comprobó



que, al igual que otros begomovirus, el SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] tiene los cinco marcos de lectura abiertos del genoma A y los dos marcos de lectura abiertos del componente B, que corresponden a la misma codificación reportada en otros SLCuV (Ahmad *et al.*, 2013; Sobh *et al.*, 2012).

Por otro lado, el tamaño y posición de los genes que componen al genoma A fue similar a lo reportado por Ali-Shtayeh *et al.* (2014a). En el genoma B se observó que la organización y tamaño de los genes es consistente con lo reportado por Sobh *et al.* (2012).

Asimismo, el análisis de los ORFs contenidos en el ADN-A de SLCuV mostró que éstos comparten mayor identidad con los squash aislados en Líbano, Egipto, Jordán, Palestina e Israel, que con los aislados en Arizona y California. La mayor similitud se observó en el ORF AC3, que compartió el 100% de identidad con los aislados de Egipto y Líbano. No obstante, la menor identidad se registró entre el ORF AV1 y el aislado en Arizona; confirmando el mismo patrón de los otros análisis, que indican que el genoma de este virus es más cercano a los aislados en el Medio Oriente. El ORF BV1 compartió mayor identidad con el SLCuV de Líbano que con el aislado en Arizona (99.9% y 96.4%, respectivamente); ORF BC1 de 99.2% con el squash de Líbano, y entre 98.8 y 98.5% con los aislados de USA. Como se aprecia, en ambos genomas la mayor similitud fue con el aislado de Líbano y en general con los del Medio Oriente; mientras que tuvo una menor relación con los de Arizona y California.

A pesar del tiempo transcurrido desde la caracterización del agente causal de la enfermedad del rizado de la hoja realizada por Lazarowitz (1991), se ve que existe poca variación genética entre las variantes del SLCuV del Nuevo Mundo, ya que se conservan los marcos de lectura. Esta poca variabilidad genética puede significar que las condiciones para que la infección se desarrolle están presentes en ambos continentes y no ha habido necesidad de mutaciones significativas.

### 8.1.2 ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’

Para la identificación y caracterización de fitoplasmas se utilizó el mismo ADN con el que se hicieron los análisis de SLCuV. Los estudios de PCR primaria y anidada con cebadores universales (Smart *et al.*, 1996; Gundersen y Lee, 1996), RFLP y alineamiento múltiple indicaron que el fitoplasma detectado en La Paz, BCS, México, en calabacita *C. pepo*, fue ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ del grupo 16SrIII; reconocido como el agente causal de la enfermedad X.

Es importante mencionar que, históricamente, la identificación de fitoplasmas ha presentado dificultades por la cantidad de falsos positivos, debido a su alta homología con otras bacterias como *Bacillus*, presentes en las muestras (De Souza *et al.*, 2014).

En este estudio se obtuvo una secuencia parcial perteneciente a un fitoplasma, debido a su alineamiento y presencia de la “firma” ‘CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT’ para estos patógenos, de acuerdo a los criterios establecidos (IRPCM, 2004); mismo que fue identificado con un fitoplasma del grupo 16SrIII.

Dicho grupo ha sido reportado en diferentes regiones del mundo y en ambos hemisferios, como en Lituania (Staniulis *et al.*, 2000), Rusia (Girsova *et al.*, 2017), Canadá (Arocha *et al.*, 2016) y Brasil (Melo *et al.*, 2009; Montano *et al.*, 2000; 2007); incluidas regiones de México como Tlaxcala (Rojas-Martínez *et al.*, 2009) y Baja California Sur (Lebsky *et al.*, 2011).

Weintraub y Beanland (2006) reportaron que el insecto *Circulifer* spp. es transmisor de fitoplasma del grupo 16SrIII, el cual fue detectado en las chicharritas recolectadas dentro de esta investigación; confirmando a estos insectos como vectores en los cultivos de calabaza de la región.

## 8.2 Filogenia de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] y ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ (16SrIII)

### 8.2.1 Análisis filogenético de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17]

De acuerdo a su componente A, el análisis filogenético de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] (Fig. 15) muestra la misma agrupación que la observada en el examen de identidad; donde el aislamiento de La Paz se encuentra entre dos grupos bien definidos dentro del clado SLCuV: uno es el clado del Medio Oriente, en el cual se agrupan varios aislamientos del SLCuV como Líbano, Jordán, Egipto, Palestina e Israel (Abudy *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2013; Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a; Idris *et al.*, 2006; Sobh *et al.*, 2012;); el otro, se forma con los SLCuV de USA (Brown *et al.*, 2005b; Lazarowitz *et al.*, 1991).

Cuando se compara el SLCuV de La Paz con otros begomovirus detectados en calabaza y otras cucurbitáceas, se obtiene una separación filogenética clara, en la que se observa que la identidad nucleotídica va disminuyendo. Más, al comparar con otros squash que afectan a la calabacita (Tabla II), encontramos que la distancia filogenética coincide con la separación geográfica entre los virus del hemisferio oriental y occidental.

Es interesante que al hacer la comparación del árbol filogenético con otros begomovirus detectados en la región, como PepGMV y ToChLPV (Holguín-Peña *et al.*, 2003), se observa una separación filogenética menor en relación con otros del clado SLCuV o de algunos reportados en calabacita y/u otras cucurbitáceas. Se observa una menor similitud con el TYLCV detectado también en BCS (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010) y con WmCSV reportado en Palestina (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014b). El aislado de SLCuV de la Paz, se sub-agrupó con los del Medio Oriente dentro del conjunto de las variantes de este begomovirus, considerando que tiene una participación estrecha en la introducción de este virus en el Viejo Mundo.

Por su parte, la filogenia del genoma B presenta el mismo patrón que el genoma A, al agruparse con el SLCuV aislado en Líbano; mostrando una clara separación con los genomas de SLCuV aislados en USA. Con otros begomovirus que afectan cucurbitáceas y otros cultivos, como el MCLCuV o CuLCuV, aislados en Guatemala y USA,

respectivamente, exhibió mayor similitud que con el BCaMV reportado en México o con MCIMV aislado en Venezuela. A pesar de ello, la mayor distancia evolutiva se observó con los begomovirus BGYMV, CabLCV y PepGMV aislados en Centroamérica y USA.

### 8.2.2 Análisis filogenético del ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ grupo 16SrIII

El análisis filogenético (Fig. 17) nos revela una separación bien definida en seis clados principales, donde el aislamiento de La Paz de ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ se agrupa con los fitoplasmas del grupo 16SrIII. Se manifestaron tres brazos que corresponden a los sub-grupos. En uno de ellos se observa el sub-grupo C, con el sub-grupo P; en otro sub-clado, la secuencia obtenida que se concentra con los subgrupos M, N, D, F, J, R, U y A una distancia genética más distante, se observó una rama separada dentro del grupo 16SrIII, donde se concentran algunos miembros de los sub-grupos B, K, A, S, H, L, E, G e I.

Otros grupos cercanos filogenéticamente entre los utilizados para este estudio son el 16SrII y XV, con sus respectivos subgrupos; seguidos de los grupos 16Sr IX. En ese mismo clado se concentran los grupos XIX y XXI, XI y XIV, VIII y XXII; así como el V, VI, VII y 16Sr IV, este último asociado al amarillamiento letal presente en México e Islas del Caribe que ha afectado palmeras.

En un clado separado se concentran los miembros del grupo XXVI y XXVII, con los que se observa una clara distancia evolutiva con la secuencia aquí obtenida. El fitoplasma identificado del grupo 16SrIII, se ha reportado dentro de la región en plantas hospederas de *C. annuum* y *C. roseus* (Lebsky *et al.*, 2011; Poghosyan *et al.*, 2015b). En este estudio se identificaron fitoplasmas del grupo 16SrIII en los cultivos de *Cucurbita pepo*, similares a los descritos en Brasil por Melo *et al.* (2009), quienes reportaron fitoplasmas de este mismo grupo afectando plantas de *C. pepo* de cultivo comercial. Los resultados indican que este cultivo es un hospedero potencial de dicha bacteria.

### 8.3 Los insectos vectores que contribuyen en la coinfección de *C. pepo* en BCS

#### 8.3.1 Las mosquitas blancas, vectores de begomovirus

Adicional a la caracterización de la enfermedad, se confirmó que el vector del SLCuV en la región es la mosca blanca *B. tabaci* biotipo B. Los análisis por alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del fragmento del gen mtCOI, obtenido de dicho insecto, compartió alta identidad con el aislado reportado en China por Zhang *et al.* (2005), en su estudio de diversidad genética entre 27 poblaciones geográficas diferentes de biotipos de *B. tabaci*; esto fue lo esperado, considerando que se trata de un vector cosmopolita. No se encontró el biotipo Q y tampoco se logró la amplificación con cebadores dirigidos a especies consideradas del Nuevo Mundo.

En los estudios comparativos de secuencias nucleotídicas se obtuvieron las identidades más altas con los biotipos B, reportados en la República Centroafricana; donde se observaron niveles de infestación similares (~17 adultos/planta) y alta prevalencia de una enfermedad begomoviral (Tocko-Marabena *et al.*, 2017). Es importante mencionar que también se registró una alta identidad con una secuencia reportada en cultivos comerciales de noche buena (*Euphorbia pulcherrima* W.) en Ontario, Canadá, reafirmando su capacidad cosmopolita.

Sánchez-Campos *et al.* (1999) refieren que los biotipos B y Q son los más predominantes y perjudiciales; el primero definido por parámetros de alta aptitud y el segundo por ser más eficiente en la transmisión de begomovirus. El biotipo B ya había sido previamente reportado en la región en una diversidad de hospederos nativos y/o plantas silvestres que tienen un importante papel en los agrosistemas de la región (Servín-Villegas *et al.*, 2006). Su papel, así como el de la mosquita de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum* W.) y los biotipos nativos (A), se relaciona con la dispersión de las enfermedades begomovirales en la región y establecen la relación entre el hospedero (tomate), el begomovirus (ToChLPV) y el insecto vector (Holguín-Peña *et al.*, 2010).

Debido a la capacidad polífaga y adaptativa del biotipo B, la posibilidad de reservorios del SLCuV en la región es grande; en adición, este biotipo puede trasladarse largas distancias.

### 8.3.2 Las chicharritas vectores de fitoplasmas

En los análisis efectuados para identificar al vector de fitoplasmas, se supo de manera preliminar que pertenece a una chicharrita del género *Circulifer*, coincidiendo con lo reportado como insecto-vector (Weintraub *et al.*, 2004). En el estudio se comprobó por técnicas moleculares la presencia del fitoplasma en el insecto, consistente con lo documentado en otros estudios que han determinado que dichos insectos se infectaron con fitoplasma con un promedio de entre 9.2, 20.8 y 34.8% (Munyanza *et al.*, 2010).

A su vez, se ha registrado que el género *Circulifer* es vector de un gran número de fitoplasmas y se distribuye desde Norteamérica, África y Medio Oriente (Lee *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1993; Weintraub *et al.*, 2004). Este género también se ha reportado afín con la enfermedad de la punta morada en plantas de papa, en Columbia, USA (Munyanza *et al.*, 2010), y relacionado como vector del fitoplasma Tomato big bug del grupo 16SrVI-A, del Curtovirus *Beet mild curly top virus* (BCTV) (Soto *et al.*, 2005).

