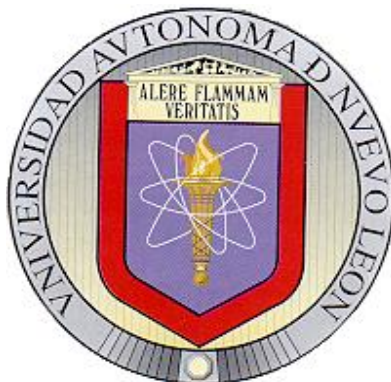


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**VIRUS PATÓGENOS DE CUCURBITÁCEAS Y DE HOSPEDEROS ALTERNOS
TRANSMITIDOS POR EL COMPLEJO *BEMISIA TABACI* (GENN.) EN LA REGIÓN
LAGUNERA**

**PRESENTA
PERLA BELÉN TORRES TRUJILLO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**VIRUS PATÓGENOS DE CUCURBITÁCEAS Y DE HOSPEDEROS ALTERNOS
TRANSMITIDOS POR EL COMPLEJO *BEMISIA TABACI* (Genn.) EN LA REGIÓN
LAGUNERA**

**PRESENTA
PERLA BELÉN TORRES TRUJILLO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

General Escobedo, Nuevo León, México

Noviembre 2017

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

COMITÉ PARTICULAR DE TESIS

Dr. Omar G. Alvarado Gómez
Director

Dra. Verónica Ávila Rodríguez
Co-Directora

Dr. Urbano Nava Camberos
Asesor

Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías
Asesora

Dra. María Gloria Estrada Hernández
Asesora

Dr. Ramiro González Garza
Asesor

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Subdirectora del Área de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A Dios por darme vida.

A mi hija Romina.

A mis padres Lidia Trujillo Luna y Enrique Torres Hernández.

A mis primas, Cristina Avitia Trujillo, Hilda Avitia Trujillo y Bertha Silvia Avitia Trujillo.

A mi hermana Erica Torres Trujillo.

A todas ellas gracias por su apoyo durante mi estancia doctoral.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme permitido alcanzar el máximo grado académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindaron para realizar mis estudios doctorales.

A mi comité Director: Dr. Omar G. Alvarado Gómez, Co-Directora Dra. Verónica Ávila Rodríguez, asesores: Dr. Urbano Nava Camberos, Dr. Ramiro González Garza, Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías y Dra. María Gloria Estrada Hernández.

A los profesores del Programa de Doctorado en Ciencias Agrícolas por compartir su conocimiento, tiempo y experiencia para mi formación académica.

Al Dr. Omar G. Alvarado Gómez por su tiempo y dedicación en el proyecto de investigación.

Al Dr. Urbano por su apoyo y colaboración en las colectas realizadas en los municipios de la Región Lagunera.

Al Dr. Ramiro González Garza por permitir el uso de las instalaciones y equipo del Laboratorio de Biociencia S.A. y a su personal por la ayuda brindada durante el análisis de muestras.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN GENERAL	x
ABSTRACT	xii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	xiv
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1.1. EL CULTIVO DE CUCURBITACEAS EN MÉXICO	3
1.1.1. El Cultivo de Cucurbitáceas en la Región Lagunera.....	3
1.2. VIROSIS EN CUCURBITACEAS	4
1.2.1. Genero <i>Begomovirus</i>	5
1.2.2. Otros Géneros	5
1.3. MOSCA BLANCA COMO VECTOR DE VIRUS	7
1.4. DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN CUCURBITACEAS Y EN MOSCA BLANCA	10
1.4.1. ELISA.....	10
1.4.2. PCR	10
1.4.3. RT-PCR	11
1.4.4. PCR tiempo real	12
1.5. BIBLIOGRAFÍA	13
CAPÍTULO 2 IDENTIFICACIÓN DE BIOTIPOS DEL COMPLEJO <i>BEMISIA TABACI</i> (Genn.) Y SUS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS, EN COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO	20
RESUMEN	20
SUMMARY	21
2.1. INTRODUCCIÓN	21
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.2.1. Colecta de mosca blanca.....	23
2.2.2 Identificación de biotipos.....	24
2.2.3. Identificación de begomovirus	24
2.3. RESULTADOS	25
2.3.1. Identificación de biotipos y <i>Begomovirus</i> de mosca blanca.....	25

2.4. DISCUSIÓN	26
2.5. BIBLIOGRAFÍA	28
CAPÍTULO 3 IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN CUCURBITACEAS Y MALEZAS EN LA REGIÓN LAGUNERA DE COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO	33
RESUMEN	33
SUMMARY	34
3.1 INTRODUCCIÓN	34
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.2.1. Muestreo.....	37
3.2.2. Extracción de DNA.....	38
3.2.3. Detección e identificación de <i>Begomovirus</i>	39
3.3. RESULTADOS	40
3.3.1. Ciclo Agrícola 2015.....	41
3.3.2. Ciclo Agrícola 2016.....	42
3.4. DISCUSIÓN	44
3.5. CONCLUSIONES.....	46
3.6. BIBLIOGRAFÍA	46
CAPÍTULO 4 SITUACIÓN ACTUAL DEL VIRUS DEL ACHAPARRAMIENTO Y AMARILLAMIENTO DE LAS CUCURBITÁCEAS EN CULTIVOS Y MALEZAS DE LA COMARCA LAGUNERA	50
RESUMEN	50
SUMMARY	51
4.1. INTRODUCCIÓN	52
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	54
4.2.1. Colecta de muestras	54
4.2.2. Extracción de RNA.....	56
4.2.3. Reacciones de RT-PCR.....	57
4.3. RESULTADOS	58
4.4. DISCUSIÓN	60
4.5. CONCLUSIONES.....	62
4.6. BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Páginas
1	Primers utilizados para la identificación de biotipos de mosca blanca y <i>Begomovirus</i> por PCR.....	25
2	Plantas Cucurbitáceas recolectadas en localidades de Coahuila y Durango en el año 2015.....	38
3	Malezas recolectadas en localidades de Coahuila y Durango en el año 2015.....	38
4	<i>Begomovirus</i> detectados en el ciclo agrícola primavera-verano 2015 en especies de cucurbitáceas y malezas de localidades productoras de la Región Lagunera.....	43
5	Malezas colectadas en localidades de Tlahualilo, Durango durante el ciclo agrícola primavera-verano 2016.....	56
6	Detección del CYSDV en cultivos de importancia agrícola y malezas de la Comarca Lagunera en los años 2015 y 2016...	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Páginas
1	A) Amplificación por PCR múltiple a partir del DNA de mosca blanca usando primers específicos para cada biotipo B) Amplificación por PCR a partir del DNA de mosca blanca usando primers para <i>Begomovirus</i>	26
2	Amplificación por PCR del DNA de <i>Begomovirus</i> en cucurbitáceas usando los primers pRV324/CoPR visualizado en un gel de agarosa al 1%.....	42
3	Amplificación por PCR del DNA de <i>Begomovirus</i> en malezas usando los primers pRV324/CoPR visualizado en un gel de agarosa al 1%.....	44
4	Amplificación por PCR del DNA de <i>Begomovirus</i> en cucurbitáceas usando los primers pRV324/CoPR visualizado en un gel de agarosa al 1%.....	44
5	A. Amarillamiento en cultivo de melón durante el mes de agosto 2015. B. Alta población de mosca blanca en envés de hoja de sandía.....	55
6	Amplificación del DNAC del CYSDV por RT-PCR en muestras colectadas en el año 2015. A. oligonucleótidos CysCP5206f/CysCP5600r. B. oligonucleótidos CYSDVCP1/CYSDVCP2.....	59
7	Amplificación del ADNc del CYSDV por RT-PCR con oligonucleótidos CysCP5206f/CysCP5600r.....	60

RESUMEN GENERAL

Las cucurbitáceas son de gran importancia en México por la actividad económica que generan, son plantas de alto nivel de exportación lo cual contribuye al desarrollo agropecuario del país. Sin embargo, estos cultivos se ven afectados por enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos, entre estos los virus. Muchos de los virus fitopatógenos son transmitidos por insectos, siendo el principal, la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Genn.) a la cual se le considera una plaga de las más devastadoras, por lo que tiene una mayor probabilidad de adquirir y propagar una diversidad de virus a plantas sanas. La mosca blanca, *B. tabaci* se caracteriza por ser un complejo de especies crípticas compuesto por al menos 24 biotipos morfológicamente indistinguibles que pueden ser reconocidos por medio de técnicas moleculares.

En el presente proyecto de investigación se realizó la identificación de biotipos del complejo de *B. tabaci* así como la detección de *Begomovirus* y *Crinivirus* en cultivos de melón, pepino, calabaza, sandía, malezas y en el insecto vector mosca blanca. Durante los ciclos primavera-verano de los años 2015 y 2016 se realizaron las colectas en los predios de cucurbitáceas en diferentes localidades productoras de la Región Lagunera de Coahuila y Durango.

Para la identificación de especímenes de la familia Aleyrodidae mediante PCR y secuenciación de DNA, se empleó un par de primers universales, pero en el caso de los biotipos B, Q y nuevo mundo se hizo con primers específicos diseñados con base en el gen mitocondrial citocromo oxidasa I. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo al ser comparadas con la base de datos del GenBank del NCBI, corroboraron la identificación del biotipo B con una similitud del 100% con secuencias tipo. En las muestras del año 2015 se determinó que el *Begomovirus* predominante en las moscas blancas fue el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) con 100% de similitud; mientras que en el 2016 prevaleció el virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (CLCrV) con un 97% de similitud.

Con la finalidad de detectar la presencia de *Begomovirus* y *Crinivirus* en los estados de Coahuila y Durango en plantas, se realizó la extracción de ácidos nucleicos y una amplificación con oligonucleótidos degenerados para *Begomovirus*. En cuanto a la identificación del virus del achaparramiento amarillo de las cucurbitáceas (CYSDV) se utilizó un juego de oligonucleótidos específicos para esta especie del género *Crinivirus*. La amplificación se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, los fragmentos amplificados fueron secuenciados y analizados mediante BLAST confirmando así la presencia del virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (CLCrV) en melón, sandía, pepino y calabaza, el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en verdolaga y trompillo, y el virus del enrollamiento de la hoja amarilla (TYLCV) en malva. El CYSDV fue detectado durante los meses de junio-agosto de ambos ciclos agrícolas, sin embargo en las malezas y mosca blanca

no se encontraron como reservorio del CYSDV en este caso. Se detectaron infecciones mixtas con *Begomovirus* y CYSDV en muestras de cucurbitáceas.

ABSTRACT

The cucurbitaceae are a family of plants of great importance in Mexico for the economic activity that they generate, their cultivation is of high level of export which contributes to the agricultural development of the country; however, these crops are affected by diseases caused by different pathogens, including viruses. Many of the phytopathogenic viruses are transmitted by insects, the main species being the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.), which is considered a pest of the most devastating because of its ability to acquire and propagate a variety of viruses to healthy plants. The whitefly is characterized by being a complex of cryptic species composed of at least 24 morphologically indistinguishable biotypes that can be recognized by means of molecular techniques.

In the present research project, we identified the biotypes of the *B. tabaci* complex as well as the detection of *Begomovirus* and *Crinivirus* in cultures of melon, cucumber, squash, watermelon, weeds and in whitefly. During the spring-summer periods of the years 2015 and 2016 the collections were made in the cucurbitaceous farms in different producing localities of the Lagunera Region of Coahuila and Durango. For the identification of Aleyrodidae family specimens by PCR and DNA

sequencing, a pair of universal primers was used, but in the case of B, Q and new world biotypes, specific primers were used based on the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. The sequences obtained in the present work were compared with GenBank sequences and the results corroborated the biotype B with a 100% of identity with type sequences. In whitefly the most common begomovirus was pepper golden mosaic (PepGMV) with a 100% of identity, and in cucurbit plants the cucurbit leaf crumble (CLCrV) was de begomovirus more common with 97% of identity.

In order to detect the presence of *Begomoviruses* and *Criniviruses* in the states of Coahuila and Durango, nucleic acid extraction and amplification with degenerate oligonucleotides were performed for *Begomoviruses*. In the identification of the CYSDV, we used a set of specific primers for this specie of the genus *Crinivirus*. The amplification was carried out by the PCR technique, and the amplified fragments were sequenced and analyzed by BLAST confirming the presence of cucurbit leaf crumple virus (CLCrV) in melon, watermelon, cucumber and squash, pepper golden mosaic virus (PepGMV) in purslane and trompillo, and tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in mallow. CYSDV was detected during the June-August months of the 2015 and 2016 crop periods, but in this case weeds and whiteflies were not found as reservoirs of CYSDV. Mixed infections with *Begomovirus* and CYSDV were detected in samples of cucurbitaceae.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (herramienta de búsqueda de alineamientos básicos)
CP	Coat protein (cápside proteica)
CLCrV	Cucurbit Leaf Crumple Virus (virus del arrugamiento de la hoja de cucurbitáceas)
CYSDV	Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus (virus del achaparramiento amarillo de las cucurbitáceas)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensayo inmunológico ligado a enzima)
ICTV	International Committee for Taxonomy of Viruses (Comité Internacional de Taxonomía de Virus)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
ORF	Open Reading frame (marco de lectura abierto)
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PepGMV	Pepper Golden Mosaic Virus (virus del mosaico dorado del chile)
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reverso transcripción
TYLCV	Tomato Yellow Leaf Curl Virus (virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate, virus de la chuchara)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

RESUMEN

El cultivo y producción de cucurbitáceas en México es de gran importancia por la derrama económica que genera así como la mano de obra que utiliza, algunos cultivos de esta familia son considerados de alto nivel de exportación y contribuyen al desarrollo agropecuario del país. Sin embargo, estos cultivos se ven afectados por enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos siendo los virus de los más importantes. Los síntomas de enfermedades virales pueden manifestarse con mosaicos, clorosis, decoloración intervenal, enrollamiento de hojas, deformación de frutos y achaparramiento en los cultivos ocasionando daños y pérdidas económicas. Muchos de los virus fitopatógenos son transmitidos por insectos, entre los que se encuentra la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Genn.), a la cual se le considera una plaga cosmopolita, polífaga y de las más devastadoras, por su habilidad para adquirir y propagar una diversidad de virus a plantas sanas. Este insecto es capaz de transmitir muchas especies de virus pertenecientes a los géneros *Begomovirus*, *Ipomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus* y *Torradovirus*. Los *Begomovirus* son virus compuestos por DNA que producen enfermedades que causan pérdidas económicas importantes para los agricultores. Debido a las características de los virus fitopatógenos, a la diversidad de especies y de biotipos del complejo de *B. tabaci*, se utilizan técnicas moleculares para su identificación por su alta sensibilidad y reproducibilidad.

Palabras clave: cucurbitáceas, *Begomovirus*, mosca blanca, biotipos.

SUMMARY

The cucurbits in Mexico are of great importance because of the economic output they generate and the labor they use, some crops of this family are of high export levels that contribute to the agricultural development of the country. However, these crops are affected by diseases caused by different pathogens being viruses one of the most important groups, the symptoms of viral diseases can be manifested by mosaic, chlorosis, discoloration, leaf rolling, deformation of fruits, stunting in crops that end up causing damages and economic losses. Many of the phytopathogenic viruses are transmitted by insects, including the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.), which is considered a cosmopolitan, polyphagous and most devastating pest, so it has a greater probability of acquiring, mixing and propagate a variety of viruses to healthy plants. This insect is able to transmit many species of viruses belonging to the genera *Begomovirus*, *Ipomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus* and *Torradovirus*. *Begomoviruses* are viruses composed of DNA that produce diseases that cause significant economic losses for farmers. Due to the characteristics of phytopathogenic viruses, and diversity of species and biotypes of the *B. tabaci* complex, molecular techniques are used for their identification because of their high sensitivity and reproducibility.

Key words: cucurbitaceae, *Begomovirus*, whitefly, biotypes.

1.1. EL CULTIVO DE CUCURBITACEAS EN MÉXICO

La familia cucurbitácea comprende 120 géneros y 775 especies (Simpson, 2006). En México, el cultivo y consumo de cucurbitáceas es muy popular y por lo tanto tiene gran importancia económica. De acuerdo con el cierre del ciclo agrícola 2015, las cucurbitáceas de mayor importancia son pepino (*Cucumis sativus* L.), sandía (*Citrullus lanatus* Thumb.), melón (*Cucumis melo* L.) y calabaza (*Curcubita pepo* L.) sembrándose en varios estados del país entre los cuales se encuentran Sonora, Sinaloa, Michoacán, Durango, Coahuila y Nuevo León, que en conjunto abarcaron una superficie de más de 95 mil has de las cuales se obtuvo una producción con un valor de \$9,480 millones de pesos (SIAP, 2016). Durante el primer semestre del año 2016, el valor de las exportaciones mexicanas de hortalizas ascendió en un 23% del valor total de las exportaciones de productos agroalimentarios mexicanos a los EE.UU. El valor de exportación del pepino y la calabaza fueron \$314 y \$252 millones de dólares respectivamente (SAGARPA, 2016).

1.1.1. El Cultivo de Cucurbitáceas en la Región Lagunera

Los cultivos de melón, sandía y calabaza son las principales cucurbitáceas sembradas en la Región Lagunera, en el año 2015 se destinó una superficie de 6,364 has con un valor de producción de \$751,595 pesos lo cual es un valor económico significativo de la producción regional. Entre los principales municipios productores de estos cultivos en la Región Lagunera se encuentran Matamoros, San

Pedro y Francisco I. Madero en el estado de Coahuila, mientras que en Durango fueron Tlahualilo, Ceballos, Lerdo y Mapimi (SIAP, 2016).

1.2. VIROSIS EN CUCURBITACEAS

Actualmente se estima que hay cerca de 4,160 especies de virus de los cuales aproximadamente 1,000 son considerados fitopatógenos y nocivos para la agricultura por el impacto negativo que tienen en la producción de los cultivos, incluyendo a la familia de las cucurbitáceas que son susceptibles a por lo menos 59 virus (ICTV, 2017). Dependiendo de la interacción virus-huésped además de las condiciones ambientales, la respuesta de la planta a una infección viral puede ser asintomática o manifestar síntomas que incluyen patrones de mosaicos, clorosis, estrías o franjas, decoloración intervenal, enrollamiento de la hoja, cambio en el color de las flores; en frutos y otros órganos vegetales son visibles anillos cloróticos, achaparramiento, malformación, quebraduras, hundimientos y tumores en tallos (Gergerich y Dolja, 2006). Otro factor importante en la infección por virus son los vectores que pueden desempeñar un papel integral en el desarrollo y propagación de las enfermedades. La mayoría de estos virus son transmitidos por áfidos y mosca blanca (Gaba *et al.*, 2004; Lecoq y Desbiez, 2012). La mosca blanca es una plaga de gran impacto económico que afecta a los cultivos agrícolas en todo el mundo (Thompson, 2011). Este insecto es vector de varios virus comprendidos en cinco géneros, los *Begomovirus*, *Ipomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus* y *Torradovirus* (Verbeek *et al.*, 2013).

1.2.1. Genero *Begomovirus*

Los begomovirus pertenecen a la familia *Geminiviridae*, hasta el momento existen 322 especies de los cuales 10 son específicos de cultivos de cucurbitáceas (ICTV, 2017) son transmitidos por mosca blanca y sólo infectan a dicotiledóneas. Los *Begomovirus* se caracterizan por tener un genoma monopartita (DNA-A del genoma de 2,8 kb, con seis ORFs) o bipartita (DNA-A y DNA-B, iguales en tamaño) de cadena simple, el genoma se encapsida en partículas de alrededor 3018 nm que consiste en dos icosaedros incompletos. Estos pueden distinguirse molecularmente y son llamados virus del viejo y del nuevo mundo. Los *Begomovirus* del viejo mundo son monopartitos o bipartitos, conocidos hasta el momento alrededor de 100 especies tal es el caso del virus del enanismo clorótico de la sandía (Watermelon Chlorotic Stunt Virus, WmCSV) cuyo tamaño es cerca de 3 kb y principalmente infectan a plantas dicotiledóneas. Por el nuevo mundo existe el virus de la hoja enrollada de la calabaza (Squash Leaf Curl Virus, SLCV) que es similar a WmCSV excepto que como todos los virus del nuevo mundo carece ORF AV2 (Nawaz y Fauquet, 2009; Lecoq y Desbiez, 2012).

1.2.2. Otros Géneros

La mosca blanca es transmisora de virus compuestos de DNA y RNA que afectan principalmente a cucurbitáceas, estos géneros son *Crinivirus*, *Ipomovirus* y *Carlavirus*. Los *Crinivirus* son uno de los tres géneros en la compleja familia *Closteroviridae* que incluye 14 especies aceptadas (Adams y Carstens, 2012). Los virus de este género se limitan al floema de las plantas y son transmitidos de forma semipersistente por dos diferentes especies del género *Bemisia* (*B. tabaci* y *B. afer*) y

dos del género *Trialeurodes* (*T. vaporariorum* y *T. abutiloneus*). Este género tiene genomas de RNA de sentido positivo de una sola hebra de hasta ~ 20 kb, de los más grandes genomas entre los virus RNA de plantas, los cuales están encapsidiados en viriones largos flexibles, el genoma está compuesto de dos moléculas que son encapsidadas independientemente en viriones de dos longitudes (650 a 850 y 700 a 900 nm). Por lo tanto en la organización del genoma hay diferencias entre las especies de virus (Navas-Castillo *et al.*, 2014). Únicamente 4 especies de *Crinivirus* son capaces de infectar a cultivos de cucurbitáceas: El virus del amarillamiento clorótico de las cucurbitáceas (cucumber chlorotic yellow virus, CCYV), virus del amarillamiento y achaparramiento de las cucurbitáceas (cucurbit yellow stunting disorder virus, CYSDV), virus del pseudoamarillamiento de la remolacha (beet pseudoyellows virus, BPYV) y el virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga (letuce infectious yellowing virus, LIYV) (Abrahamian y Abu-Jawdah, 2014).

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la familia *Potyviridae* tiene 176 especies de las cuales cuatro pertenecen al género *Ipomovirus* (ICTV, 2016). Estos virus causan serias pérdidas en muchos cultivos alrededor del mundo incluyendo camote (*Ipomoea batatas*), cucurbitáceas principalmente en pepino, melón y sandía, además de tomate (*Solanum lycopersicum*). Se caracterizan por tener partículas filamentosas flexibles y genoma de RNA positivo de una sola hebra. Estos virus se transmiten por mosca blanca de manera no circulativa semipersistente, siendo los viriones retenidos en la superficie externa de las piezas bucales de los vectores por unos pocos días o semanas (Dombrovsky *et al.*, 2014). El género *Carlavirus* se agrupa dentro de la familia

Flaviviridae. Los viriones se caracterizan por ser filamentos flexibles aproximadamente de 610 a 700 nm de largo y de 12 a 15 nm de diámetro. El genoma es de RNA de cadena simple desde 7.4 hasta 8.5 kb (Gaspar *et al.*, 2008) y se transmiten por los áfidos, y dos de las 45 especies aceptadas son transmitidas de manera semi persistente por la mosca blanca, estas dos especies son el virus del moteado leve del caupí (cowpea mild mottle virus, CpMMV) y virus amarillamiento asociado del melón (melon yellowing-associated virus, MYaV) (Nagata *et al.*, 2005; Navas-Castillo *et al.*, 2011).

1.3. MOSCA BLANCA COMO VECTOR DE VIRUS

La mosca blanca es el vector mejor adaptado a un amplio rango de plantas huésped, se alimenta del floema de los cultivos y tiene una alta capacidad de dispersión, esta característica podría favorecer el incremento de nuevos haplotipos más agresivos (Brown, 2010). En consecuencia, tiene una mayor probabilidad de adquirir, mezclar y propagar una diversidad de virus a plantas nuevas, metaboliza de manera efectiva o se desintoxica, de los pesticidas y compuestos tóxicos vegetales lo que le ha conferido resistencia a una amplia gama de insecticidas. Es considerada un vector eficaz asociado a virus del floema (Rojas y Gilbertson, 2008). Existen 1300 especies de mosca blanca registradas, agrupadas en 120 géneros, siendo *Bemisia* y *Trialeurodes* los más significativos en la transferencia de virus de plantas (Dinsdale *et al.*, 2010).

Estos virus se han ido incrementando desde 1980, debido a la emergencia de los biotipos de *B. tabaci* y a su expansión a grandes rangos geográficos y plantas huésped (Verbeek *et al.*, 2013) ha considerada como una especie compleja y se compone de biotipos morfológicamente indistinguibles o especies que se pueden diferenciar en función de las características moleculares y biológicas; sin embargo una situación más complicada con los biotipos es que pueden diferir en la eficiencia de transmisión, compitiendo y desplazándose entre sí (Cuellar y Morales, 2006; Gilbertson *et al.*, 2015). Estudios realizados han reportado que el biotipo A exhibe una preferencia por frijol, algodón y Cucurbitaceae colonizando un gran número de endémicas y naturalizadas, mientras que el biotipo B muestra una prioridad por plantas pertenecientes a la familia Brassicaceae, Solanaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Verbenaceae y Euphorbiaceae, con una marcada propensión al algodón, berenjena, calabaza, tomate, lantanas y legumbres (Brown, 2010), sobresaliendo debido a su invasión cosmopolita (Perring, 2001). Este biotipo es señalado por ser causante de un desorden fisiológico en plantas de calabaza conocido como hoja plateada, que se caracteriza por una tonalidad plateada en las hojas y un blanqueamiento en los frutos que los hace poco atractivos para su comercialización (Nyoike *et al.*, 2008).

Brotos de *B. tabaci* se hicieron frecuentes en los cultivos de hortalizas y de fibra en los trópicos y subtrópicos. Las enfermedades de tipo viral se convirtieron en un problema en el algodón en Sudán, en los cultivos de hortalizas en la India, y en la yuca en toda África. En Brasil, los virus transmitidos por la mosca blanca causaron daños a los cultivos de soya y tomate; así como en toda América Latina y los

rendimientos de los cultivos de frijol de la Cuenca del Caribe se redujeron por el virus del mosaico dorado del frijol (bean golden yellow mosaic virus, BGYMV) mientras que en el suroeste de EE.UU., el virus de la hoja del algodón (cotton leaf crumple virus) afectó la calidad de la fibra y los rendimientos del algodón se vieron reducidos. Desde entonces, la importancia económica de *B. tabaci* como plaga y vector ha seguido aumentando (Brown, 2010). La habilidad de infección que tiene la mosca blanca se debe al tipo de transmisión. La transmisión semipersistente requiere de minutos a horas para la adquisición y tiene un tiempo de retención en el interior del intestino de horas a días. En contraste, la transmisión persistente necesita horas para obtener el virus y se mantiene en la hemolinfa de unos días a toda la vida del insecto. En el caso de la transmisión persistente del virus puede o no puede replicarse en el insecto (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

La mosca blanca de los invernaderos, *T. vaporariorum* (Westwood) es también una de las plagas polífagas importantes, este insecto ya se ha consolidado en el ecosistema de invernaderos en particular tomate, cereza y pepinos, así como plantas ornamentales (Choi *et al.*, 2003). En todo el mundo estas especies causan pérdidas de miles de millones de dólares al año al alimentarse de la savia de la planta y con la transmisión de los virus fitopatógenos. En el norte de China, *T. vaporariorum* fue la especie predominante de mosca blanca en invernaderos desde mediados de 1970 a 1990. Sin embargo, desde la invasión de China por el biotipo B, las densidades de *T. vaporariorum* disminuyeron considerablemente. Algunas enzimas de desintoxicación y del aparato digestivo han sido estudiadas previamente para explicar por qué el biotipo B desplazó a *T. vaporariorum* (Lucatti *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010).

1.4. DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN CUCURBITACEAS Y EN MOSCA BLANCA

En términos generales, los virus son muy pequeños en comparación con otros grupos de patógenos de plantas como algunos hongos y bacterias que pueden ser visualizados con el microscopio de barrido, poseen una capsida proteica y un ácido nucleico, DNA o RNA, que lleva la información genética. Entre las técnicas de detección de virus fitopatógenos se encuentran, los ensayos basados en proteínas como la inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA) y los métodos basados en ácidos nucleicos como la PCR y sus modalidades como es la RT-PCR y PCR tiempo real (Joo-Jin *et al.*, 2014).