Por su papel como vectores de virus y fitoplasmas, se ha incrementado el monitoreo de chicharritas, lo que ha permitido que en regiones del norte y centro de México se haya confirmado la presencia de *Circulifer tenellus* y de otros nueve géneros (Velásquez-Valle *et al.*, 2017). Las evidencias de investigaciones hechas en esa zona muestran que 13% de *C. tenellus* es portador de fitoplasmas y que la especie está presente todo el año (Abrajan-del Rio *et al.*, 2014). Considerando su distribución y los reportes previos, existe una alta posibilidad de que esté participando como insecto vector en la región.

No obstante, hay un gran número de reportes sobre insectos vectores relacionados con ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’, entre los que destacan algunas especies reportadas en Norteamérica, como: *Acinopterus angulatus* Lawson (Purcell, 1979), *Scaphytopius acutus* Say., *Colladonus clitellarius* S., *Paraphlepsius orroratus* S., *Gyponana lamina*, *Norvellina*

*semidesnuda* S. y *Fiebertiella florii* Stal, con lo que se muestra que este fitoplasma tiene una amplia gama de transmisores (Lee *et al.*, 1998; McClure, 1980).

#### **8.4 SLCuV y el fitoplasma del grupo 16SrIII en coinfección en el hospedero**

##### ***Cucurbita pepo***

##### **8.4.1 *Squash leaf curl virus* (SLCuV), un begomovirus prevalente del Nuevo Mundo y migratorio del Viejo Mundo**

Este virus bipartita fue documentado por primera vez (Flock y Mayhew, 1981) en California como el causante de la enfermedad del enrollamiento de la hoja de la calabacita (SLCD, en inglés squash leaf curl disease) y otras cucurbitáceas. Sin embargo, no fue sino hasta 1983 que SLCuV fue reportado en Imperial Valley, USA, como el agente causal de la enfermedad (Cohen *et al.*, 1983).

En la actualidad, el SLCuV se encuentra en la mayoría de los continentes, aunque su naturaleza aún no es considerada como un virus cosmopolita, ya que no se ha encontrado en Oceanía. Sin embargo, SLCuV es un microorganismo enlistado en EPPO, lo que implica que es un patógeno con gran potencial de dispersión debido a la relación específica que tiene con su vector, la mosquita blanca; la cual se vuelve más compleja al haber varios biotipos involucrados. Los síntomas ocasionados por este virus pueden ser diversos, desde un severo enrollamiento de la hoja, moteado, malformación o mosaico, hasta el retraso de crecimiento. A pesar de que las señales registradas en esta investigación corresponden a las observadas en otras, se ha documentado que algunos de los síntomas ocasionados por SLCuV difieren con respecto a su hospedero y puede ser miembro de alguna de las principales familias productoras de alimentos, como son: *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae* y/o *Brassicaceae* (Anfoka *et al.*, 2017; Farrag *et al.*, 2014a, b; Singh *et al.*, 2008; ); o en ciertas familias como *Malvaceae* y *Chenopodiaceae*, donde se encuentran algunas de las malezas más frecuentes en estos cultivos (Farrag *et al.*, 2014a).

En México, el SLCuV ha sido reportado en calabazas de Sonora (Flock y Mayhew, 1981), tomate en Sinaloa (Lugo *et al.*, 2011), y en el estado de Guerrero se encontró un fragmento de la secuencia del genoma A, únicamente documentado en GenBank.

En las últimas décadas se ha visto la importancia de la caracterización de las coinfecciones que se presentan en un sistema agroecológico, como es el caso del estado de BCS, en donde la mayoría de los productos agrícolas son de exportación para el mercado americano (SIAP, 2016). En este sentido, la presencia de enfermedades con infecciones begomovirales por fitoplasmas y/o mixtas ha sido previamente estudiada. Por ejemplo, en 2004 se hace alusión a una infección ocasionada por PepGMV y otros begomovirus no caracterizados en plantas de tomate (Holguín-Peña *et al.*, 2003); así como hospederos alternos como plantas de toloache (*Datura discolor* B.), manzanita del Perú (*Nicandra physaloides* L.) y tabaquillo silvestre (*Nicotiana glauca* G.). Después, en la misma región, se identificaron los begomovirus ToChLPV en tomate (Holguín-Peña *et al.*, 2004) y TYLCV en chile (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010).

En relación con lo descrito en los cultivos de la región como hospederos, este trabajo representa el primer reporte de un begomovirus en calabacita en las zonas agrícolas comerciales de la entidad.

#### **8.4.2 ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ del grupo 16SrIII tiene múltiples hospederos**

‘*Ca. Phytoplasma pruni*’, ubicado taxonómicamente dentro del grupo 16SrIII, se reporta por primera vez en USA como la enfermedad X del melocotón (Stoddard *et al.*, 1951); pero hasta los 70 es atribuido a fitoplasmas gracias a la técnica de microscopía electrónica (Nasu *et al.*, 1970). Su reconocimiento como grupo sería hasta 1992, por Lee *et al.* (1992)

En México, ‘*Ca. P. pruni*’ se detecta por primera vez en Tlaxcala en plantas de amaranto y con síntomas descritos como escoba de brujas (Rojas-Martínez *et al.*, 2009). Este mismo grupo se ubica en BCS, donde provoca síntomas de clorosis y malformaciones foliares en chile (*Capsicum annuum*) (Lebsky *et al.*, 2011).

En el caso de este trabajo, el amarillamiento, proliferación de brotes axilares, retraso del crecimiento, declinamiento general, esterilidad de flores, malformación de la parte aérea y deformidad de hojas fueron de acuerdo a lo reportado (Bertaccini *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2009; Streten *et al.*, 2005). Los problemas relacionados con la escoba de brujas (brotes axilares y elongación anormal), presente en otras cucurbitáceas como la esponja



vegetal (*L. cylindrica*), en Brasil (Montano *et al.*, 2007), y asociados también al fitoplasma del grupo 16SrI-B en plantas de *C. pepo* en la India (Rao *et al.*, 2017); no fueron observados en este estudio.

Otro síntoma asociado a fitoplasmas especialmente del grupo 16SrII es la filodia, presente en plantas de calabaza y pepino, (Salehi *et al.*, 2015), el cual tampoco se registró en esta investigación.

El origen de estas malformaciones, asociadas a fitoplasmas como son la proliferación de brotes y hojas pequeñas, se deben a interferencias en el metabolismo de la planta; provocando un desbalance hormonal que se traduce en las extremas malformaciones observadas en las infecciones asociadas a estos fitopatógenos (Lee *et al.*, 2000).

Los fitoplasmas encontrados en la región pertenecen a los grupos 16SrI-B y 16SrXIII, que son causantes del amarillamiento en plantas de tomate (Holguín-Peña *et al.*, 2007). El grupo 16SrIII se ha reportado afectando a plantas de chile (Lebsky *et al.*, 2011). En plantas de teresita (*C. roseus*) que presentaron amarillamiento, virescencia, filodia y proliferación de brotes, se constató la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrI-B y 16SrIII (Poghosyan *et al.*, 2015); mientras que en naranjo enano (*Citrus japonica*), se confirmó la aparición de ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ grupo 16SrI-B (Poghosyan *et al.*, 2015a).

Con relación a las enfermedades mixtas, éstas han sido previamente detectadas en la región, como las que ocasionaron fitoplasmas y begomovirus TYLCV/PepGMV en tomate; además de la asociada a TYLCV y ToChLPV con fitoplasmas del grupo 16SrIII (enfermedad X) en plantas de chile (Lebsky *et al.*, 2011).

### **8.5 SLCuV y ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ asociados en la infección mixta**

Los síntomas causados por estos dos fitopatógenos por separado pueden ser relativamente sencillos de reconocer, como se menciona anteriormente. A pesar de ello, es más difícil realizar en una infección la caracterización y los estudios de campo de la naturaleza de la enfermedad, ya que pueden existir modificaciones en los síntomas como conjunto y ser

atribuidos a diversos factores como el nivel de concentración de cada patógeno en la planta (Sufrin-Ringwald y Lapidot, 2011); ser resultado de interacciones que inhiben el transporte de moléculas relativas al metabolismo, como está reportado para fitoplasmas (Catlin *et al.*, 1975); posibles sinergismos y/o antagonismos (Rentería-Canett, 2004); factores climáticos (Flock y Mayhew, 1981); o aspectos relacionados con la presencia de los insectos vectores (Velásquez-Valle *et al.*, 2017).

Algunos de los síntomas en la infección mixta observada en este estudio (Figs. 6 y 20C, D) fueron: hojas pequeñas, amarillamiento de las venas, enrollamiento de la hoja hacia arriba, deformación de frutos, elongación anormal de tallos y peciolo de la hoja reducidos que tienden a agruparse.

De acuerdo a los resultados de la presente investigación, el fitoplasma ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ 16SrIII, en cultivo de calabacita, en infección mixta con el begomovirus SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17], se establece como el primer reporte en la región; la infección mixta entre estos dos agentes causales es el primero en México y en el mundo.

### **8.6 Estimación del daño y dispersión de la enfermedad mixta**

Los análisis de patometría son importantes ya que nos permiten estimar el daño de la enfermedad. Normalmente, estos valores de estimación están dados para cada patógeno en particular, por lo que establecerlos en una infección mixta resulta multifactorial y complejo de extrapolar; entre los factores se tiene: I) Los síntomas están combinados en una misma planta; II) Los insectos vectores que transmiten la enfermedad son diferentes, y III) La biología de los agentes causales es diferente (Gundersen y Lee, 1996; Lapidot *et al.*, 2014).

Los factores que favorecen las coinfecciones, como son la intervención humana y el cambio climático, se han reflejado en diversas partes del mundo (Kumar, 2014; Swarnalatha y Reddy, 2014; Zamora, 2014) y en la región (Lebsky *et al.*, 2011). Los parámetros que consideramos para este estudio van en relación con la recurrencia (aparición de la enfermedad en más de un ciclo de cultivo), la prevalencia (la diseminación de la enfermedad en varias localidades dentro de una región), la incidencia (aumento y/o

disminución de la enfermedad en el tiempo), la severidad (nivel de daño) y la infestación (número de insectos/planta).

La detección de la infección mixta en sus componentes begomovirus y fitoplasmas fue positiva en todas las localidades observadas, con una recurrencia y prevalencia de 100%. Los niveles de incidencia de la infección mixta con valores de entre 70 y 75.5%, se considera alta (Swarnalatha y Reddy, 2014). La severidad observada de 42 y 56% fue similar en todas las localidades evaluadas.

La ocurrencia de la infección mixta ocasionada por patógenos relacionados ha sido reportada en la India y México en soya y solanáceas (Lebsky *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014). En estudios realizados con infecciones mixtas donde se ha separado la incidencia con begomovirus y fitoplasmas, se han reportado incidencias de 28-74% (begomovirus) y 8-14% (fitoplasma) (Swarnalatha y Reddy, 2014). La proporción encontrada en esta investigación fue más elevada, con valores de 74-98% (begomovirus) y 70-76% (fitoplasma).

La proporción de begomovirus/fitoplasma también es una parte importante en la epidemiología de la enfermedad, ya que nos permite conocer el potencial de dispersión y relacionarlo también con la proporción de insectos vectores infectivos en la población (Munyaneza *et al.*, 2010).

Los datos aquí obtenidos son consistentes con lo reportado por Zamora (2014), quien reporta infección mixta ocasionada por el begomovirus *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) y el ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ grupo 16SrI-B en plantas de frijol, con problemas de mosaico, reducción de tamaño de las hojas y el amarillamiento. En 11% estaba presente únicamente el fitoplasma, en 18% sólo el begomovirus y 45% correspondió a la infección mixta con la presencia de ambos patógenos.