1.4.1. ELISA

La EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) describe la técnica ELISA como la más utilizada en pruebas de virología para la detección y/o identificación de virus. Es conveniente debido a la amplia cantidad de muestras con las que se puede trabajar para la detección de los patógenos. Comúnmente las ELISA's se llevan a cabo en una placa de poliestireno donde sucede una asociación enzima-sustrato. En la actualidad, existen diversos tipos de ELISA como: sandwich de doble anticuerpo (DAS-ELISA), sandwich de doble anticuerpo indirecto (ELISA indirecta), y sandwich de triple anticuerpo (TAS), además de la impresión de tejido (inmunoprint) (Joo-Jin *et al.*, 2014; EPPO, 2015).

1.4.2. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es uno de los métodos moleculares más utilizados por su alta sensibilidad y especificidad para la detección viral. El diseño de cebadores permite poner a punto el nivel específico de la reacción.

Por lo tanto, si los cebadores están dirigidos a regiones fuertemente conservadas esta técnica permitirá la amplificación de secuencias genómicas de varios miembros de un género de virus como es el caso de los Geminivirus (Olmos *et al.*, 2007) Por lo general, los productos de PCR se detectan mediante electroforesis en gel (Cambra *et al.*, 2006). Utilizando esta herramienta se logró reportar la presencia del virus de la hoja arrugada de las cucurbitáceas (cucurbit leaf crumple virus, CLCrV), en el Valle Imperial de California en cultivos de sandía, melón y calabaza (Hagen *et al.*, 2008). Otra gran aportación fue la caracterización del virus del achaparramiento clorótico de la sandía (watermelon chlorotic stunt virus, WmCSV) en muestras de melón y sandía en Jordán (Al-Musa *et al.*, 2011). La identificación de especies y biotipos de mosca blanca también ha sido posible con esta técnica con oligonucleótidos basados en el gen citocromo oxidasa I del DNA mitocondrial (mtCOI) (Boykin y de Barro, 2014), de esta manera Shatters *et al.* (2009) utilizaron cebadores específicos para determinar los biotipos B, Q, y nuevo mundo, resultando de gran éxito, como también un par de iniciadores universales para la familia Aleyrodidae.

1.4.3. RT-PCR

Muchos ensayos se han desarrollado para la detección y cuantificación de virus compuestos de RNA que requieren de la enzima transcriptasa inversa como una etapa previa de la PCR. La RT-PCR es sensible, específica, y fiable (Lopez *et al.*, 2008). Álvarez *et al.* (2012) identificaron el virus del amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) en plantas de melón y sandía, así como en mosquita blanca colectada en varias localidades en los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León, mediante esta técnica y el uso de oligonucleótidos específicos que amplifican

regiones conservadas que codifican para las proteínas p22, de choque térmico y la cápside del CYSDV. Otro *Crinivirus* fue determinado en Japón por Okuda *et al.* (2010) en diferentes especies de cucurbitáceas empleando la RT-PCR que es conocido como el virus del amarillamiento clorótico de las cucurbitáceas (cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV). En Tanzania se logró determinar el virus del aclaramiento de la neervadura del pepino (cucumber vein clearing virus, CuVVCV) por Menzel *et al.* (2011) quienes concluyeron que el CuVVCV debe considerarse como una especie nueva dentro del género *Carlavirus*, detectándose solo en plantas de pepino y se conoce que es transmitido por la mosca blanca.

1.4.4. PCR tiempo real

La técnica de PCR tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) ha sido implementada para cuantificar en tiempo real la amplificación de un patógeno de interés. A diferencia de la PCR convencional, en esta técnica se utilizan sondas específicas para detectar patógenos de diversa naturaleza, y ha tomado gran ventaja sobre otras técnicas debido a su rapidez, reproducibilidad, eficiencia y sensibilidad en la amplificación en tiempo real, reduciendo el riesgo de contaminación. Esta herramienta se ha utilizado para conocer la especie de virus en estudios realizados en países donde las enfermedades virales han provocado pérdidas en cultivos de importancia económica (Abrahamian y Abou-Jawdah, 2013). Los mismos autores detectaron el virus de la hoja rizada de la calabaza (squash leaf curl virus, SLCV) hasta en 18 fg de ácido nucleico total y 30 unidades genómicas, siendo 1000 veces más sensible que la PCR, el virus se encontró en una amplia gama de cucurbitáceas así como en moscas blancas virulentas con la utilización de sondas TaqMan.

Este método ha sido aplicado para cuantificar los virus de RNA en especies de áfidos abriendo nuevas posibilidades en virología de plantas y en la epidemiología (Cambra *et al.*, 2006). Como tal, permite los estudios relacionados a mosca blanca como vector de virus, por lo que Gil-Salas *et al.* (2007) concluyeron en su investigación, que una mosca blanca es capaz de transmitir dos especies de virus, en su caso fueron el CVYV y CYSDV. Sin embargo la técnica es igualmente eficaz con SYBER Green como lo reportó Pico *et al.* (2005) en España logrando resultados favorables identificando el CVYV usando iniciadores específicos destinados a la secuencia del gen Nlb, con resultados que demuestran claramente que el uso de la SYBR Green en el procedimiento de q-PCR es un método robusto, sensible y preciso para discriminar entre genotipos resistentes y susceptibles parcialmente al CVYV.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamian, P. E. and Y. Abou-Jawdah. 2013. Detection and quantitation of the new world squash leaf curl virus by TaqMan real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 191: 76– 81.
- Abrahamian, P. E. and Y. Abou-Jawdah. 2014. Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Disease* 25: 26–38.
- Adams, M. J. and E. B. Carstens. 2012. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives Virology* 157:1411–1422.

- Al-Musa, A., G. Anfoka, A. Al-Abdulat, S. Misbeh, F. Haj Ahmed, and I. Otri. 2011. Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): a serious disease threatening watermelon production in Jordan. *Virus Genes* 43:79-89.
- Álvarez-Ojeda, M. G., C. E. Guerrero-Gámez, A. Morales-Loredo, Y. I. Chew-Madinaveitia, H. Gutiérrez-Mauleón, y O. G. Alvarado-Gómez. 2012. Detección por RT-PCR del virus del amarillamiento y enanismo en cucurbitáceas (CYSDV) del centro-norte de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 43–47.
- Boykin, L. M. and P. J. de Barro. 2014. A practical guide to identify in members of the *Bemisia tabaci* species complex: and other morphologically identical species. *Phylogenetics, Phylogenomics, and Systematics* 2:1-5.
- Brown, J.K. 2010. Phylogenetic Biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. *In*: P. A. Stansly and S. E. Naranjo (ed.). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer. pp. 31-67.
- Cambra, M., E. Bertolini, A. Olmos, and N. Capote. 2006. Virus Diseases and Crop. *In*: I. Cooper, T. Kuhne, and V. P. Polishchuk (ed.). *Biosecurity Molecular Methods for Detection and Quantitation of Virus in Aphids*. Netherlands. Springer. pp. 81-88.
- Choi, W., E. Lee, C. B. Choi, P. H. Park, and Y. Ahn. 2003. Toxicity of plant essential oils to *T. vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal Economic Entomology* 96:1479-84.
- Cuellar, M. E. y F. J. Morales. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vector de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Colombiana de Entomología* 32: 1-9.

- Dinsdale, A., L. Cook, C. Riginos, M. Buckley, and J. P. de Barro. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase I to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103:196-208.
- Dombrovsky, A., V. Reingold, and Y. Antignus. 2014. *Ipomovirus* an atypical genus in the family *Potyviridae* transmitted by whiteflies. *Pest Management Science* 70: 1553-1567.
- EPPO. 2015. ELISA tests for viruses. Diagnostic protocol PM 7/125 (1). European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Bulletin* 45: 445–449.
- Gaba, V., A. Zelcer, and A. Gal-on. 2004. Invited review: cucurbit biotechnology the importance of virus resistance. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 40:346-358.
- Gaspar, J. O., P. Belintani, A. M. R. Almeida, and E. W Kitajima. 2008. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct *Carlavirus* species. *Journal of Virological Methods* 148:283–285.
- Gergerich, R. C. and V. S. Dolja. 2006. Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
- Gil-Salas, F. M., J. Morris, A. Colyer, G. Bud, I. M. Cuadrado, and D. Janssen. 2007. Development of real-time RT-PCR assays for the detection of Cucumber vein yellowing virus (CVYV) and Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Journal of Virological Methods* 146: 45-51.

- Gilbertson, R. L., O. Batuman, C. G. Webster, and S. Adkins. 2015. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *The Annual Review of Virology* 2:67–93.
- Hagen, C., M. R. Rojas, M. R. Sudarshana, B. Xoconostle Cazares, E. T. Natwick, T. A. Turini, and R. L. Gilbertson. 2008. Biology and molecular characterization of Cucurbit leaf crumple *virus*, an emergent cucurbit-infecting begomovirus in the Imperial Valley of California. *Plant Disease* 92:781-793.
- International Comitee on Taxonomy of Virus. Recuperado marzo de 2017. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Joo-jin, J., J. Ho-jong, and N. Jaejong. 2014. A Review of detection methods for the plant viruses. *Research Plant Disease* 20: 173-181.
- Lecoq, H. and C. Desbiez. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever changing picture. In: Gad L, Herve´ L (ed.). *Advances in Virus Research*. London: Academic Press. pp. 67–126.
- Lopez, M. M., P. Llop, A. Olmos, E. Marco Noales, M. Cambra, and E. Bertolini. 2008. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. *Current Issues in Molecular Biology* 11: 13-45.
- Lucatti, A. F., A. E. Alvarez, C. R. Machado, and E. Gilardón. 2010. Resistance of tomato genotypes to the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: *Aleyrodidae*). *Neotropical Entomology* 39:792-798.

- Menzel, M., M. M. Abang, and S. Winter. 2011. Characterization of cucumber vein-clearing virus, a whitefly (*Bemisia tabaci* G.) transmitted Carlavirus. *Archive Virology* 156:2309–2311.
- Nagata, T., D. M. T. Alves, A. K. Inoue-Nagata, T. Y. Tian, E. W. Kitajima, J. E. Cardoso, and A. C. de Avila. 2005. A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. *Archives of Virology* 150:379–87.
- Navas-Castillo, J., E. Fiallo-Olive, and S. Sánchez-Campos. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review Phytopathology* 49:219-248.
- Navas-Castillo, J., J. J. López Moya, and M. A. Aranda. 2014. Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Annals of Applied Biology* 165: 155–171.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S. and C. M. Fauquet. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters* 583:1825–1832.
- Nyoike, T., O. Liburd, and S. Webb. 2008. Suppression of whiteflies, (Hemiptera: Aleyrodidae) and incidence of a whitefly-transmitted virus of zucchini squash new to Florida, with mulches and imidacloprid. *Florida Entomologist* 91:460-465.
- Okuda, M., S. Okazaki, S. Yamasaki, S. Okuda, and M. Sugiyama. 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. *Phytopathology* 100:560-566.
- Olmos, A., N. Capote, E. Bertolini, and M. Cambra. 2007. Biotechnology and plant disease management. *In*: Z.K. Punja, S.H. De Boer, and H. Sanfaçon (ed.). *Molecular Diagnostic Methods for Plant Viruses*. CABI. pp. 227-249.

- Perring, T. M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 20:725-737.
- Pico, B., A. Sifres, and F. Nuez. 2005. Quantitative detection of Cucumber vein yellowing virus in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 128:14–20.
- Rojas, M. R. and R. L. Gilbertson. 2008. Emerging Plant Viruses: a Diversity of Mechanisms and Opportunities. *In*: M. J. Roossinck (ed.). *Plant Virus Evolution*. Springer. pp. 27-51.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2016. Balanza comercial agroalimentaria. Recuperado el 31 de marzo de 2017, <http://www.sagarpa.com.mx>.
- SIAP. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Recuperado abril de 2017 <http://www.sagarpa.com.mx>.
- Shatters, R., C. Powell, L. Boykin, H. Liansheng, and McKenzie. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype specific mitochondrial cytochrome oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal Economic Entomology* 102:750-758.
- Simpson, M. G. 2006. *Plant Systematics*. Burlington, MA, USA. Elsevier. pp. 259-262.
- Thompson, W. M. O. 2011. Introduction: Whiteflies, Geminiviruses and recent events. *In*: W. M. Thompson (ed.). *The Whitefly, Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants*. Netherlands. Springer. pp.1-13.

Verbeek, M., P. J. Van Bekkum, A. M. Dullemans, and R. A. Van der Vlugt. 2013.

Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vector. *Virus Research* 186: 55–60.

Yan, Y., L. Peng, W. X. Liu, F. H. Wan, and M. K. Harris. 2011. Host plant effects on alkaline phosphatase activity in the whiteflies, *Bemisia tabaci* Biotype B and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Insect Science* 11:9.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN DE BIOTIPOS DEL COMPLEJO *BEMISIA TABACI* (Genn.) Y SUS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS, EN COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO

Publicado en Southwestern Entomologist 42(2):523-530, 2017

RESUMEN

La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Genn.) transmite begomovirus a cucurbitáceas en la Comarca Lagunera de Coahuila y Durango, México. *B. tabaci* es una plaga que causa daños al alimentarse de la savia de las plantas y tiene la capacidad de transmitir virus, se caracteriza por ser un complejo de especies crípticas morfológicamente indistinguibles que pueden ser reconocidas por medio de técnicas moleculares. Durante los años 2015 y 2016, se analizaron moscas blancas para identificar los biotipos B, Q y nuevo mundo por PCR múltiple usando primers específicos basados en el gen mitocondrial citocromo oxidasa I. También se determinó la presencia de *Begomovirus* en especímenes de mosca blanca y en plantas colectadas en localidades productoras de Coahuila y Durango, mediante el uso de PCR con oligonucleotidos degenerados. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo al ser comparadas con la base de datos del GenBank del NCBI, corroboraron la identificación del biotipo B con una similitud del 100% con secuencias tipo. En las muestras de 2015 se determinó que el *Begomovirus* predominante en las moscas blancas fue el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) con 100% de similitud; mientras que en 2016 prevaleció el virus de la hoja arrugada de las cucurbitáceas (CLCrV) con un 97% de similitud.

Palabras clave: mosca blanca, biotipos, *Begomovirus*

SUMMARY

Whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) transmit *Begomovirus* to cucurbit crops in Coahuila and Durango, Mexico. *B. tabaci* is a pest that cause injury by feeding of the plants and transmit viruses. It is characterized as a complex of cryptic species composed of morphologically indistinguishable biotypes that can be recognized by molecular techniques. During 2015 and 2016 years, *B. tabaci* specimens were analyzed to identify B, Q, and New World biotypes using multiplex-PCR and specific primers based on the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. The presence of *Begomovirus* in insects and plants collected in Coahuila and Durango fields was also determined with the use of degenerated primers. The sequences obtained were compared with the NCBI GenBank database, corroborating biotype B with a similarity of 100% with type sequences. In 2015, the *Begomovirus* determined with 100% similarity to be the Pepper golden mosaic virus (PepGMV), and with 97% similarity to be the Cucurbit leaf crumple virus (CLCrV) in 2016.

Key words: whitefly, biotypes, *Begomoviruses*

2.1. INTRODUCCIÓN

Mosca blanca es el nombre con el que se conoce a un complejo de especies pertenecientes a la familia Aleyrodidae (Carapia y Castillo, 2013). Existen numerosas especies de mosca blanca, pero los géneros *Bemisia* y *Trialeurodes* son los más eficientes en la transmisión de virus a plantas. De las especies conocidas de este insecto, *B. tabaci* es la de mayor distribución e importancia económica ya que se

ubica en zonas tropicales, subtropicales, y templadas del mundo; su gama de hospederos es amplia reportándose en más de 600 especies de plantas pertenecientes a 74 familias. Esta característica se asocia con la diversidad de biotipos de la especie (Palaniswami y Henneberry, 2011), lo que la convierte en un grave problema al causar daños económicos a muchos cultivos hortícolas (Thompson, 2011).

B. tabaci se considera actualmente un complejo de especies crípticas compuesto por al menos 24 biotipos indistinguibles morfológicamente, los cuales se han reconocido principalmente con base en el uso de PCR, RAPD, el gen mitocondrial citocromo oxidasa (COI) y el espaciador interno transcrito, ITS (Dinsdale *et al.*, 2010, Gil y Brown, 2010, De Barro, 2011, Alemandri *et al.*, 2015). El biotipo A también conocido como biotipo del nuevo mundo, se ha adaptado a diferentes hábitats, su reproducción es moderada y se dispersa a distancias muy cortas. En contraste el biotipo B, también conocido como *Bemisia argentifolii*, prevalece en climas secos, tiene alta fecundidad y se dispersa a largas distancias (Perring, 2001; Brown, 2010); resultando en el desplazamiento del biotipo A. Después de diez años de la aparición del biotipo B, fue descubierto el llamado biotipo Q, el cual también tiene la capacidad para expandirse rápidamente, causando daños y pérdidas significativas en las cosechas de cultivos importantes al superar los efectos de los insecticidas (Thompson, 2011). Las especies del género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) son patógenos emergentes de los cultivos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El género comprende 288 especies reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV por sus siglas

en inglés, de las cuales 8 son hospedadas en plantas cucurbitáceas (Jones *et al.*, 2003, Brown *et al.*, 2015). En 1990 se observaron las primeras infecciones por *Begomovirus* en Sonora y en 1992 en Sinaloa México, identificando al *Begomovirus* del enrollamiento foliar de la calabaza (*squash leaf curl virus*, SLCV), afectando calabazas (Morales, 2011).

Con el descubrimiento y avance de las técnicas moleculares se han podido comparar regiones de ADN genómico para fines taxonómicos. Son pocos los reportes sobre los biotipos de mosca blanca presentes en México asociadas con la presencia de *Begomovirus*, y menos aún referidos a plantas de la familia cucurbitáceas, por lo que se llevó a cabo esta investigación con el objetivo de identificar los biotipos de *B. tabaci* y las especies de *Begomovirus* transmitidas a cultivos de cucurbitáceas en Coahuila y Durango, México.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Colecta de mosca blanca

Se realizó la recolección de especímenes de mosca blanca en los años 2015 y 2016 en los municipios de Matamoros y San Pedro en Coahuila, y en los municipios de Tlahualilo y Lerdo en el estado de Durango. Se colectaron adultos en predios de melón (*Cucumis melo* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* Thunb) establecidos a cielo abierto, y pepino (*Cucumis sativus* L.) bajo casas sombras. Los insectos se colocaron en grupos variables entre 30 y 100 especímenes

por frasco separando por localidad, y se mantuvieron en alcohol al 80 % para su análisis posterior.

2.2.2 Identificación de biotipos

La extracción de DNA se hizo de manera individual para cada espécimen utilizando el kit DNAzol ES^{MR} (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), utilizando el protocolo del fabricante y las concentraciones de DNA fueron registradas utilizando un nanodrop^{MR} (Thermo Scientific, Wilmington, DE). La identificación de biotipos de mosca blanca se determinó siguiendo el protocolo de Shatters *et al.* (2009), con pequeñas modificaciones, el cual se basa en la amplificación por PCR del gen citocromo oxidasa I del ADN mitocondrial (ADNmt) utilizando oligonucleótidos específicos para los biotipos B, Q y nuevo mundo (Cuadro 1). El programa de temperaturas utilizado fue 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C 30 s, 64°C 1 min, y 72°C 1 min. Se dio una extensión final de 72°C durante 10 min.

2.2.3. Identificación de *Begomovirus*

La identificación de *Begomovirus* a nivel de especie, se hizo con una combinación de oligonucleótidos degenerados, descritos por Wyatt y Brown (1996) y Zhang *et al.* (2008), mediante la amplificación del gen que codifica para la proteína de la cápside, utilizando los primers degenerados prV324 y CoPR (Cuadro 1) siguiendo un programa con una temperatura inicial de 94°C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C 60 seg, 50°C 45 seg, y 72°C 45 seg; con una temperatura de 72°C de extensión final por 6 min. Para la amplificación del DNA se utilizó un termociclador ThermoTM (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y la visualización de los productos amplificados se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%

a 62 volts por 5 minutos seguido de 100 volts por 40 minutos, y fue observado en un transiluminador de luz UV^{MR} (Labnet, Edison, NJ). Se secuenciaron muestras representativas de DNAm_t de los diferentes biotipos de mosca blanca, así como de los productos de PCR de los *Begomovirus* encontrados, y las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank.

Cuadro 1. Primers utilizados para la identificación de biotipos de mosca blanca y *Begomovirus* por PCR.

Primer	Secuencia (5' a 3')	Especificidad	Talla esperada (pb)
BioB-L	CTAGGGTTTATTGTTTGAGGTCATCATATATTC	Biotipo B	478
BioB-R	AATATCGACGAGGCATTCCCCCT	Biotipo B	
BioQ-L	CTTGGTAACTCTTCTGTAGATGTGTGTT	Biotipo Q	303
BioQ-R	CCTTCCCGCAGAAGAAATTTTGTTT	Biotipo Q	
Nm-L	TACTGTTGRAATAGATGTTCACTCGGG	n. mundo	403
Nm-R	GGAAAAAATGTCAGRTTACTCCWCAAATATT	n. mundo	
prV324	GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG	<i>Begomovirus</i>	576
CoPR	GANGSATGHGTRCADGCCATATA	<i>Begomovirus</i>	

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Identificación de biotipos y *Begomovirus* de mosca blanca

Al analizar individualmente 68 especímenes de mosca blanca colectadas en cucurbitáceas en Coahuila y Durango por PCR, predominó el biotipo B de acuerdo con la talla de los amplicones obtenidos (478 pb, Fig. 1A). No se encontraron especímenes de los biotipos Q y nuevo mundo. La detección de *Begomovirus* resultó en fragmentos de aproximadamente 576 pb comprobándose la presencia de este género de virus en 2015 y 2016.

Después de secuenciar los productos de PCR del ADN de las moscas blancas y los *Begomovirus* se compararon con las secuencias del GenBank y se encontró en las muestras de 2015 una similitud de 100% con el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) (Fig. 1B) y en las del año 2016 el virus de la hoja arrugada de las cucurbitáceas (CLCrV) tanto en plantas como en insectos.

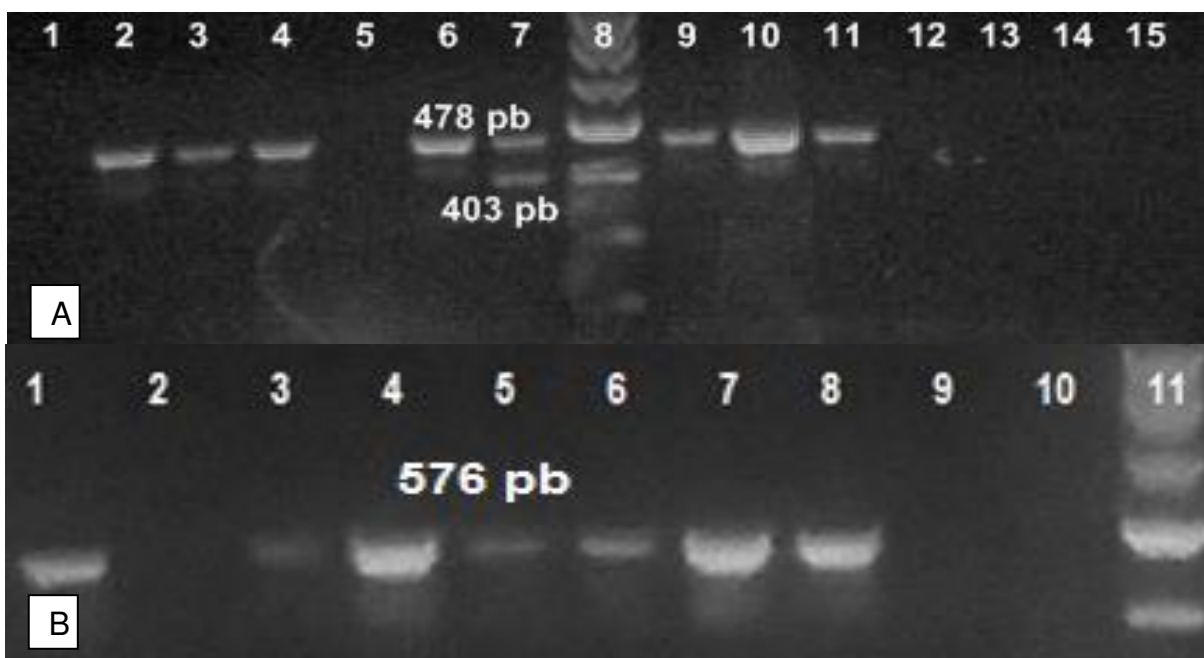


Figura 1. A) Amplificación por PCR múltiple a partir del DNA de mosca blanca usando primers específicos para cada biotipo. Carriles 1-6 y 9-15 DNA de mosca blanca, 7 control positivo y 8 marcador de peso molecular escalera-100 pb (Axygen^{MR}). B) Amplificación por PCR a partir del DNA de mosca blanca usando primers para *Begomovirus*. Carriles 1-8 ADN de mosca blanca, 9 y 10 controles negativos (sin ADN) y 11 marcador de peso molecular escalera-100 pb (Axygen^{MR}).

2.4. DISCUSIÓN

Únicamente se identificó la presencia del biotipo B (*Bemisia argentifolii*) en calabaza, melón, pepino, y sandía; lo que es razonable considerando que normalmente las condiciones climáticas de la región del estudio son adecuadas para

su establecimiento, ya que este biotipo prevalece en climas secos y con altas temperaturas, se establece en monocultivos irrigados, se dispersa a largas distancias para alimentarse, y tiene una amplia gama de hospederos de las familias Cruciferae, Solanaceae, Cucurbitaceae y Malvaceae (Brown, 2010).

Los virus causan pérdidas significantes a estos cultivos y siguen siendo una amenaza para la producción (Fererres, 2015). Los vectores de los virus pueden desempeñar un papel integral en el desarrollo y propagación de las enfermedades; tal es el caso de la mosca blanca (Lecoq y Desbiez, 2012) que transmite alrededor de 14 virus a cucurbitáceas (ICTV, 2016), los que incluye *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus* y *Carlavirus* (Navas *et al.*, 2011). La PCR permite altos niveles de especificidad para la identificación de virus en plantas, y aumentan la comprensión de su ecología y epidemiología (Martin *et al.*, 2000). Durante el desarrollo de este trabajo se detectó al género *Begomovirus* con los primers reportados por Wyatt y Brown (1996) y Zhang *et al.* (2008), y usando la secuenciación se pudo identificar a los virus PepGMV y CLCrV, obteniendo un fragmento de 576 pb que es la talla esperada. El CLCrV se detectó en moscas blancas encontradas en melón, pepino, sandía, y calabaza en el municipio de Matamoros, Coahuila en 2016. Ya existían reportes del virus CuLCrV en Estados Unidos y el norte de México (Brown *et al.*, 2002). Este *Begomovirus* es considerado emergente y económicamente importante, y los síntomas que provoca en cucurbitáceas son arrugamiento de las hojas, clorosis y desórdenes en el crecimiento. El rango de cultivos hospederos es principalmente cucurbitáceas como calabaza, melón, pepino, sandía, pero también se ha encontrado en frijol (Hagen *et al.*, 2008).

El PepGMV se encontró en Durango y Coahuila en moscas blancas en melón en 2015. A pesar de su abundancia en las moscas, este virus no se detectó en plantas de melón, lo que pudiera estar de acuerdo con la falta de reportes de este cultivo como hospedero del PepGMV, ya que este begomovirus solo se ha reportado en algunas partes de México infectando Solanaceas como tomate y chile, que son sus hospederos principales, aunque también se han detectado en malezas (Holguín-Peña *et al.*, 2004).

El protocolo de PCR convencional y los primers utilizados fueron eficientes para la detección de begomovirus lográndose la identificación del CLCrV y PepGMV mediante secuenciación, lo cual es importante porque los productores no tienen otra alternativa para la identificación de *Begomovirus*, aunque el diagnóstico por PCR requiere de equipo especializado, en México hay una red de laboratorios que pueden adaptar estos protocolos, inclusive hacerlo a nivel de insecto lo cual pudiera ser de mayor utilidad al anticipar el diagnóstico de enfermedades antes de que se diseminen.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Alemandri, V., C. G. Vaghi-Medina, A. D. Dumón, E. B. Argüello-Caro, M. F. Mattio, S. García-Medina, P. M. López-Lambertini, and G. Truol. 2015. Three members of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) cryptic species complex occur sympatrically in Argentine horticultural crops. *J. Econ. Entomol.* 105: 1-9.