La proporción encontrada en este estudio fue más homogénea, ya que los dos patógenos se encontraron mezclados en una proporción arriba de 70% (Tablas III y IV). En la estimación de la severidad de la infección mixta, se obtuvieron valores de severidad del

42 al 56%. Este tipo de valores, en una infección mixta de begomovirus, es normalmente más alto que los observados en infecciones simples. Pese a la falta de documentación del índice de severidad de infecciones mixtas ocasionadas por estos dos patógenos, los reportes coinciden en que la sintomatología es mucho más severa que en la infección individual, y las plantas presentan los síntomas de ambos. Por ejemplo, se ha reportado que las plantas de tomate afectadas con el begomovirus ToLCNDV y big bud fitoplasmas presentan sintomatología de enrollamiento de la hoja y alta proliferación y engrosamiento de brotes (Swarnalatha y Reddy, 2014).

La correlación entre dos patógenos begomovirales es conocida (Rentería-Canett *et al.*, 2011), pero el sistema begomovirus/fitoplasma ha sido poco estudiado. Se conoce que los genes involucrados en la expresión de síntomas en el sinergismo de los begomovirus, se da a través de la codificación de las proteínas Rep, TrAp y CP (Rentería-Canett, 2004). No obstante, los fitoplasmas contienen ADN extra cromosómico (plásmido pOYW1) con un MLA que es homólogo a la Rep de los geminivirus. De acuerdo a esto, es similar el sistema de círculo rodante que utilizan como mecanismo de replicación, aunque no hay estudios que demuestren que los fitoplasmas utilicen esta proteína como parte de un mecanismo para la inducción de síntomas (Kuboyama *et al.*, 1998; Nishigawa *et al.*, 2001).

### **8.7 Estatus fitosanitario de la enfermedad mixta**

El estatus fitosanitario está enfocado en el conocimiento biológico de los agentes fitopatógenos que ocasionan las enfermedades. Otros componentes importantes son el conocimiento de los aspectos epidemiológicos, ecológicos, genéticos y regulatorios. Con todo, el primer paso para procesar e integrar toda esta información es el conocimiento del agente causal.

En este trabajo se identificaron y caracterizaron biológica y genéticamente dos agentes causales que están involucrados en una infección mixta. La generación de conocimiento, sin duda, es el primer paso para el establecimiento de medidas fitosanitarias para controlar su dispersión.

Este es el primer reporte de una infección mixta en *C. pepo* ocasionada por el begomovirus SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII en el cultivo de la calabacita. Los datos aquí presentados confirman también el importante papel que juegan los insectos vectores en la dispersión de la enfermedad. La estimación del daño de esta enfermedad es de consideración, pues se observaron altos valores en la incidencia y severidad, con una tendencia a ser persistentes a través de los años y, eventualmente, ocasionar importantes pérdidas económicas.

La presente investigación contribuye principalmente a la generación del conocimiento con la identificación, caracterización y filogenia de dos agentes patógenos que coinfectan al cultivo de la calabacita en BCS.

## 9. CONCLUSIONES

- Se confirmó infección mixta en cultivos de calabacita en BCS, asociada a SLCuV y fitoplasmas del grupo 16srIII.
- Se confirmó la presencia de *Bemisia tabaci* biotipo B como vector de SLCuV. En los análisis no se encontró el biotipo Q.
- Se realizó la caracterización molecular de SLCuV. Se encontró que la organización genómica del ADN-A y B, tamaño y posición de los genes fue similar a lo reportado.
- Se detectó e identificó el fitoplasma '*Ca. Phytoplasma pruni*' que pertenece al grupo 16SrIII en cultivos de calabacita.
- Los niveles de daño son altos, y la patometría de infección es recurrente en espacio y tiempo de un ciclo a otro, con diferentes niveles.
- El efecto de los síntomas observados en las plantas de *C. pepo* corresponden a ambos patógenos SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII.
- Es posible que la infección del SLCuV y fitoplasmas del grupo 16SrIII estén causando una interacción de sinergismo aditivo, que está provocando un mayor y nocivo efecto en el hospedero, acentuando el grado de afectación de la enfermedad.

## Perspectivas

- En adición a estos estudios, es necesario realizar más trabajos para el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad, sobre todo que incluyan: I) Estudios relacionados con la interacción y el sinergismo; II) Estudios sobre plantas hospederas alternas del virus y del vector, y III) Conocimiento de la biología de los insectos vectores. Todos estos factores son necesarios para extender el conocimiento relacionado con la planta/insecto/agente causal.
- Es conveniente el análisis de muestras infectadas *in-vitro* con el virus y fitoplasma identificados para atribuir con mayor certeza los síntomas ocasionados por cada patógeno.
- Dilucidar el papel del vector en la dispersión de la enfermedad.
- Dilucidar el rol del vector en la infección con fitoplasmas.
- Entender los mecanismos de interacción entre patógenos de distinta taxa.
- Con el material genético que se deja en el Laboratorio de Fitopatología, es posible que futuros estudiantes desarrollen investigaciones que aporten más información sobre sinergismo, recombinación y antagonismo.
- Con los resultados de esta investigación, y apoyándose en fito-ómicas, se podrá comprender más, en investigaciones posteriores, sobre la interacción en infecciones mixtas en este modelo.
- En el área de cultivo muestreada en El Carrizal y Los Planes, los agricultores retiraron las plantas antes de tiempo por la afectación provocada por los patógenos. En ambos casos representó pérdidas económicas que no son debidamente registradas y/o cuantificadas. Es recomendable el registro de los daños y la atribución al patógeno que los ocasiona, para establecer un precedente de la afectación de dichos patógenos, tanto por los agricultores como por la autoridad competente; así como las medidas de prevención pertinentes para los siguientes ciclos de cultivo, y prevenir posibles epifitias. Lo anterior, considerando que en otras regiones el SLCuV está catalogado como plaga cuarentenada (EPPO).

## 10. LITERATURA CITADA

- Abouzid, A. M., E. Hiebert, J. O. Strandberg. 1992. Cloning, identification, and partial sequencing of the genomic components of a geminivirus infecting the *Brassicaceae*. *Phytopathology*, 82(1070): 2320-2325.
- Abrajan-del Rio, X., L. R. Reveles-Torres, R. Velásquez-Valle, M. Reveles-Hernández, N. Á. Cid-Rios. 2014. Presencia de Fitoplasmas en El Cicadélido *Circullifer tenellus* en el Estado de Zacatecas, México. *Agrofaz*, 14(3): 19-23.
- Abudy, A., T. Sufrin-Ringwald, C. Dayan-Glick, D. Guenoune-Gelbart, O. Livneh, M. Zaccai, M. Lapidot. 2010. Watermelon chlorotic stunt and Squash leaf curl begomoviruses—New threats to cucurbit crops in the Middle East. *Israel Journal of Plant Sciences*, 58(1): 33-42.
- Akhtar, K. P., M. Dickinson, M. J. Asghar, G. Abbas, N. Sarwar. 2016. Association of 16SrII-C phytoplasma with lentil phyllody disease in Pakistan. *Tropical Plant Pathology*, 41(3): 198-202.
- Ala-Poikela, M., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, J. P. T. Valkonen, A. Kvarnheden. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54:448-459.
- Alarcón-Rodríguez, N. M., H. Lozoya-Saldaña, E. Valadez-Moctezuma. 2009. Caracterización de clones de papa e identificación de fitoplasmas asociados al síndrome de la punta morada. *Agrociencia* 43: 357-370.
- Ali-Shtayeh, M. S., R. M. Jamous, E. Y. Husein, M. Y. Alkhader. 2010. First report of *Squash leaf curl virus* in squash (*Cucurbita pepo*), melon (*Cucumis melo*), and cucumber (*Cucumis sativa*) in the northern West Bank of the Palestinian Authority. *Plant Disease*, 94(5): 640-640.
- Ali-Shtayeh, M. S., R. M. Jamous, E. Y. Hussein, O. B. Mallah, S. Y. Abu-Zeitoun. 2014(a). *Squash leaf curl virus* (SLCV): a serious disease threatening cucurbits production in Palestine. *Virus Genes*, 48(2): 320-328.
- Ali-Shtayeh, M. S., R. M. Jamous, O. B. Mallah, S. Y. Abu-Zeitoun. 2014(b). Molecular Characterization of *Watermelon Chlorotic Stunt Virus* (WmCSV) from Palestine. *Viruses*, 6(6): 2444-2462.
- Al-Musa, A., G. Anfoka, S. Misbeh, M. Abhary, F. H. Ahmad. 2008. Detection and molecular characterization of *Squash leaf curl virus* (SLCV) in Jordan. *Journal of Phytopathology*, 156(5): 311-316.
- Ahmad, F. H., W. Odeh, G. Anfoka. 2013. First Report on the Association of *Squash leaf curl virus* and *Watermelon chlorotic stunt virus* with Tomato Yellow Leaf Curl Disease. *Plant Disease*, 97(3): 428-428.

- Anaya-López J. L., Y. Godínez-Hernández, C. I. Muñoz-Sánchez, L. Guevara-Olvera, R. G. Guevara-González, R. F. Rivera-Bustamante, M. M. González-Chavira, I. Torres-Pacheco. 2003. Identificación de resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y el virus huasteco del chile en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) Revista Chapingo Serie Horticultura 9(2): 225-234, 2003.
- Anfoka, G., M. Altaieb, H. F. Ahmad, A. M. Obaida. 2017. Charlock mustard (*Sinapis arvensis*): a weed reservoir for begomoviruses and associated betasatellite in Jordan. Canadian Journal of Plant Pathology, 39(3): 325-333.
- Antignus, Y., O. Lachman, M. Pearlsman, S. Omer, H. Yunis, Y. Messika, O. Uko, A. Koren. 2003. Squash leaf curl geminivirus – a new illegal immigrant from the western hemisphere and a threat to cucurbit crops in Israel. Phytoparasitica, vol. 31, p. 415.
- Ammar, E. D., S. A. Hogenhout. 2006. Mollicutes associated with arthropods and plants. Insect Symbiosis, 2: 97-118.
- Arocha-Rosete, Y., N. P. Morales-Lizcano, A. Hasan, K. Yoshioka, W. Moeder, R. Michelutti, J. Scott. 2016. First report of the identification of a '*Candidatus* Phytoplasma pruni'-related strain in *Trillium* species in Canada. New Disease Reports, 34: 19-19.
- Bai, X., J. Zhang, A. Ewing, S. A. Miller, A. J. Radek, D. V. Shevchenko, S. A. Hogenhout. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. Journal of Bacteriology, 188(10): 3682-3696.
- Bananej, K., A. Ahoonmanesh, A. Kheyr-Pour. 2002. Host Range of an Iranian Isolate of *Watermelon Chlorotic Stunt Virus* as Determined by Whitefly-mediated Inoculation and Agroinfection, and its Geographical Distribution. Journal of Phytopathology, 150(8-9): 423-430.
- Beanland, L., C. W. Hoy, S. A. Miller, L. R. Nault. 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: *Cicadellidae*). Annals of the Entomological Society of America, 93(2): 271-276.
- Bedendo, I. P., R. E. Davis, E. L. Dally. 2000. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. International Journal of Pest Management, 46(1): 73-76.
- Berry, S. D., V. N. Fondong, C. Rey, D. Rogan, C. M. Fauquet, J. K. Brown. 2004. Molecular evidence for five distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava plants in sub-Saharan Africa. Annals of the Entomological Society of America, 97(4): 852-859.
- Bertaccini, A., B. Duduk, S. Paltrinieri, N. Contaldo. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. American Journal of Plant Sciences, 5(12): 1763.