- Brown, J. K. 2010. Phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group, pp. 31-67. In P. A. Stansly and S. E. Naranjo [ed.], *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer, Netherlands.
- Brown, J. K., A. M. Idris, C. Alteri, and 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: 734-742.
- Brown, J. K., F. Murilo-Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J. C. F. Silva, E. Fiallo-Olive, R. W. Briddon, C. Hernández-Zepeda, A. Idris, V. G. Malathi, D. P. Martin, R. Rivera-Bustamante, S. Ueda, and A. Varsani. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160: 1593-1619.
- Carapia R., V. E., y A. Castillo G. 2013. Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Zool. Mex.* 29: 178-193.
- De Barro, P. J. 2011. *Bemisia tabaci*, the capacity to invade, pp. 181-204. In W. M. O. Thompson [ed.], *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer, Netherlands.
- Dinsdale, A., L. Cook, C. Riginos, M. Buckley, and J. P. de Barro. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase I to identify species level genetic boundaries. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103: 196-208.

- Fereres, A. 2015. Perspective insect vectors as drivers of plant virus emergence. *Current Opinion in Virology* 10: 42-46.
- GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Gil, R. J., and J. K. Brown. 2010. Systematics of *Bemisia* and *Bemisia* relatives: Can molecular techniques solve the *Bemisia tabaci* complex conundrum – A taxonomist's viewpoint, pp. 5-29. *In* P. A. Stansly and S. E. Naranjo [ed.], *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer. Netherlands.
- Hagen, C., M. R. Rojas, M. R. Sudarshana, B. Xoconostle-Cazares, E. T. Natwick, T. A. Turini, and R. L. Gilbertson. 2008. Biology and molecular characterization of Cucurbit leaf crumple virus, an emergent cucurbit-infecting begomovirus in the Imperial Valley of California. *Plant Dis.* 92: 781-793.
- Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, y R. F. Rivera-Bustamante. 2004. Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en Baja California Sur, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22: 206-215.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 195-219.
- Lecoq, H. and C. Desbiez. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever changing picture, pp. 67-126. *In* G. Loebenstein and H. Lecoq [ed.], *Advances Virus Res.* Academic Press, London.

- Martin, R. M., J. Delano, and C. A. Lévesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 207-239.
- Morales, F. J. 2011. Interaction between *Bemisia tabaci*, begomoviruses, and plant species in Latin America and the Caribbean, pp. 15-49. *In* W. M. O. Thompson [ed.], *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer, Netherlands.
- Navas Castillo, J., E. Fiallo Olivé, and S. Sánchez Campos. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopat.* 49: 219-248.
- Palaniswami, M. S., and T. J. Henneberry. 2011. *Bemisia tabaci* (Genn.): biotypes and cassava mosaic virus in India, pp.121-163. *In* W. M. O. Thompson [ed.], *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer, Netherlands.
- Perring, T. M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.* 20: 725- 737.
- Shatters, R. G. Jr., C. A. Powell, L. M. Boykin, H. Liansheng, and C. L. McKenzie. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype specific mitochondrial cytochrome oxidase I polymerase chain reaction primers. *J. Econ. Entomol.* 102: 750-758.
- Thompson, W. M. O. 2011. Introduction: whiteflies, geminiviruses and recent events, pp. 1-13. *In* W. M. O. Thompson [ed.], *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer, Netherlands.

- Wyatt, S. D. and J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.
- Zhang, Y. P., M. W. Zhu, H. M. Cui, Y. Qiu, K. Sha, Y. H. Wan, L. Y. Zhu, L. Yu, and Z. Hui. 2008. Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China. *Virus Genes* 36: 547-551.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN DE *BEGOMOVIRUS* EN CUCURBITACEAS Y MALEZAS EN LA REGIÓN LAGUNERA DE COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO

RESUMEN

Durante los años 2015 y 2016 se observaron síntomas de enfermedades virales en algunas localidades productoras de cucurbitáceas en la Región Lagunera de Coahuila y Durango en malezas, así como en plantas de calabaza, melón, pepino y sandía sembradas bajo condiciones de cielo abierto y malla sombra. Con la finalidad de detectar e identificar la presencia de *Begomovirus* en esa región, se colectaron plantas de los cultivos mencionados así como de malezas intercaladas y circundantes a los predios visitados. Se realizó la extracción de DNA y se amplificó con oligonucleótidos genéricos degenerados para *Begomovirus* mediante la técnica de PCR punto final. Se analizaron 125 muestras de cucurbitáceas de interés y 17 muestras de malezas. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y analizados mediante BLAST confirmando así la presencia del virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (CLCrV) en melón, sandía, pepino y calabaza, el geminivirus de la sandía (WmGV) en calabaza, el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en verdolaga y trompillo, y el virus del enrollamiento de la hoja amarilla (TYLCV) en malva.

Palabras clave: *Begomovirus*, oligonucleótidos degenerados, malezas, cucurbitáceas.

SUMMARY

In the 2015 and 2016 years, symptoms of viral diseases were observed in some production areas in Lagunera Region, in weeds, pumpkin, cantaloupe, cucumber and watermelon planted under open sky and shade cloth. In order to identify the presence of *Begomovirus* in the states of Coahuila and Durango, plants of above mentioned crops and weeds were collected. The nucleic acid extraction and PCR amplification was done with degenerate oligonucleotides for *Begomovirus* genus. One hundred and twenty five samples of cucurbits and 17 of weeds were analyzed. The amplified fragments were sequenced and analyzed using BLAST, confirming the presence of cucurbit leaf crumple virus in cantaloupe, watermelon, cucumber and squash; watermelon geminivirus in pumpkin; pepper golden mosaic virus in purslane and nightshade; and tomato yellow leaf curl virus in mauve.

Keywords: *Begomovirus*, degenerate oligonucleotides, weeds, cucurbits

3.1. INTRODUCCIÓN

En la Región Lagunera que comprende los estados de Coahuila y Durango, se sembraron en el año 2014 aproximadamente 7, 600 ha de especies de la familia cucurbitácea entre las cuales sobresalen melón (*Cucumis melo* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) (SIAP, 2014). Estos cultivos se ven afectados por diversas enfermedades que son el principal factor limitante de la producción causando pérdidas económicas. La mayoría de las enfermedades transmitidas por virus, requieren de un vector que los disemine en hospederos susceptibles ya que se les considera patógenos obligados (Garzón *et al.*, 2007). El

Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV (por sus siglas en inglés) reportó la existencia de 288 especies del género *Begomovirus* de las cuales 8 son hospedadas en plantas cucurbitáceas (ICTV, 2015). Las enfermedades causadas por este género de virus constituyen un serio obstáculo para los agroecosistemas a nivel mundial, en los últimos años estos virus han sido una seria amenaza para diversos cultivos (Khan *et al.*, 2012). El principal vector de los *Begomovirus* es la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Navas-Castillo *et al.*, 2011), un insecto que se alimenta del floema de las plantas especialmente dicotiledóneas (Lugo *et al.*, 2011).

Actualmente existen reportes de diferentes especies de *Begomovirus* en México, por ejemplo en los estados de Sonora en 1990 y en Sinaloa en 1992 se presentó el virus del enrollamiento foliar de la calabaza (squash leaf curl virus, SLCV), afectando a calabaza (Morales, 2011), y el virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (cucurbit leaf crumple virus, CuLCrV) en Coahuila, México (Brown *et al.*, 2002). Los síntomas que provoca el virus CuLCrV en cucurbitáceas susceptibles son arrugamiento de las hojas, clorosis y desordenes en el crecimiento, y el rango de cultivos hospederos es principalmente la familia de las cucurbitáceas como la calabaza, melón, pepino, sandía pero también se ha encontrado en frijol, *Phaseolus vulgares* (Hagen *et al.*, 2008).

Si a la problemática anterior, agregamos que también se han encontrado como fuente significativa de inóculo primario de diferentes agentes virales especies vegetales silvestres, el problema se vuelve más complicado de resolver. En Sinaloa se reportó un grupo de virus presentes en pepino espinoso (*Cucumis dipsaseus*), melón silvestre (*Curcubita foetidissima*), pepino amargo (*Momordica charantia*) y

tabaco silvestre (*Nicotiana glauca*) (Félix *et al.*, 2007) mientras que en el estado de Baja California Sur, Holguín *et al.* (2004) encontraron como hospederos alternos del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) al toloache (*Datura discolor*) y la manzanita del Perú (*Nicandra physaloides*). Wintermantel *et al.* (2009) detectaron un grupo de malezas hospederas del CYSDV, aun cuando este no pertenece al género *Begomovirus*, se demuestra como las malezas son un principal foco de propagación de virus fitopatógenos, dentro de este grupo se encontró la especie malva alcalina (*Sida hederácea*), *Physalis wrightii* y *Cucurbita foetidissima* conocida en México como calabacilla loca.

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de regiones conservadas de los componentes de los *Geminivirus*, han permitido diseñar nuevos oligonucleótidos que pueden utilizarse como método de diagnóstico en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten la detección cualitativa y semi cuantitativa de bajas concentraciones de geminivirus, identificando todos los grupos de patógenos que pueden estar presentes, incluso cuando las muestras procedan de material vegetal, por lo que el método ha permitido la identificación oportuna de este tipo de virus, así como la identificación de sus nuevas variantes aumentando la comprensión de su ecología y epidemiología (Martín *et al.*, 2000; Lugo *et al.*, 2011).

La importancia de estos patógenos en México, y debido al papel que representan las malezas como hospederos alternos participando en la propagación del agente viral, así como la escasa información disponible llevaron al presente trabajo con el objetivo de determinar la presencia de *Begomovirus* en cultivos de la

familia cucurbitácea y en malezas intercaladas y circundantes tanto a cielo abierto como en casa sombra en la Región Lagunera.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectó material vegetal de especies de cucurbitáceas en cultivos establecidos a cielo abierto y malla sombra así como malezas intercaladas y circundantes en varias localidades de los estados de Coahuila y Durango, durante los ciclos agrícolas de los años 2015 y 2016, y se analizaron las muestras en los laboratorios de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en Biociencia, S.A., éste último localizado en la ciudad de Monterrey, N.L.

3.2.1. Muestreo

Durante los años 2015 y 2016 se seleccionaron y se recolectaron plantas con síntomas y sin síntomas de virosis consistentes en mosaicos, clorosis, decoloración intervenal, enrollamiento de hojas, deformación de frutos y achaparramiento. El material vegetal se identificó y fue depositado en bolsas de plástico para ser trasladadas al laboratorio. Las colectas se realizaron en varias localidades de los municipios de Matamoros, Coahuila; Tlahualilo y Lerdo en el estado de Durango (Cuadro 2). En total se analizaron 125 muestras de diferentes especies de la familia cucurbitácea, y 17 muestras de malezas incluidas especies de las familias Solanaceae, Malvaceae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae, Asteraceae y Portulacaceae (Cuadro 3).

Cuadro 2. Plantas Cucurbitáceas recolectadas en localidades de Coahuila y Durango en el año 2015.

Numero de muestras	Especie	Localidad	Sistema de producción
10	Calabaza	Santa Ana del Pilar, Coahuila	Cielo abierto
30	Melón	Nueva Vista, Coahuila	Cielo abierto
23	Pepino	El Pilar, Coahuila	Malla sombra
10	Sandía	Tlahualilo, Durango	Cielo abierto
10	Melón	Tlahualilo, Durango	Cielo abierto

Cuadro 3. Malezas recolectadas en localidades de Coahuila y Durango en el año 2015.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Amaranthaceae	<i>Amaranthus palmeri</i> S. Watson	quelite
Asteráceae	<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	hierba amargosa
Asteráceae	<i>Xanthium strumarium</i> L.	cadillo
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita foetidisima</i> H. B. K.	calabacilla loca
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	malva
Malvaceae	<i>Sphaeralcea angustifolia</i> Cav. D. Don	hierba del negro
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	verdolaga
Solanaceae	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	trompillo

3.2.2. Extracción de DNA

La extracción de DNA de las muestras se llevó a cabo de manera individual utilizando el kit DNAzol ES^{MR} (MRC, E.E.U.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Se colocaron de 100 a 200 mg de tejido fresco

en un tubo de centrifuga de 1.5 ml y se maceraron con un pistilo. Se adicionaron 0.6 ml de DNAzol® ES mezclando vigorosamente en vortex y se dejó reposando a temperatura ambiente durante 5 min. Se adicionaron 0.6 ml de cloroformo y se volvió a mezclar en vortex. Se dejó reposar otros 5 min y se centrifuga a 12,000 X g durante 10 min.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril mezclando por inversión con 0.75 volúmenes de etanol frío. Se almacenaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 min y se sedimentó el DNA precipitado en microcentrifuga a 5,000 X g por 4 min. Se decantó y se lavó la pastilla con 0.6 ml de una mezcla de DNAzol ES y etanol absoluto en proporción 1:0.75 volúmenes. Se almacenaron las muestras durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 5,000 X g por 4 min. Se decantó y se dejaron los tubos en posición invertida durante 5 min o hasta secarse.

Se resuspendió la pastilla en 25 µL de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA) y se estimó la cantidad y calidad del DNA por espectrofotometría con un equipo Take 3^{MR} (BioTec, E.E.U.U.). Se almacenó el DNA en congelación hasta su uso.

3.2.3. Detección e identificación de *Begomovirus*

La amplificación del DNA viral se realizó en volúmenes de 25 µL en un termociclador MiniCycler™ (MJ Research, E.E.U.U.) con los siguientes componentes y concentraciones finales: 1 unidad de go-Taq DNA polimerasa (Promega, E.E.U.U.),

1X de amortiguador de PCR, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de una mezcla de los cuatro dNTP's, además de 20 picomoles de los primers genéricos degenerados pRV324/CoPR 5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3'; 5'-GANGSATGHGTRCADGCCATATA-3' (Wyatt y Brown, 1996; Zhang *et al.*, 2008), y 2 µL del DNA. Las reacciones se efectuaron siguiendo un programa con una temperatura inicial de 94°C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C 60 seg, 50°C 45 seg, y 72°C 45 seg; con una temperatura de 72°C de extensión final por 6 min. La visualización de los productos amplificados se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (20 µg/40 ml) después de una corrida a 62 volts por 5 minutos seguido de 100 volts por 40 minutos. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz UV[®] (Labnet, E.E.U.U.) realizando una comparación en la talla de los fragmentos obtenidos con el marcador de peso molecular ladder-100[®] de Axygen Biosciences, E.E.U.U. Los productos de amplificación fueron enviados para su secuenciación a la compañía Macrogen (E.E.U.U.) y las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa FintchTV y con el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para establecer la identidad de las secuencias de las muestras positivas.

3.3. RESULTADOS

La extracción de DNA utilizando el método del DNAzol ES fue exitosa en todas las especies vegetales analizadas. La cuantificación del DNA alcanzó niveles significativos con cantidades que oscilaron de 13 a 200 ng µL⁻¹ con una buena

calidad al estar en el intervalo entre 1.8-2.0 de la relación de absorbancias a longitudes de onda 260/280 nm (datos no mostrados).

3.3.1. Ciclo Agrícola 2015

En la primera etapa se extrajo DNA de 24 muestras representativas, donde siete fueron positivas a *Begomovirus* en las que se encontraban melón, pepino y sandía así como una especie de calabaza silvestre, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 575 pb (Fig. 2). En una segunda etapa se trabajaron 59 muestras entre cucurbitáceas y malezas, y se analizaron por PCR seis especies de malezas dando reacción positiva la calabaza silvestre, trompillo, malva y verdolaga (Fig. 3). De las especies colectadas de malezas no hubo amplificación para begomovirus en hierba amargosa, hierba del negro, cadillo y quelite. Una vez secuenciados los productos de la amplificación de los begomovirus presentes en tejido vegetal y comparando las secuencias obtenidas con el GenBank se encontró una similitud del 98% con el virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (CLCrV) correspondiendo al aislado de Arizona con clave de acceso AF256200.4 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

También se encontraron los *Begomovirus* del mosaico dorado del chile (PepGMV) en verdolaga de la localidad El Pilar, Coahuila, y en trompillo de Tlahualilo, Durango, con un 91-92% de similitud comparado con la accesión KJ634237.1; mientras que en malva se detectó el virus del amarillamiento y enrollamiento de la hoja de tomate (TYLCV) mostrando una similitud de 98% con la accesión KM506955.1 (Cuadro 4).

3.3.2. Ciclo Agrícola 2016

Durante el ciclo agrícola 2016, se analizaron 59 muestras de melón, pepino y sandía, de las cuales 20 resultaron positivas: 10 muestras de melón y 8 de pepino colectadas ambas en Matamoros, Coahuila; y 2 muestras de sandía de San Pedro, Coahuila (Fig. 3). Después de secuenciar muestras representativas a cada cultivo, se encontró que todas tenían una similitud del 97% con el virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (CLCrV).

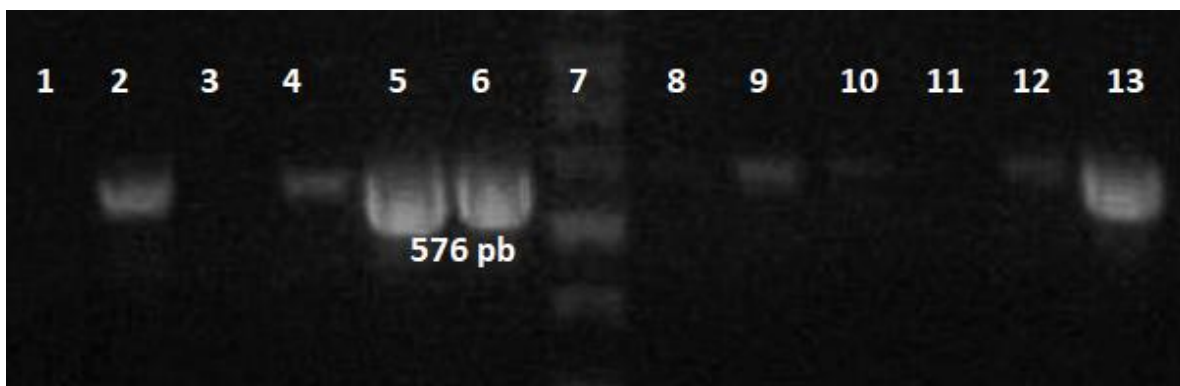


Figura 2. Amplificación por PCR del DNA de *Begomovirus* en cucurbitáceas usando los primers pRV324/CoPR y visualizados en un gel de agarosa al 1%. Carriles 1-2 calabaza, 3-4 calabaza silvestre, 5-6 melón, 7 marcador de peso molecular escalera-100 (Axygen®), 8 pepino asintomático, 9-10 pepino sintomático, 11-12 sandía y 13 control positivo.

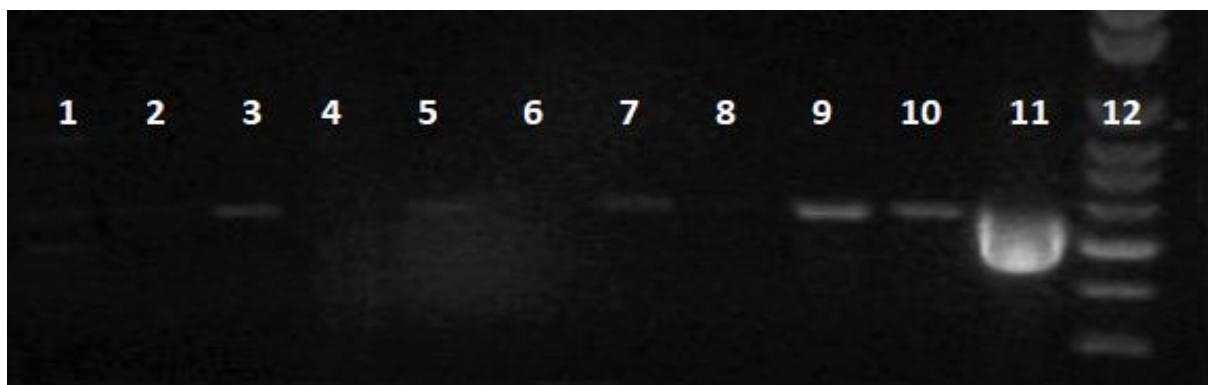


Figura 3. Amplificación por PCR del DNA de *Begomovirus* en malezas usando los primers pRV324/CoPR y visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carriles 1 trompillo, 2 verdolaga, 3 malva, 4 hierba amargosa (colectadas en el Ej. El Pilar, Coah.), 5 trompillo, 6 hierba del negro (colectada en Tlahualilo, Dgo.), 11 control positivo, M marcador de peso molecular escalera-100 (Axygen^{MR}).

Cuadro 4. *Begomovirus* detectados en el ciclo agrícola primavera-verano 2015 en especies de cucurbitáceas y malezas de localidades productoras de la Región Lagunera.

Virus	Hospedante	Sitio de colecta
CLCrV	Melón	Matamoros, Coahuila
	Sandía	Tlahualilo, Durango
	Pepino	El Pilar, Coahuila
	Calabacilla loca	El Pilar, Coahuila
PepGMV	Trompillo	Tlahualilo, Durango
	Verdolaga	El Pilar, Coahuila
TYLCV	Malva	El Pilar, Coahuila

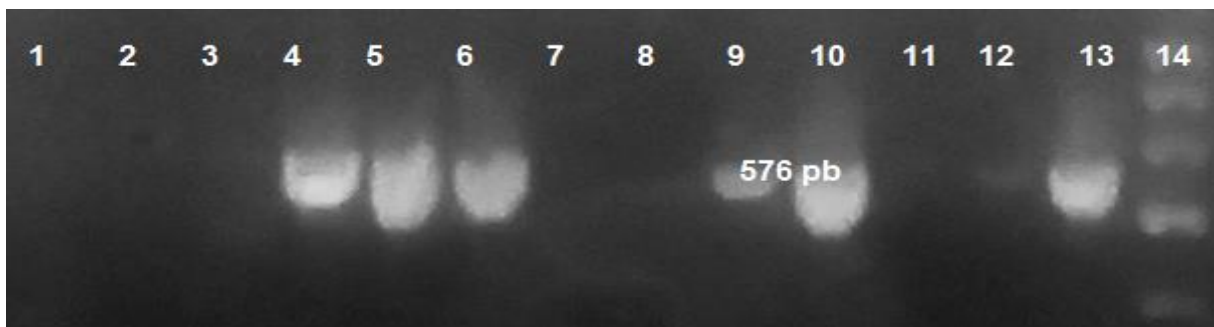


Figura 4. Amplificación por PCR del DNA de *Begomovirus* en cucurbitáceas usando los primers prV324/CoPR visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carriles 1 melón Tlahualilo, Dgo., 2-6 melón Matamoros, Coah., 7-8 melón San Pedro, Coah., 9-10 sandía San Pedro, Coah., 11-12 calabaza San Pedro, Coah., 13 control positivo , 14 marcador de peso molecular escalera-100 (Axygen^{MR}).

3.4. DISCUSIÓN

Varias muestras obtenidas a partir de tejido vegetal de cucurbitáceas y malezas colectadas en zonas productoras de los estados de Durango y Coahuila, dieron positivas al virus CLCrV. Estas muestras positivas fueron de sandía, melón, pepino, y calabacilla loca (maleza) ubicada en áreas circundantes a los cultivos de interés, lo anterior coincide con los estudios realizados por Brown *et al.* (2002) en Arizona y Texas en E.E.U.U. y en Coahuila, México quienes aislaron al virus de diferentes especies de cucurbitáceas incluidos los ya mencionados en esta investigación. Otros resultados similares fueron reportados por Hagen *et al.* (2008) donde detectaron la presencia del begomovirus en melón, calabaza y sandía en el Valle Imperial de California, E.E.U.U.

El papel de las malezas en la epidemiología de las enfermedades causadas por begomovirus es bien conocido porque es el puente para la transferencia de estos virus mediante vectores a los cultivos provocando brotes todo el año (Khan *et al.*,

2012). En este trabajo se logró identificar en las malezas de trompillo, verdolaga y malva tanto en localidades del estado de Coahuila como en Durango lo cual apoya a Jones (2003) quién reportó a la malva como reservorio de TYLCV, este *Geminivirus* es una amenaza a nivel mundial para el tomate y otros cultivos agrícolas (Khan *et al.*, 2007).

La presencia de virus fue mayor en cultivos establecidos en siembras tardías, ya que durante la colecta se observó el establecimiento de mosquita blanca, considerada principal vector de begomovirus (Verbeek *et al.*, 2013), y es considerada una plaga de gran impacto económico que afecta a los cultivos agrícolas en todo el mundo (Thompson, 2011).

Además del CLCrV, en el presente trabajo se identificaron a los virus PepGMV y TYLCV, los cuales son comunes en la región pero tienen mayor ocurrencia en tomate. También se encontró al virus WmGV en plantas de calabaza, todos ellos asociados con una alta población de mosquita blanca en comparación con la siembra temprana (datos no mostrados), por lo que los resultados encontrados se relacionan con el establecimiento del insecto. Los *Begomovirus* son transmitidos por *B. tabaci* llegando a causar pérdidas del rendimiento de 20 al 100% según lo reportado por Brown y Bir (1992). *B. tabaci* es considerada una de las 100 especies invasivas a nivel mundial por su capacidad de atacar a más de 900 plantas hospederas (McKenzie *et al.*, 2012) por lo que se explica la distribución de los virus en diferentes localidades y especies de plantas.

3.5. CONCLUSIONES

Mediante la técnica de PCR punto final se detectó la presencia de *Begomovirus* en muestras de plantas de la familia cucurbitácea y en malezas con y sin síntomas, en las zonas productoras de la Región Lagunera durante los años 2015 y 2016. Los *Begomovirus* identificados fueron el virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas (CLCrV) en melón, sandía, pepino y calabaza, el *Geminivirus* de la sandía (WmGV) en calabaza, el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en verdolaga y trompillo, y el virus del enrollamiento de la hoja amarilla (TYLCV) en malva.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Brown, J. K. and J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76:220-225.
- Brown, J. K., A. M. Idris, C. Alteri, and 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* 92:734-742.
- Garzón T., J. A., T. J. Celis Aramburo, S. Velarde Félix, O. G. Cárdenas Valenzuela, M. C. Aviléz González, C. Reyes Moreno y J. L. Martínez Carrillo. 2007. Maleza hospedante de geminivirus. *Memorias del XXVIII Congreso Nacional de la Ciencia de las Malezas*. pp263.

- Félix-Gastélum, R., M. A. Magallanes-Tapia, J. Méndez-Lozano, H. Huet, J. A. Trigueros-Salmerón y R. M. Longoria-Espinoza. 2007. Detección del virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV) y su coinfección con otros virus en Cucurbitáceas cultivadas y plantas silvestres en el Valle del Fuerte Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:95-101.
- Hagen, C., Rojas, M. R. Sudarshana, B. Xoconostle Cazares, E. T. Natwick, T. A. Turini, and R. L. Gilbertson. 2008. Biology and molecular characterization of Cucurbit leaf crumple virus, an emergent cucurbit-infecting begomovirus in the Imperial Valley of California. *Plant Disease* 92:781-793.
- Holguín, R. J., R. Vázquez Juárez, y R. F. Rivera Bustamante. 2004. Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:206-215.
- International Comitee on Taxonomy of Virus. Recuperado Abril de 2015.
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109: 195-219.
- Khan, M. S., S. H. Ji, and S. C. Chun. 2012. *Begomovirus* and their emerging threats in South Korea: A review. *Plant Pathology Journal* 28:123-136.
- Khan, A. A., M. S. Khan, S. K. Raj, and Q. A. Naqvi. 2007. Molecular identification of a *Begomovirus* causing yellow vein disease on *Calendula officinalis* in India. *EPPO Bulletin* 37:420-426.