- Bosco, D., R. D'Amelio, P. G. Weintraub, P. Jones. 2009. Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In: P. G. Weintraub, P. Jones (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Wallingford, pp 293–308.
- Bosco, D., R. Tedeschi. 2013. Insect vector transmission assays. Pages 73-85 in: *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 938. M. Dickinson and J. Hodgetts, ed. Humana Press, London.
- Bové, J. M. 1997. Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wien. Klin. Wochenschr.* 109:604–612.
- Bressan, A., V. Girolami, E. Boudon-Padieu. 2005. Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomol Exp Appl* 115: 283–290.
- Brown, J. K., M. R. Nelson. 1988. Transmission, Host Range and Virus-Vector Relationships of *Chino del Tomate Virus* (CdTV), a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, 72: 866–869.
- Brown JK, Nelson MR (1988) Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Dis* 72: 866–869.
- Brown, J. K., J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease*, 76(3): 220-225.
- Brown, J. K., K. M. Ostrow, A. M. Idris, D. C. Stenger. 1999. Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of bean calico mosaic virus, a distinct Begomovirus species with affiliation in the squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology*, 89(4): 273-280.
- Brown, J. K., A. M. Idris, M. W. Olsen, M. E. Miller, T. Isakeit, J. Anciso. 2000. *Cucurbit leaf curl virus*, a new whitefly transmitted geminivirus in Arizona, Texas, and Mexico. *Plant Disease*, 84(7): 809-809.
- Brown, J. K., A. M. Idris, D. Rogan, M. H. Hussein, M. Palmieri. 2001. *Melon chlorotic leaf curl virus*, a new begomovirus associated with *Bemisia tabaci* infestations in Guatemala. *Plant Disease*, 85(9): 1027-1027.
- Brown, J. K., A. M. Idris, C. Alteri, D. C. Stenger. 2002. Emergence of a new cucurbit-infecting begomovirus species capable of forming viable reassortants with related viruses in the Squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology*, 92(7): 734-742.
- Brown, R. N., J. R. Myers. 2002. A genetic map of squash (*Cucurbita sp.*) with randomly amplified polymorphic DNA markers and morphological markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4): 568-575.

- Brown, J. K., A. M. Idris, K. M. Ostrow, N. Goldberg, R. French, D. C. Stenger. 2005(a). Genetic and phenotypic variation of the *Pepper golden mosaic virus* complex. *Phytopathology*, 95(10): 1217-1224.
- Brown, J., K. Baumann, A. Idris. 2005(b). Characterization of squash leaf curl and squash mild leaf curl viruses: host range and reassortment for four SLCV clade viruses. *Phytopathology*, vol. 95: S14.
- Brown, J. K., J. C. Guerrero, M. Matheron, M. Olsen, A. M. Idris. 2007. Widespread outbreak of cucurbit yellow stunting disorder virus in melon, squash, and watermelon crops in the Sonoran Desert of Arizona and Sonora, Mexico. *Plant Disease* 91(6): 773.
- Brown, J. K., F. M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J. C. Silva, V. G. Malathi. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160(6): 1593-1619.
- Cárdenas-Conejo, Y., G. Arguello-Astorga, A. Poghosyan, J. Hernández-González, V. Lebsky, R. J. Holguín-Peña, S. Vega-Peña. 2010. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* co-infecting pepper with *Tomato chino La Paz virus* in Baja California Sur, México. *Plant Disease*, 94(10): 1266-1266.
- Catlin, P. B., E. A. Olsson, J. A. Beutel. 1975. Reduced translocation of carbon and nitrogen from leaves with symptoms of pear curl. *Journal American Society for Horticultural Science*. 100: 184–187.
- Cohen, S., J. E. Duffus, R. C. Larsen, H. Y. Liu, R. A. Flock. 1983. *Phytopathology* 73: 1669–1673.
- Costa, H. S., J. K. Brown. 1991. Variation in biological characteristics and in esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) and the association of one population with silver leaf symptom development. *Entomología Experimentalis Et Applicata*, 61:211-219.
- Davis, R. E., N. A. Harrison, Y. Zhao, W. Wei, E. L. Dally. 2016. ‘*Candidatus* *Phytoplasma hispanicum*’, a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(9): 3463-3467.
- De Barro, P. J., S. S. Liu, L. M. Boykin, A. B. Dinsdale. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual review of entomology*, 56: 1-19.
- De Souza, A. N., F. N. da Silva, I. P. Bedendo, C. M. Carvalho. 2014. A phytoplasma belonging to a 16SrIII-A subgroup and dsRNA virus associated with cassava frogskin disease in Brazil. *Plant Disease*, 98(6): 771-779.
- Deying, M., K. Gorman, G. Devine, W. Luo, I. Denholm. 2006. The biotype and insecticide-resistance status of whiteflies, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*),

invading cropping systems in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Northwestern China. *Crop Protection* 26: 612-617.

Dickinson, M., M. Tuffen, J. Hodgetts. 2013. The phytoplasmas: an introduction. *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_1, © Springer Science+Business Media, LLC.

Dodds, J. A., J. G. Lee, S. T. Nameth, F. F. Laemmlein. 1984. Aphid and whitefly-transmitted cucurbit viruses in Imperial County, California. *Phytopathology*, 74(2): 221-225.

Doi, Y., M. Teranaka, K. Yora, H. Asuyama. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Japanese Journal of Phytopathology*, 33(4): 259-266.

Domínguez-Durán, G., E. A. Rodríguez-Negrete, J. J. Morales-Aguilar, E. Camacho-Beltrán, J. L. Romero-Romero, M. A. Rivera-Acosta, J. Méndez-Lozano. 2017. Molecular and biological characterization of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV): An Eastern Hemisphere begomovirus introduced in the Western Hemisphere. *Crop Protection*, 103: 51-55.

El-DougDoug, K. A., H. A. El-Kader, I. A. Hamad, E. A. Ahmed, A. A. El-Monem. 2009. Identification of *squash leaf curl virus* (Egyptian isolate). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3470-3478.

Farag, A. G., M. A. Amer, H. A. Amin, H. M. Mayzad. 2005. Detection of bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease in Egypt using polymerase chain reaction and nucleotide sequence. *Egyptian Journal of Virology*, 2: 239-253.

Farrag, A. A., A. K. El-Attar, O. H. M. El-Banna, I. AI, H. M. Mazyad. 2014(a). Molecular and Biological Characterization of *Squash Leaf Curl Virus* (SLCV) Affecting Common Beans in Egypt. *Egyptian J. Virol*, 11(2): 14-27.

Farrag, A. A., A. K. El-Attar, O. H. M. El-Banna, I. AI, H. M. Mazyad. 2014(b). Squash leaf curl virus SLCV incidence and severity on *Phaseolus Vulgars* in Egypt. *Egyptian J. Virol*, 11(2): 112-123.

Ferro, C. G., J. P. Silva, C. A. D. Xavier, M. T. Godinho, A. T. M. Lima, T. B. Mar, F. M. Zerbini. 2017. The ever increasing diversity of begomoviruses infecting non-cultivated hosts: new species from *Sida* spp. and *Leonurus sibiricus*, plus two New World alphasatellites. *Annals of Applied Biology*, 170(2): 204-218.

Firrao, G., M. Andersen, A. Bertaccini, E. Boudon, J. M. Bove, X. Daire, D. E. Gundersen-Rindal. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1243-1255.

- Flock, R. A., D. E. Mayhew. 1981. Squash leaf curl, a new disease of cucurbits in California. *Plant Dis.* 65(1):75-76.
- Ghanim, M., S. Morin, M. Zeidan, H. Czosnek. 1998. Evidence for Transovarial Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by Its Vector, the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*, 240(2): 295-303.
- Ghanim, M., I. Sobol, M. Ghanim, H. Czosnek. 2007. Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes. *Arthropod-Plant Interactions*, 1(3): 195-204.
- Gilbertson, R. L., J. C. Faria, P. Ahlquist, D. P. Maxwell. 1993. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology New York and Baltimore then St Paul*. 83: 709-709.
- Girsova, N. V., K. D. Bottner-Parker, D. Z. Bogoutdinov, T. B. Kastalyeva, Y. I. Meshkov, K. A. Mozhaeva, M. Lee. 2017. Diverse phytoplasmas associated with leguminous crops in Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 1-12.
- Gundersen, D. E., I. M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
- Guzmán, P., M. R. Sudarshana, Y. S. Seo, M. R. Rojas, E. Natwick, T. Turini, R. L. Gilbertson. 2000. A new bipartite geminivirus (begomovirus) causing leaf curl and crumpling in cucurbits in the Imperial Valley of California. *Plant Disease*, 84(4): 488-488.
- Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, H. Mejía-Ruíz, J. A. Garzón-Tiznado, R. F. Rivera-Bustamante. 2003. Geminivirus en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y Rango de Hospedantes en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1): 107-116.
- Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, R. F. Rivera-Bustamante. 2004. Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en Baja California Sur, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2): 206-215.
- Holguín-Peña, R. J., R. C. Vázquez-Juárez, J. P. Martínez-Soriano. 2007. First report of a 16SrI-B group phytoplasma associated with a yellows-type disease affecting tomato plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*, 91(3): 328-328.
- Holguín-Peña, R. J., L. G. Hernández-Montiel, H. Latisnere-Barragán. 2010. Identificación y distribución geográfica de *Bemisia tabaci* Gennadius y su relación con enfermedades begomovirales en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de Baja California, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1): 58-60.
- Idris, A. M., A. Abdel-Salam, J. K. Brown. 2006. Introduction of the new world Squash leaf curl virus to squash (*Cucurbita pepo*) in Egypt: A potential threat to important food crops. *Plant Disease*, 90(9): 1262-1262.

- Ingham, D. J., E. Pascal, S. G. Lazarowitz. 1995. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*, 207(1): 191-204.
- Kakizawa S., K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H. Y. Jung, T. Sawayanagi. 2001. Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1043–1050.
- Kon, T., L. M. Dolores, N. B. Bajet, S. Hase, H. Takahashi, M. Ikegami. 2003. Molecular characterization of a strain of Squash leaf curl China virus from the Philippines. *Journal of Phytopathology*, 151(10): 535-539.
- Kube, M., B. Schneider, H. Kuhl, T. Dandekar, K. Heitmann, A. M. Migdoll, E. Seemüller. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. *BMC Genomics*, 9(1): 306.
- Kuboyama, T., C. C. Huang, X. Lu, T. Sawayanagi, T. Kanazawa, T. Kagami, I. Matsuda, T. Tsuchizaki, S. Namba. 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 1031-1037.
- Kumar, S., P. Sharma, S. Sharma, G. P. Rao. 2014. Mixed Infection and Natural Spread of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' and Mungbean Yellow Mosaic India Virus Affecting Soya Bean Crop in India. *Journal of Phytopathology*, 163(5): 395-406.
- Kumar S., G. Stecher, K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Lapidot, M., D. Gelbart, A. Gal-On, N. Sela, G. Anfoka, F. H. Ahmed, A. K. El-Attar. 2014. Frequent migration of introduced cucurbit-infecting begomoviruses among Middle Eastern countries. *Virology Journal*, 11(1): 181.
- Lazarowitz, S. G. 1991. Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication and movement functions in determining host range. *Virology*, 180(1): 70-80.
- Lazarowitz, S. G., R. N. Beachy. 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell Online*, 11(4): 535-548.
- Lazarowitz, S. G., I. B. Lazdins. 1991. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. *Virology*, 180(1): 58-69.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen, R. E. Davis, L. N. Chiykowski. 1992. Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with Canadian peach (eastern) X disease, western X disease, and clover yellow edge. *Journal of Bacteriology*, 174(20): 6694-6698.