- Lugo, M. O. Y., U. R. Guzmán, E. R. S. García y 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.
- McKenzie, C. L., J. A. Bethke, F. J. Byrne, J. R. Chamberlin, T. J. Dennehy, A. M. Dickey, D. Gilrein, P. M. Hall, S. Ludwig, R. D. L. Oetting, S. Osborne, L. Schmale, and R. G. Shatters. 2012. Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in North America after the Q invasion. *Journal of Economic Entomology* 105: 753-766.
- Martin, R. M., J. Delano, and C. André Lévesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Reviews Phytopathology* 38:207-239.
- Morales, F. J. 2011. Interaction between *Bemisia tabaci*, begomoviruses, and plant species in Latin America and the Caribbean. *In*: W. M. Thompson, *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer. Netherlands. pp. 15-49.
- National Center for Biotechnology Information. Recuperado en mayo de 2015, de National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Navas-Castillo, J., E. Fiallo Olivé, and C. S. Sánchez. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Reviews Phytopathology* 49:219-248.
- SIAP. 2014. Secretaria de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación. Recuperado el 29 de Octubre de 2015 <http://www.sagarpa.com.mx>.
- Thompson, W. M. O. 2011. Introduction: Whiteflies, Geminiviruses and recent events. *In*: W. M. Thompson, editors. *The Whitefly, Bemisia tabaci*

(*Homoptera: Aleyrodidae*) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer. Netherlands. pp.1-13.

Verbeek M., Van Bekkum, P. J., Dullemans, A. M., and Van der Vlugt, R. A. 2013. Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vector. *Virus Research* 186: 55–60.

Wintermantel, W. W., L. L. Hladky, and A. A. Cortéz. 2009. A new expanded host range of Cucurbit yellow stunting disorder virus includes three agricultural crops. *Plant Disease* 93:685-690.

Wyatt, S. D. and J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293.

Zhang, Y. P., M. W. Zhu, H. M. Cui, Y. Qiu, K. Sha, Y. H. Wan, L. Y. Zhu, L. Yu, and Z. Hui. 2008. Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China. *Virus Gene* 36:547-5.

CAPÍTULO 4

SITUACIÓN ACTUAL DEL VIRUS DEL ACHAPARRAMIENTO Y AMARILLAMIENTO DE LAS CUCURBITÁCEAS EN CULTIVOS Y MALEZAS DE LA COMARCA LAGUNERA

RESUMEN

En la década pasada el virus del achaparramiento y amarillamiento de las cucurbitáceas (CYSDV) ocasionó graves daños a los cultivos de cucurbitáceas alrededor del mundo, reportándose el primer caso en México en 1999. Las pérdidas atribuidas al virus se consideraron hasta de un 80%. El CYSDV es virus que se encuentra solamente en el floema de las plantas y no se tienen antisueros específicos por lo que es necesario el uso de métodos moleculares para su identificación. En el presente trabajo, se recolectaron muestras de diferentes especies de la familia cucurbitácea y de malezas en municipios de la Comarca Lagunera durante los ciclos agrícolas de los años 2015 y 2016. Las muestras se analizaron para determinar la presencia del virus CYSDV por RT-PCR utilizando primers específicos que amplifican el DNA complementario al RNA que codifica para la cápside proteica del virus. En el año 2015 se detectaron 7 muestras positivas de melón, pepino y sandía, de 30 de plantas analizadas (23%); en cambio, en el año 2016 el virus se encontró en 21 muestras de melón y pepino, de 71 muestras analizadas (30%). El CYSDV no se encontró en las malezas muestreadas en ambos años.

Palabras clave: *Crinivirus*, CYSDV, RT-PCR, cucurbitáceas

SUMMARY

In the last decade, the cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) caused serious damage to cucurbit crops around the world. The first case in Mexico was reported on 1999. The yield losses were considered up to 80% because of the virus. CYSDV is a virus found only in the phloem of plants and there are not specific antiserums for ELISA diagnosis so it is advisable their identification by molecular methods. In this paper, different cucurbits and weeds samples were collected in municipalities of Laguna Region during 2015 and 2016 agricultural cycles. Samples were analyzed by the presence of CYSDV by RT-PCR using specific primers that amplify the cDNA that codifies for protein capsid of the virus. Over 2015 year, we detected 7 positive samples from cantaloupe, cucumber and watermelon from 30 samples (23%), however by 2016 the virus was found in 21 cantaloupe and cucumber samples from 71 (30%). The CYSDV was not present on weeds analyzed in both years.

Keywords: *Crinivirus*, CYSDV, RT-PCR, cucurbit crops

4.1. INTRODUCCIÓN

En la década pasada el género *Crinivirus* adquirió importancia debido a su rápida dispersión y destrucción de cultivos de cucurbitáceas en muchas partes del mundo, por lo que algunas de sus especies son consideradas virus emergentes. De las 14 especies de *Crinivirus* reconocidas cuatro son capaces de infectar plantas de la familia cucurbitácea: el virus del pseudo amarillamiento de la remolacha (beet pseudo-yellows virus, BPYV), el virus de la clorosis de las cucurbitáceas (cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV), el virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga (lettuce infectious yellows virus, LIYV) y el virus del amarillamiento y achaparramiento de las cucurbitáceas (cucurbit yellow stunting disorder virus, CYSDV). Estos virus se encuentran limitados en el floema de las plantas y se han reportado infecciones de cultivos tanto en campo como en invernadero, así como en malezas y son transmitidos exclusivamente por mosca blanca de una forma persistente (Tzanetakis *et al.*, 2013; Abrahamian y Abou-Jawdah, 2014).

El CYSDV afecta cultivos de cucurbitáceas en muchas zonas templadas. Fue descrito por primera vez en los Emiratos Árabes Unidos en 1982, donde fue encontrado causando la enfermedad del amarillamiento en los cultivos de cucurbitáceas (Navas-Castillo *et al.*, 2014). El CYSDV fue reportado por primera vez en México en 1999 y posteriormente en el año 2006 en el estado de Sonora, donde hubo pérdidas sustanciales del 30 al 80% en la producción de melón, sandía y calabaza (Brown *et al.*, 2007). Puede causar pérdidas del 40 al 60 % en pepino y reduce el contenido de azúcares en melón (Tzanetakis *et al.*, 2013). Los síntomas que induce son coloración amarilla, enrollamiento y fragilidad de las hojas, a menudo

acompañada de una reducción de crecimiento, rendimiento y calidad del fruto. Los síntomas comienzan en las hojas maduras, y poco a poco avanzan hacia las hojas de nuevo crecimiento. Los síntomas inducidos por el CYSDV y otros *Crinivirus* son muy similares y en ocasiones son confundidos con desórdenes nutricionales, fisiológicos, efectos del pH, senescencia natural o fitotoxicidad por pesticidas (Navas-Castillo *et al.*, 2014). Recientemente Álvarez *et al.* (2012) reportaron el virus en los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León, en muestras de sandía y melón así como en su vector la mosquita blanca.

La gama de hospederos del CYSDV es amplia, demostrando que el virus es capaz de infectar no solo a miembros de las cucurbitáceas, sino también se ha encontrado en especies de siete familias taxonómicas de plantas y en las siguientes especies: alfalfa (*Medicago sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), cerraja (*Sonchus* sp.), groundcherry (*P. wrightii* Gray), trompillo (*Solanum eleagnifolium* Cav.), oreja de ratón (*Sida hederacea* Torr.), malva (*Malva neglecta* Wallr.), cenizo (*Chenopodium album* L.), quelite (*Amaranthus retroflexus* L.), basia (*Bassia hyssopifolia* (Pall.) Kuntze) y mostacilla (*Sisymbrium* L.) (Wintermantel *et al.*, 2009).

La mosca blanca, *B. tabaci* Genn. (Aleyrodidae: Hemiptera) es el vector del CYSDV, y requiere de largos períodos de adquisición e inoculación, el virus persiste en el insecto por lo menos 7 días; no puede transmitirse de manera mecánica y la transmisión por semilla no ha sido reportada. Debido a que los *Crinivirus* están limitados al floema y tienen baja concentración en las plantas infectadas, se

recomienda el uso de métodos de detección basados en ácidos nucleicos más que métodos serológicos (Wintermantel, 2010).

Conociendo los resultados obtenidos por Álvarez *et al.* (2012) en muestras de la Comarca Lagunera, y debido a falta de continuidad y de información sobre la situación actual, se decidió retomar el tema con el objetivo de evaluar la ocurrencia del CYSDV en la Región Lagunera tanto en plantas cultivadas de la familia cucurbitácea como en plantas silvestres.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los estados de Coahuila y Durango durante los años 2015 y 2016, se colectó material vegetal en diferentes cultivos de la familia Cucurbitácea, los cuales fueron melón (*Cucumis melo* L.), sandía (*Citrullus lunatus* Thumb.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.) y pepino (*Cucumis sativum* L.); además de 7 especies de malezas. Se muestrearon hojas en distintas fechas y etapas fenológicas del cultivo, y el trabajo de laboratorio se realizó en la empresa Biociencia, S.A. (Monterrey, N.L.) y en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la UANL localizado en el municipio de General Escobedo, N.L.

4.2.1. Colecta de muestras

Las muestras vegetales fueron obtenidas en las localidades productoras de cucurbitáceas de Matamoros, Coahuila, y Tlahualilo, Durango, durante los ciclos agrícolas de los años 2015 y 2016. En todos los casos, se muestrearon 10 plantas por predio de manera aleatoria.

Durante el año 2015 en Matamoros, Coahuila se visitaron dos predios de melón y uno de calabaza a cielo abierto, así como casa sombras de pepino; los cultivos de melón se muestrearon en los meses de abril, junio y agosto. Haciendo referencia a los meses de junio y agosto del 2015 el cultivo de melón presentaba amarillamiento (Fig. 5A), algunas malezas presentaban el mismo síntoma además de enchinamientos de la hoja, también se observaron altas poblaciones de mosca blanca (Fig. 5B), contrario al inicio del ciclo agrícola en que hubo muy poca mosca blanca. En Tlahualilo, Durango fueron visitados predios de melón y sandía establecidos a cielo abierto.

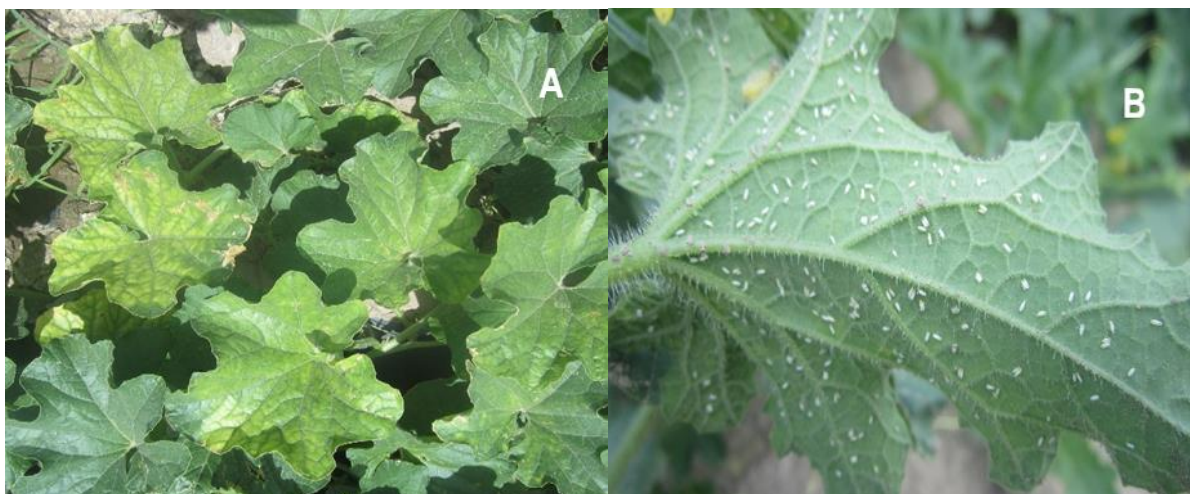


Figura 5. A. Amarillamiento en cultivo de melón durante el mes de agosto 2015. **B.** Alta población de mosca blanca en envés de hoja de sandía.

En el año 2016, se recolectó tejido vegetal en dos predios de melón y uno de calabaza en el Municipio Matamoros, colectando 10 plantas por predio al azar; en el caso de Tlahualilo únicamente se realizó colecta de malezas. En esta primera colecta del 2016 no se observaron síntomas de etiología viral. Las malezas colectadas en los

dos ciclos agrícolas comprenden 7 especies diferentes que se encontraron intercaladas y circundantes en los cultivos de importancia de las localidades antes mencionadas (Cuadro 5). Las muestras vegetales fueron conservadas en refrigeración en bolsas identificadas a 6°C para su análisis posterior.

Cuadro 5. Malezas colectadas en localidades de Tlahualilo, Durango durante el ciclo agrícola primavera-verano 2016.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Amaranthaceae	<i>Amaranthus palmeri</i> S. Watson	Quelite
Asteráceae	<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	hierba amargosa
Asteráceae	<i>Xanthium strumarium</i> L.	Cadillo
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Malva
Malvaceae	<i>Sphaeralcea angustifolia</i> Cav. D. Don	hierba del negro
Brassicaceae	<i>Sisymbrium</i>	Mostacilla
Solanaceae	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	Trompillo

4.2.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo de manera individual en las muestras vegetales utilizando el kit TRI Reagent® (MRC, E.E.U.U.) siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Se maceraron de 0.1 a 0.2 g de tejido fresco en un tubo de centrifuga de 1.5 ml nuevo y estéril. Se agregaron 0.9 ml de Tri Reagent® y se homogenizó en vortex almacenando posteriormente durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 0.1 ml de bromocloropropano (Sigma®) mezclando vigorosamente. Se almacenaron las muestras por 5 min y se centrifugaron a 12,000 X g 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml y se precipitó el RNA con un volumen de isopropanol (Sigma®) mezclándolos. Se almacenaron las

muestras 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 X g durante 8 min. Se decantó y se lavó la pastilla con 0.5 ml de etanol frío al 75% y se volvió a centrifugar a 7,500 X g 5 min. Se volvió a decantar dejando los tubos en posición invertida sobre una sanita estéril hasta su secado, unos 5 minutos aproximadamente, y se resuspendió la pastilla en 25 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (Sigma®). Finalmente se incubaron las muestras a 55-60°C por 5 min y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

4.2.3. Reacciones de RT-PCR

Se realizaron reacciones de RT-PCR individuales para cada muestra, en dos pasos. En el primer paso, 3 μ L de RNA total fue calentado a 65°C por 5 min y luego colocado en hielo durante 2 min adicionales. Se preparó una mezcla con 2 μ L de amortiguador para M-MLV (Promega®), 2 μ L de dNTP's a una concentración de 2.5 mM, 0.125 μ L de RNasin 40 U/ μ L (Promega®) (inhibidor de ribonucleasas), 0.5 μ L de la enzima M-MLV reverso transcriptasa a 200 U/ μ L (Promega®), 1.5 μ L de del primer reverso de un stock a 10 μ M. Se mezclaron los ingredientes anteriores y se distribuyeron 7.5 μ L en cada tubo de muestra problema. Se incubaron las muestras a 42°C durante una hora y se pasaron a 94°C por 2 min adicionales.