- Lee, I. M., D. E. Gundersen, R. W. Hammond, R. E. Davis. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84(6): 559-566.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen, A. Bertaccini. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88(12): 1359-1366.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen, R. E. Davis, K. D. Bottner, C. Marcone, E. Seemüller. 2004. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1037-1048.
- Lee, I. M., R. E. Davis, D. E. Gundersen. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1): 221-255.
- Lebsky, V., A. Poghosyan. 2007. Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, Mexico: a brief overview. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 131.
- Lebsky, V., A. Poghosyan, L. Silva-Rosales. 2010. Application of scanning electron microscopy for diagnosing phytoplasmas in single and mixed (virus-phytoplasma) infection in Papaya. En *Proceedings of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*. p. 5-10.
- Lebsky, V., J. Hernández-González, G. Arguello-Astorga, Y. Cárdenas-Conejo, A. Poghosyan. 2011. Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement): 55-56.
- Leyva-López, N. E., J. C. Ochoa-Sánchez, D. S. Leal-Klevezas, J. P. Martínez-Soriano. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(12): 1062-1068.
- Liu, S., I. D. Bedford, R. W. Briddon, P. G. Markham. 1997. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology* 78:1791-1794.
- Lugo M., U. R. Guzmán, E. R. S. García, F. J. León. 2011. Geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate del Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:109-118.
- Maramorosch K, R. R. Granados, H. Hirumi. 1970. Micoplasma diseases in plants and insects. *Advanc. Virus Res.* 16: 135-193.
- Marwal, A., R. Prajapat, A. Sahu, R. K. Gaur. 2012. Computational Characterization of Begomovirus Infecting Two Ornamental Plants: *Jasminum sambac* and *Millingtonia hortensis*. *Asian Journal of Biological Sciences*, 5: 240-249.

- Maruthi, M. N., A. R. Rekha, V. Muniyappa. 2007. Pumpkin yellow vein mosaic disease is caused by two distinct begomoviruses: complete viral sequences and comparative transmission by an indigenous *Bemisia tabaci* and the introduced B-biotype. EPPO bulletin, 37(2): 412-419.
- Marzachi, C., R. G. Milne, D. Bosco. 2004. Phytoplasma-plant-vector relationships. Recent Research Developments in Plant Pathology: 211-241.
- McClure, M. S. 1980. Spatial and seasonal distributions of leafhopper vectors of peach X-disease in Connecticut. Environmental Entomology, 9(5): 668-672.
- Melo, L. A., I. P. Bedendo, V. A. Yuki. 2009. Abobrinha-de-moita: um novo hospedeiro de fitoplasma do grupo 16SrIII. Tropical Plant Pathology, 34(2): 114-117.
- Mello, A. P. D. O. A., B. Eckstein, D. Flores, P. F. Kreyci, I. P. Bedendo. 2011. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(6): 1454-1461.
- Montano, H. G., R. E. Davis, E. L. Dally, J. P. Pimentel, P. S. T. Brioso. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. Plant Disease, 84(4): 429-436.
- Montano, H. G., P. S. Brioso, J. O. C. Junior, D. V. Figueiredo, J. P. Pimentel. 2007. First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*). Bulletin of Insectology, 60(2): 277.
- Munyanza, J. E., J. M. Crosslin, J. E. Upton, J. L. Buchman. 2010. Incidence of the beet leafhopper-transmitted virescence agent phytoplasma in local populations of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus*, in Washington State. Journal of Insect science, 10(18): 1-10.
- Muniyappa, V., M. N. Maruthi, C. R. Babitha, J. Colvin, R. W. Bridson, K. T. Rangaswamy. 2003. Characterization of *Pumpkin yellow vein mosaic virus* from India. Annals of Applied Biology, 142(3): 323-331.
- Nasu, S., D. D. Jensen, J. Richardson. 1970. Electron microscopy of mycoplasma-like bodies associated with insect and plant hosts of peach western X-disease. Virology, 41(4): 583-595.
- Nishigawa, H., S. I. Miyata, K. Oshima, T. Sawayanagi, A. Komoto, T. Kuboyama, S. Namba. 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. Microbiology, 147(2): 507-513.
- Oliveira, M. R. V., T. J. Henneberry, P. Anderson. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. Crop Protection, 20(9): 709-723.

- Omar, A. F., K. Foissac. 2012. Occurrence and incidence of phytoplasmas of the 16SrII-D subgroup on solanaceous and cucurbit crops in Egypt. *European Journal of Plant Pathology*, 133(2): 353-360.
- Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H. Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, S. Namba. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36(1): 27-29.
- Oshima, K., Y. Ishii, S. Kakizawa, K. Sugawara, Y. Neriya, M. Himeno, S. Namba. 2011. Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS One*, 6(8): e23242. doi:10.1371/journal.pone.0023242.
- Palmer, K. E., E. P. Rybicki. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in virus research*, 50, 183-234.
- Paris, H. S., D. N. Maynard. 2008. *Trichosanthes cucumerina* Snake gourd. In *The encyclopedia of fruits and nuts*, edited by J. Janick, R. E. Paul. (CABI Publications, Oxfordshire, UK) 2008: 312-313.
- Perrilla H. L. M. 2013. Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia *Cicadellidae* (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Poghosyan, A., J. Hernández-González, A. Gallou, G. Andrade-Michel, C. Palacios-Cardiel, V. Lebsky. 2015(a). First Report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' in Kumquat (*Citrus japonica*) with HLB-like Symptoms in La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease*, 99(4): 552-552.
- Poghosyan, A., J. Hernández-González, V. Lebsky. 2015(b). Phytoplasmas associated with naturally infected *Catharanthus roseus* in La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1s): S25-S26.
- Purcell, A. H. 1979. Transmission of X-disease agent by the leafhoppers *Scaphytopius nitridus* and *Acinopterus angulatus*. *Plant Disease Reporter*, 63: 549-552.
- Rao, G. P., S. G. Gopala, A. Rao. 2017. First report of a 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strain (16SrI-B subgroup) associated with witches' broom disease in *Cucurbita pepo* in India. *New Disease Reports*, 35: 33-33.
- Rappussi, M. C. C., B. Eckstein, D. Flôres, I. C. R. Haas, L. Amorim, I. P. Bedendo. 2012. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4): 829-840.
- Rentería-Canett. I. 2004. Mecanismo de la interacción sinérgica en la mezcla del Virus huasteco del chile y el Virus del mosaico dorado del chile a nivel de replicación. Tesis de maestría. En: M. A. García-Neria, D. L. Trejo-Saavedra, R. F. Rivera-Bustamante. Veinte años de investigación con Geminivirus en vegetales en Guanajuato. *Acta Universitaria*, 2010, vol. 20, no 3.



- Rentería-Canett, I., B. Xoconostle-Cázares, R. Ruiz-Medrano, R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal*, 8(1): 104.
- Reveles-Torres, L. R., R. Velásquez Valle, J. A. Mauricio Castillo, S. Salas Muñoz. 2012. Detección de infecciones mixtas causadas por begomovirus y curtovirus en plantas de chile para secado en San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:155-160.
- Reveles-Torres L.R., R. Velásquez-Valle, J. A. Mauricio-Castillo. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. Folleto Técnico Núm 56. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 41 páginas.
- Rojas, M. R., R. L. Gilbertson, D. P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant disease*, 77(4): 340-347.
- Rojas-Martínez, R. I., E. Zavaleta-Mejía, I. M. Lee, A. Aragón-García. 2009. Identificación de un aislamiento del grupo 16SrIII, '*Candidatus* Phytoplasma pruni' en plantas y semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) en México. *Agrociencia*, 43(8): 851-860.
- Romay, G., D. Chirinos, F. Geraud-Pouey, C. Desbiez. 2010. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives of Virology*, 155(11): 1843-1847.
- Romay, G., H. Lecoq, C. Desbiez. 2014. Cucurbit crops and their viral diseases in Latin America and the Caribbean islands: A review. *Journal of Plant Pathology*, 96(2): 227-242.
- Romay, G., H. Lecoq, C. Desbiez. 2015. *Melon chlorotic mosaic virus* and associated alphasatellite from Venezuela: genetic variation and sap transmission of a begomovirus-satellite complex. *Plant Pathology*, 64(5): 1224-1234.
- Rosell, R. C., I. Torres-Jerez, J. K. Brown. 1999. Tracing the Geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honey dew. *Virology* 89(3):239-246.
- Salehi, M., M. Siampour, S. A. Esmailzadeh Hosseini, A. Bertaccini. 2015. Characterization and vector identification of phytoplasmas associated with cucumber and squash phyllody in Iran. *Bull Insectol*, 68: 311-319.
- Sánchez-Campos, S., J. Navas-Castillo, R. Camero, C. Soria, J. A. Díaz, E. Moriones. 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*, 89(11): 1038-1043.
- Santos-Cervantes, M. E., J. A. Chávez-Medina, J. Méndez-Lozano, N. E. Leyva-López. 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, 92(7): 1007-1011.

- Santos-Cervantes, M. E., J. A. Chávez-Medina, J. Acosta-Pardini, G. L. Flores-Zamora, J. Méndez-Lozano, N. E. Leyva-López. 2010. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant Disease*, 94(4): 388-395.
- Schneider, B., U. Ahrens, B. C. Kirkpatrick, E. Seemüller. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Microbiology*, 139(3): 519-527.
- Seemüller, E., M. Garnier, B. Schneider. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. pp. 91–116. Edited by S. Razin & R. Herrmann. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México–2014 <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/> Consultado 22/Febrero/2016.
- Servín-Villegas, R., J. L. García-Hernández, B. Murillo-Amador, A. Tejas, J. L. Martínez-Carrillo. 2006. Stability of insecticide resistance of silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) in the absence of selection pressure. *Folia Entomológica Mexicana*, vol. 45(1): 27-34.
- Shatters Jr, R. G., C. A. Powell, L. M. Boykin, H. Liansheng, C. L. McKenzie. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal of Economic Entomology*, 102(2): 750-758.
- Shaw, M. E., B. C. Kirkpatrick, D. A. Golino. 1993. The beet leafhopper-transmitted virescence agent causes tomato big bud disease in California. *Plant Disease*, 77(3): 290-295.
- Singh, R., S. K. Raj, V. Prasad. 2008. Molecular characterization of a strain of *Squash leaf curl China virus* from north India. *Journal of Phytopathology*, 156(4): 222-228.
- Singh, A. K., K. K. Mishra, B. Chattopadhyay, S. Chakraborty. 2009. Biological and molecular characterization of a begomovirus associated with yellow vein mosaic disease of pumpkin from Northern India. *Virus Genes*. 39: 359-370.
- Smart, C. D., B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrison, U. Ahrens, B. C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8): 2988-2993.
- Sobh, H., J. Samsatly, M. Jawhari, C. Najjar, A. Haidar, Y. Abou-Jawdah. 2012. First report of *Squash leaf curl virus* in cucurbits in Lebanon. *Plant Disease*, 96(8): 1231-1231.
- Soto, M. J., L. F. Chen, Y. S. Seo, R. L. Gilbertson. 2005. Identification of regions of the Beet mild curly top virus (family Geminiviridae) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology*, 341(2): 257-270.