En el segundo paso, el DNA complementario al RNA viral fue amplificado en reacciones de 25 μ L con los siguientes componentes y sus concentraciones finales: 1 unidad de go-Taq DNA polimerasa (Promega, E.E.U.U.), 1X de amortiguador de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de una mezcla de los cuatro dNTP's, además de 20 picomoles de los primers específicos CysCP5206F 5'-TTTGAAAAGAACCTGACGAG-3'; CysCP5600R 5'-TTCATCAACAGATTGGCTGC

-3', que se unen al DNA que codifica para la proteína de la cápside (CP), al igual que el par de primers CYSDVCP1 5'-ATGGCGAGTTCGAGTGAGAATAA-3' y CYSDVCP2 5'-ATTACCACAGCCACCTGGTGCTA-3' reportados por Guerrero-Gómez (2010), y finalmente 2 µL del DNAc. Las condiciones de amplificación consistieron en una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94-56-72°C durante 30"-45"-120" respectivamente, finalizando a 72°C a 4 min. Los productos de la amplificación obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para determinar la presencia o ausencia del fragmento esperado de 397 y 756 pb dependiendo de los primers utilizados. Muestras representativas de los productos de reacción fueron secuenciadas en MacroGen (E.E.U.U.) y las secuencias se compararon con la base de datos del GenBank.

4.3. RESULTADOS

El aislamiento del RNA total fue realizado exitosamente con el método del Trizol Reagent® en tejidos vegetales de calabacita, melón, sandía, pepino y todas las malezas analizadas. Al procesar las muestras colectadas durante los dos ciclos agrícolas del año 2015, los dos juegos de primers fueron efectivos para la identificación del CYSDV, los fragmentos obtenidos de la amplificación fueron de 397 pb con los primers CysCP5206f/CysCP5600 (Fig. 6A) y de 756 pb con los primers CYSDVCP1/CYSDVCP2 (Fig. 6B). Las muestras recolectadas en primavera que comprende el inicio del ciclo agrícola cuando la población de mosca blanca es muy baja fueron negativas a CYSDV, mientras que en agosto del mismo año se detectó el virus mediante las reacciones de la RT-PCR. Un total de 7 muestras resultaron

positivas a CYSDV de la siembra del ciclo tardío. En caso de las muestras de malezas, ninguna se encontró positiva.

Con respecto a las muestras del año 2016, en la primera colecta no se detectó la presencia del CYSDV en las 30 muestras de cucurbitáceas colectadas y 16 malezas encontradas en los cultivos de importancia de los dos municipios muestreados de la Comarca Lagunera, pero en la segunda colecta realizada en el ciclo otoño-invierno del 2016 se detectaron 21 positivos de un total de 71 muestras en el año, equivalentes a un 30% de incidencia. Ocho de las muestras positivas al virus procedían plantas de melón sembradas en Matamoros, Coah; cuatro de San Pedro, Coah. y nueve muestras de pepino de Matamoros, Coah. (Figura 7, Cuadro 6).

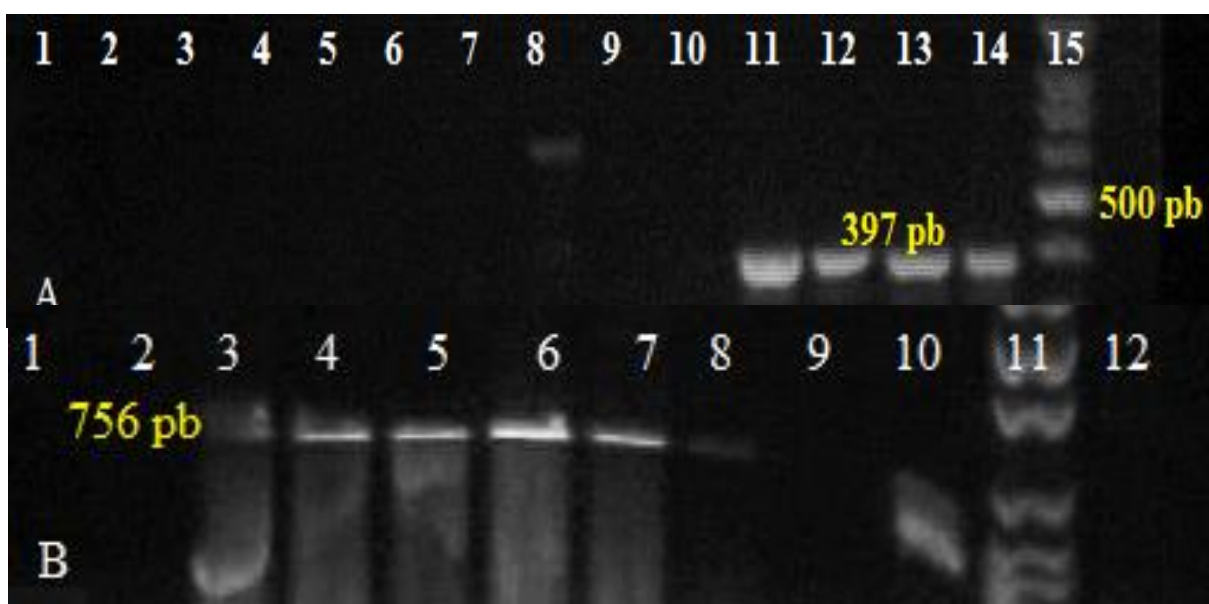


Figura 6. Amplificación del DNAc del CYSDV por RT-PCR en muestras colectadas en el año 2015. A. oligonucleótidos CysCP5206f/CysCP5600r Carriles: 1-7 melón de Tlahualilo, Dgo., 8-10 calabaza de Matamoros, Coah., 11-12 melón de Matamoros, Coah., 13-14 pepino de Matamoros, Coah., 15 MPM escalera de 100 pb. **B,** oligonucleótidos CYSDVCP1/CYSDVCP2. Carriles: 1-2 control negativo, 3-5 melón de Matamoros, Coah., 6, 7, 8, pepino de Matamoros, Coah., 9 sandía de Tlahualilo, Dgo., 10 MPM pb.

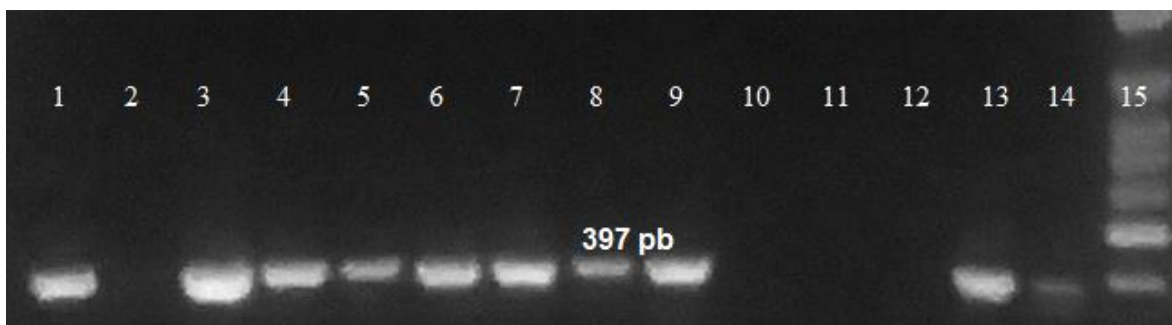


Figura 7. Amplificación del ADNc del CYSDV por RT-PCR con oligonucleótidos CysCP5206f/CysCP5600r. Carriles: 1-9 melón de Matamoros, Coah., 10 sandía de San Pedro, Coah., 11-12 calabaza de San Pedro, Coah., 13-14 controles positivos, 15 marcador de peso molecular escalera de 100 pb (Axygen^{MR}).

Cuadro 6. Detección del CYSDV en cultivos de importancia agrícola y malezas de la Comarca Lagunera en los años 2015 y 2016.

Cultivo	Municipio	Positivos / total	
		2015	2016
Melón	Tlahualilo, Durango	0/7	-
Melón	Matamoros, Coahuila	3/3	8/20
Melón	San Pedro, Coahuila	-	4/10
Pepino	Matamoros, Coahuila	3/6	9/11
Calabaza	Matamoros, Coahuila	0/3	0/10
Sandía	Tlahualilo, Durango	1/3	-
Malezas	Tlahualilo, Durango	0/3	0/20
	Matamoros, Coahuila	0/5	-
Total de muestras		7/30	21/71

4.4. DISCUSIÓN

Para la identificación del CYSDV en muestras de plantas de la familia cucurbitácea y malezas circundantes se empleó la técnica RT-PCR con primers específicos al virus. Los dos grupos de primers utilizados para la amplificación del DNAc fueron diseñados en la región de DNA que codifica para la cápside proteica

obteniéndose productos de 397 y 756 pb respectivamente (Aguilar *et al.*, 2003 y Guerrero-Gómez, 2010). Ambas parejas de primers fueron efectivos lo que demuestra la identificación del CYSDV en plantas de melón, pepino y sandía, cultivos de importancia económica en la Comarca Lagunera. Aun cuando no se detectó al virus CYSDV en las malezas analizadas, no quiere decir que estas no sean hospederos susceptibles del virus. Este resultado se atribuye a la baja incidencia de mosca blanca durante las épocas previas al muestreo.

De las muestras analizadas, siete resultaron positivas al CYSDV de las especies melón, pepino y sandía, correspondiendo a la colecta realizada en verano-otoño del 2015 en Matamoros, Coahuila y Tlahualilo, Durango; mientras que las muestras obtenidas en primavera de 2015 y de 2016 no se detectó la presencia del virus. Lo anterior coincide con lo obtenido Wintermantel *et al.* (2016) quienes reportaron una mayor incidencia del virus CYSDV después de mayo y mediados de junio del 2007 y 2008 en el Valle Imperial de California, E.E.U.U., al igual que Guerrero-Gómez (2010) quién encontró una incidencia del 36% del virus en el ciclo otoño-invierno del 2008 y no detectó positivos en el ciclo primavera-verano del 2009. Algunos autores atribuyen estos resultados a la presencia de mosca blanca que se ve influenciada por factores de temperatura lo que ocasiona su aparición en los ciclos de otoño-invierno y no de primavera (Chu *et al.*, 2007).

El más reciente reporte en la comarca lagunera de CYSDV fue hecho por Álvarez *et al.* (2012) en muestras analizadas en los años 2008 y 2009, por lo que los resultados descritos en este documento actualizan la información sobre el estatus del

virus en la comarca lagunera y hay que destacar la necesidad de estudios adicionales acerca la epidemiologia del virus en México.

4.5. CONCLUSIONES

La aplicación de la técnica RT-PCR en las condiciones de reacción y con los primers utilizados para la detección del CYSDV, resultó adecuada por su especificidad y sensibilidad a partir de RNA obtenido de tejido vegetal, determinando con precisión la presencia del CYSDV en un 23% de las muestras de plantas de melón y pepino de Matamoros, Coahuila, y sandia de Tlahualilo, Durango colectadas durante el verano del año 2015; así como en un 30% de las muestras de melón y pepino colectadas y analizadas durante el 2016. Las muestras de calabaza y malezas no dieron reacción al CYSDV y se consideraron negativas.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamian, P. E. and Y. Abou Jawdah. 2014. Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Disease* 25:26–3.
- Aguilar, J. M., M. Franco, C.F. Marco, B. Berdiales, E. Rodriguez Cerezo, V. Truniger, and M. A. Aran. 2003. Further variability within the genus *Crinivirus*, as revealed by determination of the complete RNA genome sequence of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Journal of General Virology* 84: 2555–2564.

- Álvarez Ojeda M. G., C. E. Guerrero Gámez, A. Morales Loredo, Y. I Chew Madinaveitia, H. Gutiérrez Mauleón y O. G. Alvarado Gómez. 2012. Detección por RT-PCR del virus del amarillamiento y enanismo en cucurbitáceas (CYSDV) del Centro-Norte de México. *Revista Fitotecnia de México* 35: 43-47.
- Brown, J. K., J. C. Guerrero, M. Matheron, M. Olsen, and 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* 91:773.
- Chu, C. C., E. Barnes, E. T. Natwick, T. Y. Chen, D. Ritter, and T. J. Henneberry. 2007. Trap catches of the sweet potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) in the Imperial Valley, California, from 1996 to 2002. *Insect Science* 14: 165-170.
- Guerrero-Gámez, C.E. 2010. Detección y caracterización molecular del virus del amarillamiento y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) en áreas productoras del Centro-Norte y Noreste de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. 62p.
- Kao, J., L. Jia, T. Tian, L. Rubio and B. W. Falk. 2000. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus (genus Crinivirus) in North America. *Plant Disease* 84: 101.
- Navas-Castillo, J., E. Fiallo Olivé and S. Sánchez Campos. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 219-248.

- Navas-Castillo, J., J. J. López-Moya and M. A. Aranda. 2014. Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Annals of Applied Biology* 165:155–171.
- Tzanetakis, I. E., R. R. Martin, and W. M. Wintermantel. 2013. Epidemiology of *Criniviruses*: an emerging problem in world agriculture. *Frontiers in Microbiology* 4: 1-15.
- Wintermantel, W. M. 2010. Transmission efficiency and epidemiology of *Criniviruses*. In: P. A. Stansly and S. E. Naranjo (ed.). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer. pp. 319-331.
- Wintermantel, W. M., L. L. Hladky, A. A. Cortez, E. T. Natwick. 2009. A new expanded host range of Cucurbit yellow stunting disorder virus includes three agricultural crops. *Plant Disease* 93: 685–690.
- Wintermantel, W. M., R. L. Gilberston, and E. T. Natwick. 2016. Host-specific relationship between virus titer and whitefly transmission of cucurbit yellow stunting disorder virus. *Plant Disease* 100: 92-98.
- Wisler, G. C., J. E. Duffus, H. Y. Liu, and R. H. Li. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted Closteroviruses. *Plant Disease* 82: 270-280.