- Srinivasan, R., Y. C. Hsu, P. Kadirvel, M. Y. Lin. 2013. Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) Species Complex in Java, Indonesia Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Sequences. *The Philippine Agricultural Scientist*, 96(3): 290-295.
- Staniulis, J. B., R. E. Davis, R. Jomantiene, A. Kalvelyte, E. L. Dally. 2000. Single and mixed phytoplasma infections in phyllody-and dwarf-diseased clover plants in Lithuania. *Plant Disease*, 84(10): 1061-1066.
- Stoddard, E. M., E. M. Hildebrand, D. H. Palmiter, H. G. Parker. 1951. X disease. In *Virus Diseases and Other Disorders with Viruslike Symptoms of Stone Fruits in North America United States Department of Agriculture Agriculture Handbook*, vol. 10, pp. 37–42. Washington: United States Government Printing Office.
- Streten, C., B. Conde, M. Herrington, J. Moulden, K. Gibb. 2005. *Candidatus* Phytoplasma australiense is associated with pumpkin yellow leaf curl disease in Queensland, Western Australia and the Northern Territory. *Australasian Plant Pathology*, 34(1): 103-105.
- Sufrin-Ringwald, T., M. Lapidot. 2011. Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: *Squash leaf curl virus* and *Watermelon chlorotic stunt virus*. *Phytopathology*, 101(2): 281-289.
- Swarnalatha, P., M. K. Reddy, 2014. Duplex PCR for simultaneous detection of Begomovirus and Phytoplasma from naturally infected tomato. *Pest Management In Horticultural Ecosystems*, 20(1): 59-68.
- Syller, J. 2016. Antagonistic within-host interactions between plant viruses: molecular basis and impact on viral and host fitness. *Molecular Plant Pathology*, 17(5): 769-782.
- Tocko-Marabena, B. K., S. Silla, C. Simiand, I. Zinga, J. Legg, B. Reynaud, H. Delatte. 2017. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* species colonizing cassava in Central African Republic characterized by analysis of cytochrome c oxidase subunit I. *PloS one*, 12(8): e0182749.
- Tsai, W. S., C. J. Hu, D. P. Shung, L. M. Lee, J. T. Wang, L. Kenyon. 2011. First Report of *Squash leaf curl Philippines virus* infecting chayote (*Sechium edule*) in Taiwan. *Plant Disease*, 95(9): 1197-1197.
- Van der Plank, E. J. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York, London. (p 344).
- Velásquez-Valle, R., L. R. Reveles-Torres, J. Mena-Covarrubias. 2017. Géneros de Chicharritas 1 Presentes durante el Invierno en Regiones de Aguascalientes, Coahuila, y Zacatecas, México. *Southwestern Entomologist*, 42(1): 249-259.
- Weintraub, P. G., S. Pivonia, A. Rosner, A. Gera. 2004. A new disease in *Limonium latifolium* hybrids. II. Investigating insect vectors. *HortScience*, 39(5): 1060-1061.

- Weintraub, P. G., y Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91-111.
- Whitfield, A. E., D. Rotenberg. 2015. Disruption of insect transmission of plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 8: 79-87.
- Zamora Gutiérrez, L. 2014. Detección e identificación de *Ca. Phytoplasmas* sp. y begomovirus en el cultivo *Phaseolus vulgaris* L. en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 29(3): 236-236.
- Zhang, Y. P., J. K. Uyemoto, B. C. Kirkpatrick. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of virological methods*, 71(1): 45-50.
- Zhang, L. P., Y. J. Zhang, W. J. Zhang, Q. J. Wu, B. Y. Xu, D. Chu. 2005. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *Journal of Applied Entomology*, 129(3): 121-128.
- Zhao, Y., W. Wei, M. Lee, J. Shao, X. Suo, R. E. Davis. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10): 2582-2593.
- Zhao, Y., R. E. Davis. 2016. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5): 2121-2123.
- Zerbini, F. M., R. W. Briddon, A. Idris, D. P. Martin, E. Moriones, J. Navas-Castillo, R. Rivera-Bustamante, P. Roumagnac, A. Varsani, ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*, *Journal of General Virology*, 98: 131-133.

## 11. ANEXOS

### ANEXO A. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

Nombre del área del cultivo: _____					Fecha: ____/____/____				
Nombre del Responsable: _____					Tel. _____				
Cultivo: _____			Variedad: _____			Ha: _____			
<b>Realizar estudios Patométricos en <i>Cucurbita pepo</i> L. en diferentes campos de cultivo</b>									
<b>Los Planes, El Carrizal y Pescadero.</b>									
Nomenclatura: 1.- % de Incidencia					S plantas sintomáticas, N No presentan síntomas.				
2.- % de Severidad					Nivel de Daño: 0-Sano, 1-Leve, 2-Moderado, 3-Severo				
Planta 1	1.-	S	N		Planta 16	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 2	1.-	S	N		Planta 17	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 3	1.-	S	N		Planta 18	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 4	1.-	S	N		Planta 19	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 5	1.-	S	N		Planta 20	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 6	1.-	S	N		Planta 21	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 7	1.-	S	N		Planta 22	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 8	1.-	S	N		Planta 23	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 9	1.-	S	N		Planta 24	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 10	1.-	S	N		Planta 25	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 11	1.-	S	N		Planta 26	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 12	1.-	S	N		Planta 27	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 13	1.-	S	N		Planta 28	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 14	1.-	S	N		Planta 29	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1
Planta 15	1.-	S	N		Planta 30	1.-	S	N	
	2.-	0	1	2		3	2.-	0	1

## ANEXO B. EXTRACCIÓN DE ADN

### EXTRACCIÓN DE ADN (MÉTODO CTAB)

#### Reactivos:

Buffer CTAB 2X: 10 g CTAB, 50 mL 1 M Tris HCl, pH8 (75 mM), 20 mL 0.05 M EDTA, pH 8.0 (100 mM), 140 mL NaCl (5 M) y 290 mL H<sub>2</sub>O.

Buffer TE, pH 8.0: 2.5 mL 1 M Tris HCl, (10 mM), 0.5 mL 0.5 M EDTA, (1 mM) y 250 mL H<sub>2</sub>O.

25:24:1 Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico. (Sigma)

24:1 Cloroformo: Alcohol Isoamílico. (Sigma)

Acetato de Amonio 7.5 M (-20°C). (Sigma)

CTAB. (Sigma)

0.5 M EDTA, pH 8.0. (GibcoBRL)

Etanol

NaCl. (Sigma)

2 β-mercaptoetanol. (Bio-Rad)

10 mg/mL RNasa A. (Roche)

Isopropanol (-20°C). (EM Science)

1 M Tris HCl pH 8.0 (Sigma)

Proteinasa K. (Roche)

#### Procedimiento:

1. Colocar 50 mg de tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno líquido. Transferir a un tubo Eppendorf. Añadir 500 µL de Buffer CTAB, 10 µL de mercaptoetanol 1.5 µL de proteinasa K.

2. Agitar e incubar en baño María a 55°C por 60 minutos.

3. Añadir 1.5 µL RNAsa, agitar e incubar a 37°C por 15 minutos.
4. Añadir 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico.
5. Centrifugar a 16,000 g por 7 minutos.
6. Transferir la fase acuosa o sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y añadir 0.08 vol. de acetato de amonio a 7.5 M y 0.58 vol. de isopropanol a -20°C, agitar e incubar a -20 toda la noche.
7. Centrifugar 3 minutos a 16,000 g, descartar el sobrenadante, lavar la pastilla con 700 µL de etanol al 70%.
8. Centrifugar 1 minuto a 16,000g, descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 15 minutos.
9. Resuspender la pastilla en 100 µL de TE, PH 8.0 y almacenar a -20°C.

**EXTRACCIÓN DE ADN DE INSECTOS (MÉTODO CTAB modificado por Zhang *et al.*, 1998.)**

1. Sacar el insecto del etanol al 70% y colocarlo en una sanita seca y estéril. Macerar en un tubo de Eppendorf de 1.5 mL y adicionar 800 µL de amortiguador CTAB precalentado a 60°C (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH=8, 25 µL βmercaptoetanol), aplicar vortex.
2. Incubar a 60°C por 30 minutos, durante este tiempo vortexear varias veces.
3. Adicionar 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, mezclar por inversión y centrifugar a 16000 g por 5 min.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL, colocar 1 vol. de isopropanol frio, e incubar por 30 minutos o toda la noche.
5. Centrifugar a 16000 g por 10 minutos, decantar fase acuosa.
6. Lavar la pastilla con etano al 80% centrifugar a 16000 g por 10 minutos (2 veces).

7. Secar la pastilla y resuspender en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ.

50 mg de tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno líquido. Transferir a un tubo Eppendorf. Añadir 500  $\mu$ L de Buffer CTAB, 10  $\mu$ L de mercaptoetanol 1.5  $\mu$ L de proteinasa K

## **ANEXO C. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS Y FITOPLASMAS**

### **Reacción de PCR (detección de begomovirus)**

Las reacciones de PCR, para detección de begomovirus y SLCuV en ADN de tejido de plantas y mosquita blanca, se realizaron en 20  $\mu$ L de volumen conteniendo: 1  $\mu$ L de ADN (50 ng), 10  $\mu$ L de 2X Phusion Master, 10 mM 1  $\mu$ L de cada cebador, DMSO 3% 0.6  $\mu$ L y H<sub>2</sub>O estéril. La programación del termociclador fue de acuerdo con los cebadores (dependiendo de la temperatura de alineamiento). Las condiciones de amplificación fueron de un período inicial de desnaturalización de 30 segundos a 98°C, seguido por 35 ciclos, comprendidos por una fase desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, una fase de alineamiento (de acuerdo al oligo), durante 30 segundos y una fase de elongación a 72°C durante 30 segundos. Y por último un período final de elongación a 72°C durante 5 minutos. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems® Veriti® 96-Well y la calidad e integridad de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **Reacción de PCR (detección de fitoplasmas)**

Las reacciones de PCR, para detección de fitoplasmas en ADN de tejido de plantas y de insectos, se realizaron en 25  $\mu$ L de volumen conteniendo: 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X PCR Buffer, 0.2 uM de cada primer 0.2 mM dNTP mix, 2U/rxn Taq DNA Polimerasa y 1  $\mu$ L del templado de ADN. Las condiciones de amplificación para el caso de fitoplasmas fueron de un periodo inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos,



comprendidos por una fase de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una fase de alineamiento (según el cebador °C) durante 50 segundos y una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto. Por último, un periodo final de elongación a 72°C durante 10 minutos.

### Cebadores para la detección de begomovirus y fitoplasmas

#### Cebadores degenerados utilizados para la detección de varios begomovirus

Cebador	Secuencia	Fragmento pb	Referencia
<b>PAL1v1978</b>	5'-GGCCCACAT(C/T)GTCTT(C/T)CC(A/C/G/T)GT-3'		
<b>PAR1c496</b>	5'-GGGCTT(C/T)CT(A/G)TACAT(A/G)GG -3'	1100	
<b>AV494</b>	5'-GCC(C/T)AT(G/A)TA(T/C)AG(A/G)AAGCC(A/C)AG-3'		Rojas <i>et al.</i> , 1993
<b>AC1048</b>	5'-GG(A/G)TT-(A/G/T)GA(G/A)GCATG(T/A/C)GTACATG-3'	550	

#### Cebadores específicos dirigidos al Genoma A y B del SLCuV

Cebador	Secuencia	Fragmento pb	Referencia
<b>SqA1R<sup>1</sup></b>	AGCTGTATCTTGGGCAACAGA		Sobh <i>et al.</i> 2012
<b>SqA2F<sup>1</sup></b>	TATCTCCCATCTTGGCAAGG	601	
<b>SLCVF-SalI<sup>1</sup></b>	TATAGTCGACGTTGAACCGGATTTGAATG		Ahmad <i>et al.</i> , 2013
<b>SLCVR-SalI<sup>1</sup></b>	TATAGTCGACCTGAGGAGAGCACTAAATC	2667	
<b>SLCVA2295F<sup>1</sup></b>	CAGATAATTGAATGAGGCAG		Lapidot <i>et al.</i> , 2014
<b>Xho-SLCV-R<sup>1</sup></b>	TGTACTCGAGAATCATGAAATAAAATTC	1500	
<b>SLCVA2314R<sup>1</sup></b>	CTGCCTCATTCAATTATCTG		Lapidot <i>et al.</i> , 2014
<b>Xho-SLCVA-F<sup>1</sup></b>	CATGATTCTGAGTACATAATTTAC	1300	
<b>SLCV-DNA-B1-F<sup>2</sup></b>	GTGGTTATGCAAGGCGTCGACCCAAC		Dr. Moshe Lapidot en Ali-Shtayeh <i>et al.</i> , 2014a
<b>SLCV-DNA-B1-R<sup>2</sup></b>	GCAAACCTGAAGCTATCGTCGGCGAAGC	1316	
<b>SLCV-DNA-B2-F<sup>2</sup></b>	GCTTCGCCGACGATAGCTTCAGTTTGC		
<b>SLCV-DNA-B2-R<sup>2</sup></b>	GTTGGGTCGACGCCTTGCATAACCAC	1644	

<sup>1</sup> Genoma A. <sup>2</sup> Genoma B

## Cebadores utilizados para la detección de fitoplasmas

Cebador	Secuencia	Fragmento pb	Referencia
P1	5'-AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'		Smart <i>et al.</i> , 1996
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	1830	
P1A	5'-ACGCTGGCGGGCGGCCTAATAC-3'		Lee <i>et al.</i> , 2004.
P7A	5'-CCTTCATCGGCTCTTAGTGC-3'	1800	
R16F2N	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'		Gundersen y Lee, 1996.
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	1250	
R16(III)F2	5'-AAGAGTGGAAAACTCCC-3'		Lee <i>et al.</i> ,
R16(III)R1	5'-TCCGAACTGAGATTGA-3'	800	1994.

Determinación del Biotipo de *B. tabaci*Cebadores dirigidos al gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (mtCOI) de *B. tabaci*

Cebador	Secuencia	Fragmento pb	Referencia
<b>Biotipo B</b>	BioB-F 5'-CTAGGGTTTATTGTTTGAGGTCATCATATATTC-3'	478	
	BioB-R 5'-AATATCGACGAGGCATTCCCCCT-3'		Shatters <i>et al.</i> , 2009
<b>Biotipo Q</b>	BioQ-F 5'-CTTGGTAACTCTTCTGTAGATGTGTGTT-3'	405	
	BioQ-R 5'-CCTTCCCGCAGAAGAAATTTTGTTTC-3'		
<b>New World</b>	BioNW-F 5'-TACTGTTGRAATAGATGTTGACACTCGGG-3'	303	
	BioNW-R 5'-GGAAAAAATGTCAGRTTACTCCCWCAAATAT-3'		

## Transformación de células competentes

Para la transformación del producto de ligación se prepararon células competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por el método de CaCl<sub>2</sub>, basado en la observación de Mandel e Higa (1970), quienes describen que la incorporación de ADN del bacteriófago I por células de estas bacterias se incrementa con la adición de calcio; se almacenaron a -80°C. Las células se transformaron por medio de shock térmico (0-42°C), se agregó medio de

cultivo LB y se incubaron a 37°C/1.5 h/150 rpm. Las células transformadas se sembraron en placas de Petri de LB con ampicilina (100 ug/mL)+IPTG+Xgal, y se incubaron a 37°C durante 16 h. Las colonias blancas se identificaron como las clonas positivas

### **Purificación de plásmido**

Las colonias blancas identificadas como las clonas positivas (que contienen el inserto: vector + fragmento) se cultivaron en medio nutritivo LB 5 mL con ampicilina (100 ug/mL) y se incubaron a 37°C/16 h a 150 rpm. Las mismas colonias seleccionadas fueron resembradas en placas de Petri de LB, con ampicilina; se incubaron a la temperatura mencionada y, posteriormente, se almacenaron a 4°C. Para la extracción del plásmido de las colonias positivas, se utilizó el kit de purificación QIAprep Spin Miniprep Kit sig (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Cuantificación de ADN total y plasmídico por métodos espectrofotométricos**

Para medir la pureza y concentración del ADN genómico y plasmídico, después de realizar las extracciones, se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop 2000, el cual se ajustó con 1 µL de H<sub>2</sub>O miliq. Para la cuantificación del ADN se colocó 1 µL de la muestra, y se leyó a 230 nm, a 260 y 280 nm. Para saber la pureza de la extracción, se obtuvieron los valores de las relaciones 260/280 y 230/280

### **Secuenciación**

Los amplicones obtenidos de begomovirus y de fitoplasmas, se enviaron a secuenciar por ambos extremos a Genewiz, USA, quienes proporcionan servicios utilizando el método de secuenciación de Sanger.

## ANEXO D. SECUENCIAS DEPOSITADAS EN GENBANK

### Genoma A de SLCuV-[MX:BCS:La Paz:17] No. de acceso GenBank MF187211A

LOCUS Seq1 2638 bp DNA circular VRL 31-MAY-2017  
 DEFINITION isolate La Paz-Mex genome complete DNA-A [Squash leaf curl virus=Begomovirus].  
 ACCESSION Seq1  
 VERSION  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Squash leaf curl virus  
 ORGANISM Squash leaf curl virus  
 Viruses; ssDNA viruses; Geminiviridae; Begomovirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2638)  
 AUTHORS VARGAS,M.  
 TITLE Identification and prevalence of bipartite Begomovirus Squash leaf curl virus associated to whitefly-transmitted diseases in Baja California Sur, Mexico  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2638)  
 AUTHORS HOLGUIN-PENA,R.J., VARGAS-SALINAS,M., MEDINA-HERNANDEZ,D., CAAMAL-CHAN,G., BARRAZA-CELIS,A. and ARANDA-LOPEZ,O.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (24-MAR-2017) FITOPATOLOGIA, CIBNOR, Av. Instituto Politecnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, la paz, Baja California Sur 23090, Mexico  
 COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:jholguin04@cibnor.mx.  
 Bankit Comment: TOTAL # OF SEQs:1.

```
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES
    source              Location/Qualifiers
                        1..2638
                        /organism="Squash leaf curl virus"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /isolate="SLCuV-Mx:BCS:La Paz"
                        /host="Cucurbita pepo L"
                        /db_xref="taxon:10829"
                        /country="Mexico:La Paz, BCS."
                        /lat_lon="23 degrees 55'58.82"N, 109 degrees 54'33.82'O"
                        /collection_date="May-2016"
    CDS
                        <213..968
                        /codon_start=1
                        /product="AV1"
                        /translation="MVKRDAPWRLMAGTSKVSRSANFSPRGGMGRFNKAAAWNRPM
YRKPRIYRTRMRGPDIPKGCCEGPKVQSYEQRHDIHSLGKVMCISDVTRNGIITHRVGK
RFCVKSUYILGKIWMDENIKLKNHTNSVIFWLVRDRRPPYGTMPDFGQVFMDFNEPST

ATIKNDLRDRYQVMHFRFYAKVTGGQYASNEQALVRRFWKVVNNHVVYHQAQYENHT
ENALLLYMACHASNPVYATLKIRIYFYDSITN"
    CDS
                        complement(965..>1369)
                        /codon_start=1
                        /product="AC3"
                        /translation="MMDLRTWDDITVHQAEVSVFIWEVNPPLYFKMYNVEDPLYTHT
RIYHIQIRFNHNLRRALNLKAFLNQVWTESIRASGTTYLNRFHLMVLYLDRLLGVI
GLNNVIRAVSSETDRSYVNYVLENHVIKFKIV"
    CDS
                        complement(1113..>1505)
                        /codon_start=1
                        /product="AC2"
                        /translation="MPNSSSSKVPISIKAQHRIAKKRAVRRRRIDLDCGCSIYIHINCA
KDGNGFTHMGRHHCASGREFRFYLGGSKSPLFQDVQRGGSTLHAKKDIHPSNIPVQPQP
EESTKSSQVPELPSLDGIDSSFWDDIFE"
    CDS
                        complement(1447..>2493)
                        /codon_start=1
                        /product="AC1"
                        /translation="MPRNPNSFRLTARNIFLTYPRCDVPKEEVLEMLLHLSWSVVKPN
YIRVAREEHS DGSPHLHCLIQLSGKSNIKDAGFDLTHPRRSARFHPNIQAADKTHAV
KNYITKEGDYCESGQYKVS GSKSNKDDVYHNAVNAGSAGEALDIKAGDPKTFIVNY
HNL LANVERLFQKPPWPVPPFELSSFTSVPEELQWADDYFNECSAARPRPTSIIE
GGSRTGKTMWARS LGPHNYLSGHLDFNSRVFSNDVYVNDVAPHYLK LKHWKELIG
AQRDQSNCKYKGPVQIKGGIPSVL CNPEGSSYKDFLDKAENSALREWTEKNAKFI
FLEGPLYQSTAQDC"
    CDS
                        complement(2049..>2426)
                        /codon_start=1
                        /product="AC4"
                        /translation="MFPKKKFLRCFCISRGQSSNRITLESQERNIPTGLRITYTASFNY
LENPTSRMLDFSTSLTPDGLPDFTQTFRLPRTPTSPRTTSPKRVIIVNPNIKCLGVQ
SRKTTYITTPSMQVREKLSL"

BASE COUNT    705 a    589 c    596 g    748 t
```

## ORIGIN

1 accggatggc cgcccgtttt tgggtgcctc tacttttagcc cacggggcag gccccaggccc  
 61 aatcaacca caacctttt ttattttatg ggaccacatt aattattcca accaaccacg  
 121 ttgctcctga cgagtctaca taataatgac ttgggtgacta agtgtgggtcc ctataaataa  
 181 agctgacata tcccatacct ctttaattca aaatggtaaa gagagatgcc ccatggcggt  
 241 taatggcggg gacctcaaag gtctcacgct ctgctaactt ttcgcctcgt ggaggtatgg  
 301 gcccaagatt caacaaggcc gctgcatggg ttaacaggcc catgtacagg aagcccagga  
 361 tctatcgcac aatgagaggc ccagacatcc ccaagggatg tgaagggcca tgcaaggttc  
 421 agtcttacga gcagcggcat gatatctccc atcttggcaa ggtaatgtgt atttcggacg  
 481 tgacgcgtgg taatggcatt actcaccgcg tccggcaagcg cttttgtgtt aagtctgtat  
 541 atattttagg caagatatgg atggacgaaa atatcaagtt gaagaatcac acgaacagtg  
 601 tgatattttg gttagttcga gatcgtagac catatggcac tccgatggat ttcggccagg  
 661 gtttcaacat gtttgacaac gagcccagca cggcaactat caagaacgat ctacgtgatc  
 721 gttatcaagt catgcacagg ttctacgcga aggtcactgg tggtcagtat gctagcaacg  
 781 aacaagcctt ggtaggcgt ttctggaagg tcaacaacca tgttgtgtat aaccaccagg  
 841 aagccgcgaa atacgagaat catacggaga acgctttgtt attgtatatg gcatgtactc  
 901 atgcctctaa ccctgtatat gcgacattga aaattcggat ctatttttat gattcgataa  
 961 caaattaata aattttgaat tttatcacat gattctcgag tacataattt acatatgaac  
 1021 ggtccgtttc tgaagataca gctcgtataa cgttattgag accaataact ctaacctat  
 1081 ctaagtacaa cataactaaa tgcctaaatc tattcaaata tgcgtccca gaagctcga  
 1141 tcgattccgt ccagacttgg aagttcagga acgctttgtg aagatttagt gctctcctca  
 1201 ggttgtgggt gaaccggatt tgaatgtggt atatccttgt gtgcgtgtag agtggatcct  
 1261 ccacgttgta catcttgaaa tagaggggat ttggaacctc ccaaataaaa acggaattct  
 1321 ctgcctgatg cacagtgatg tgcgtccatg tgcgtaaact cattaccatc tttggcgcag  
 1381 tttatatgta tgtatatgga acagccacag tctaagtcga ttcttcgacg acgaacagct  
 1441 ctttttttag caatcctgtg ctgtgctttg atagagggga ctttcgagga agatgaattt  
 1501 ggcatttttt tcagtccact ctcgtagtgc cgagttctcg gctttgtcga ggaaatcttt  
 1561 ataactggac cctctccag gattgcacag cacgattgat gggattccac ctttaatttg  
 1621 aaccggcctt ccatatttac agttggactg ccagtccctt tgggccccaa tcaattcctt  
 1681 ccagtgcctt agcttttaggt aatgcggagc gacgtcatca atgacgttat acttgacgtc  
 1741 attcgagaaa accctagaat tgaatcaag atggccgctc aagtaattat gtggccctaa  
 1801 cgacctagcc cacattgtct tgcccgttct tgaaccacct tctatgatta tactagtgg  
 1861 ctttggccgc gcagcggaac actcattaaa ataactatca gcccaatctt gtaactctt  
 1921 tggaaactgac gtgaacgaag agagctcaaa cggaggaacc cacggttccg gaggtttctg  
 1981 aaataatctc tcgacgttag ctaataaatt atgataatta acgataaacg tctttggatc  
 2041 accagctttt ataatgtcga gagcttctcc cgcactacct gcattgacgg cgttgtgata  
 2101 tacgtcgtct ttgttcgact ttgaaccccc agacacttta tattgcccgg attcacaata  
 2161 atcaccctct ttgggtgatgt agttcttgac ggcgttgggtg tccttggcag cctgaatgtt  
 2221 tgggtgaaat cgggcagacc gtctgggggtg agtgaggctg aaaaatccag catccttgat  
 2281 gttggatttt ccagataatt gaatgaggca gtgtaagtgc ggagaccctg cggaatgttc  
 2341 ctctcttgcg actctaattgt aattcggttt gacgactgac cacgagagat gcagaagcat  
 2401 ctcaagaact tcttctttgg gaacatcgca ctttgataa gttaagaata tatttctggc  
 2461 agttaaacga aaggaattag ggtttcgtgg catatttctg aaatatgcgt cgggacacca  
 2521 ggaggtgtcc tctcaacttt ctcatattgc tgggtgcctg gtgtcctata tatacctcaa  
 2581 gacacataaa gcctctaggg gacaccaagg ggcaaatcg gccatccgca ataatt

Genoma B de SLCuV[MX:BCS:La Paz:17] GenBank No. sumisión 2061338, No. de acceso GenBank en proceso de asignación.

LOCUS SLCuV-B-MX:BCS:La 2608 bp DNA circular 13-NOV-2017  
 DEFINITION UNVERIFIED: Paz:17.  
 ACCESSION SLCuV-B-MX:BCS:La  
 VERSION  
 KEYWORDS UNVERIFIED.  
 SOURCE SLCuVB-MX:BCS:La Paz:17  
 ORGANISM SLCuVB-MX:BCS:La Paz:17  
 Unclassified.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2608)  
 AUTHORS Holguin-Pena,R.J. Sr., Vargas-Salinas,M., Medina-Hernandez,D.,  
 Caamal-Chang,M.G. and Barraza-Celis,A. Sr.  
 TITLE Comparative a phylogenetic analysis of squash leaf curl virus and  
 analysis of iterative consensus to study the genetic diversity  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2608)  
 AUTHORS Holguin-Pena,R.J. Sr., Vargas-Salinas,M., Medina-Hernandez,D.,  
 Caamal-Chang,M.G. and Barraza-Celis,A. Sr.  
 TITLE Characterization of leaf curl disease associated to mixed infection  
 by begomovirus and phytoplams in squash (Cucurbita pepo L.) in Baja  
 California Sur  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 3 (bases 1 to 2608)  
 AUTHORS Holguin-Pena,R.J. Sr., Vargas-Salinas,M., Medina-Hernandez,D.,  
 Caamal-Chang,M.G. and Barraza-Celis,A. Sr.  
 TITLE Identification and prevalence of bipartite Begomovirus Squash leaf  
 curl virus associated to whitefly-transmitted diseases in Baja  
 California Sur, Mexico  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 4 (bases 1 to 2608)  
 AUTHORS Holguin-Pena,R.J. Sr., Vargas-Salinas,M., Medina-Hernandez,D.,  
 Caamal-Chang,M.G. and Barraza-Celis,A. Sr.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (13-NOV-2017) FITOPATOLOGIA, CIBNOR, Av. Instituto  
 Politecnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, la paz,  
 Baja California Sur 23090, Mexico  
 COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation  
 provided by the submitter.  
 Bankit Comment: ALT EMAIL:jholguin04@cibnor.mx.  
 Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:1.  
 ##Assembly-Data-START##  
 Assembly Method :: Geneious v. 10.2.2  
 Sequencing Technology :: 454  
 ##Assembly-Data-END##  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..2608  
 /organism="SLCuVB-MX:BCS:La Paz:17"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 BASE COUNT 702 a 557 c 560 g 789 t

## ORIGIN

```

1 accggatggc cgcccgaatt ttgggtgcct ctcctttagc ccacggccca ggcccatggt
61 tcgaatattg ggccgacttt tgaccattt tagtcgcgcg cttatcccc tccgggacca
121 cacagcactt tcgaccaatc acgttgttac cgacgaactt ctttctatg gatcgtacga
181 catgtgtgga ccactatcac atgatgctgt gtcagacgct atcctttaat tcaaattggc
241 aaagtgatta tcttcgtctt taattgtac tgtcacagag tgttgacca tctctgtgca
301 ctatcgacga tgccttttt ttctgtggac cttgttctgt caatttgaat taatctttag
361 tgctaccaat tacaatttag ctacaaagtc tagttattgt tcatggattg gttcttcgtc
421 tattaataat tgaacttgt aattggctta tgcgtcgaat tcatatattg gacaacacgt
481 gtattatcta cacgtatata cgtgtacag tcgctgtagc atcatcta atgcattcga
541 cgagtaatag acggggtcga tcccaaagac aacgaggtag tcatgtacga cgtacagggg
601 tcaatcgctc ctatggtgca gcgctgggtg atgatagacg tcgacccaac attacatcaa
661 agactcaaga tgaaccaaga atgactattc agcgtgttca agagaaccag tttggccag
721 aatttgtctt gactcaaaaac tcagcgttgt ccacgttgt aacatatcct agctatgta
781 agacggaacc caatcgcaaa agaacgtata taaaattgaa acgattgctt ttaaggaa
841 ctctgaaaat tgaacgtgga cagggtgaca ctattatgga tgggcccagt tctaattg
901 aaggagtatt ttctatggtc atcgtgggtg atcgcaaac acatgttagt ccatctggtc
961 gtctacatac atttgatgag ttatttggcg cgcgtatcca ttgtcacggt aatttgcctc
1021 tcgtacctgc tttgaaggac cgttctaca ttagacacgt cactaagcgt gtagtgcctc
1081 ttgaaaagga cagcctactg attgatctc atggtacgac acatctgtct aacaagcgtt
1141 ataactgttg ggcatcgttc aacgatcttg agcgggaatc gtgtaatggc gtttacgcta
1201 acatacaaaa gaacgctctg ttagtctatt actgttggct ttcggatgcc cagtccaagg
1261 catcaacata tgtatctttt gaactggact atttgggatg attaagatta ataaattgca
1321 caagtcccgc aattaataa gaactaaata ctgaacaggc ctgtttattt tactattaaa
1381 aatggccgcg cagcggaca ctctcaaaa cataatgagc gacagcatta gcaaccattg
1441 tgagtgttaa atgaacatat aacttaattg gcattagctt agggattttg gagtgctcgg
1501 gatacaactg gttcaaatgc attcatgtac agtcgatcta actaattcat tcaactgtga
1561 cattgacatg gtgatgttcg attgacgacc ttgtattccg actattgaag ctgattcccc
1621 aggatctaag atgttagttc ccaatctggt gagttccctg tatggaagca gctcttctc
1681 aatatcaaaa tccgcatctc tgttagttgg gcctattgca ctctttgtgg cccaagattc
1741 acctggatta atttcaattg ggcctcttag cccaaatcta gatgacgatg cggatttgac
1801 cagtcttctc tcccacttgc cgtatcccac gtgccagaaa tcaatgtcct tttcgtaaa
1861 ttgttttgca agtatcttta ctgtcgggtc ccggaaaggg atatcaacgg agtgcttcgc
1921 cgacgatagc ttcagtttgc cttgaattt agcgaatgc gtcatttgat gcacattcga
1981 atctgagact cgatagtata acttccatgg gattgggtct ttgagagaga agaacgatga
2041 tgaaaaatag tggagatcta tgttacatct tatcggaaaa gtccacgacg cttgcagaga
2101 ttcattgtcc gtcatgcgtt tgtcgtgaat ctccactatt accgtacctg atgcgttaat
2161 cggaacctgt tgccgatatt ctatgacgca gtggctgatt ttcatgcagc tacgactcag
2221 cctcgtggtt atctgagaag ctgtcgaagg aaattgcaga acaatttccg ttaggtcgtg
2281 agataactga aattcgtccc tctgcgattc tatataattg aatgcgcttg gtggttgaac
2341 caattgagaa cccatttgaa ctctgacaca ctgaacaagc aatttaattc aggaatcgca
2401 ctgcaaaaata tgatttctgg acagatatat gaggaacgaa gtgagttagg gtttgagtgg
2461 catatttgtt aaatatgcgt cgggacacca gatggtgtcc tctcaacttt ctcatattgc
2521 tgggtctctg gtgtcctata tatactcaa gacacataaa gcctctaggg gacaccaagg
2581 ggcaaaatcg gccatccgca ataattt

```

## Secuencia fitoplasma del grupo 16Sr III

➤ ‘*Ca Phytoplasma pruni*’ MX-BCS-La Paz en *C. pepo*

AGTCGAACGGAAACCTTCGGGTTTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAAG  
CAACCTGCCCTTAAGACGAGGATAACAATTGGAAACAGTTGCTAAGACTGGAT  
AGGAAAAGTGAAGGCATCTTTACTTTTTTAAAAGACCTTCTTTGAAGGTATGCT  
TAAGGAGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAG  
ACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGAC  
ACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGG  
AAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAG  
TTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGAAAACTCCCTTGACGGTACTTAA  
TGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAGGGGC  
GAGCGTTATCCGGAATTATTGTGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGT  
CTATAGTTTAATTTACAGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTA  
GAGTGAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAAT  
ATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTG  
AGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTAAGTGAAGTAAACACAT  
TAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGA  
CGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAA  
AAGCTTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGAAGTTATATAAATATAATGGAGGT  
TATCAGGAAAACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCCTGTCGGGAGATGTT  
AGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAAT  
GATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATT  
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATAC