



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**  
**FITOPATOLOGÍA**

**EPIDEMIOLOGÍA Y DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS Y**  
***Candidatus Liberibacter psyllaourous* EN PLANTACIONES**  
**COMERCIALES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

**BENJAMÍN HERNÁNDEZ FLORES**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2013**

La presente tesis, titulada: **Epidemiología y detección de begomovirus y *Candidatus Liberibacter psyllae* en plantaciones comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**, realizada por el alumno: **Benjamín Hernández Flores**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



---

DR. REMIGIO ANASTASIO GUZMÁN PLAZOLA

ASESOR



---

DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR



---

DR. MANUEL SANDOVAL VILLA

ASESOR



---

DR. MANUEL LIVERA MUÑOZ

ASESOR



---

DR. MATEO ARMANDO CADENA HINOJOSA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 15 de febrero de 2013

# EPIDEMIOLOGÍA Y DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS Y *Candidatus Liberibacter psyllaorous* EN PLANTACIONES COMERCIALES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

## RESUMEN

El tomate es una de las especies vegetales más importantes en el mundo. La producción de este cultivo es considerada como una actividad de alto riesgo debido a su gran susceptibilidad a plagas que limitan su producción. En años recientes, se observaron síntomas de detención general del crecimiento, clorosis, deformación foliar, abscisión de flores y reducción de tamaño y cantidad de frutos, característicos de infección por begomovirus y *Candidatus Liberibacter psyllaorous* en plantas de tomate cultivadas en invernadero en los estados de Coahuila, Puebla e Hidalgo. Con la finalidad de determinar la presencia de estos patógenos se colectó tejido foliar de plantas de tomate y de malezas que mostraban los síntomas antes descritos. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales y se aplicó la técnica de PCR con iniciadores degenerados para begomovirus y *Ca. L. psyllaorous*. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados. Los resultados de la secuenciación y análisis de BLAST confirmaron la presencia en plantas de tomate de *Tomato yellow leaf curl virus* en Coahuila, *Tomato golden mottle virus*, *Tomato severe leaf curl virus*, *Tomato chino La Paz virus* y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) en Puebla y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) en Hidalgo. Además, se detectó a *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* y *Malva parviflora* como hospedantes de PHYVV en Coahuila y a PepGMV infectando a *Solanum pimpinellifolium* en Hidalgo. Asimismo, se confirmó la presencia de *Ca. L. psyllaorous* en plantas de tomate en el estado de Puebla. Se evaluó la incidencia de plantas de tomate con síntomas virales y la dinámica poblacional de mosca blanca en San Pedro, Coahuila. La incidencia de plantas con síntomas de virosis se ajustó mejor al modelo de Gompertz que a los Logístico y Monomolecular y mostró una asociación directa con el mayor incremento de población de mosca blanca.

**Palabras clave:** Mosca blanca, geminivirus, malezas, *Bactericera cockerelli*, análisis temporal.

## ABSTRACT

Tomato is one of the most important vegetables in the world. Cultivation of this crop is considered a high-risk activity mainly due to the great susceptibility of pests limiting its production. In recent years, symptoms typical of geminivirus and *Candidatus Liberibacter psyllae* infection, associated with general growth reduction, chlorosis, leaf deformation, abscission of flowers and reduction of size and fruit number, were observed in greenhouse grown tomatoes in the states of Coahuila, Puebla and Hidalgo. In order to confirm the presence of these pathogens, plant samples of symptomatic tomatoes and associated weeds were collected. Total DNA was extracted from all samples and PCR was run using degenerated primers recommended for begomovirus and *Ca. L. psyllae*. All amplified DNA segments were sequenced. BLAST analysis confirmed the presence of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomatoes of Coahuila, *Tomato golden mottle virus*, *Tomato severe leaf curl virus*, *Tomato chino La Paz virus* and *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) in Puebla, and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) in Hidalgo. *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* and *Malva parviflora* were found to be PHYVV hosts. Also, PepGMV infected *Solanum pimpinellifolium*. This study also confirmed the presence of *Ca. L. psyllae* in tomato plants in the state of Puebla. Incidence of begomovirus symptoms on tomato plants and whitefly population dynamics was followed in three locations of San Pedro, Coahuila. Disease dynamics fitted Gompertz models better than Logistic and Monomolecular ones and resulted closely associated with whitefly population peaks.

**Keywords:** Whiteflies, geminivirus, weeds, *Bactericera cockerelli*, temporal analysis.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por su infinita bondad y amor.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la duración de mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado en el programa de Fitosanidad-Fitopatología y por el financiamiento otorgado a través del Fideicomiso núm. 167304/2010 y la LPI-9 Geomática Aplicada al Estudio y Manejo de los Recursos Naturales y Sistemas Agropecuarios.

A la Empresa Hortalizas la Laguna S. DE P.R. DE R.L. DE C.V. por el apoyo y las facilidades otorgadas para la toma de datos en sus campos de cultivo.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Puebla (CESAVEP) por su valioso apoyo en la colecta de muestras en el estado de Puebla.

A todos los maestros del Instituto de Fitosanidad en especial a la Dra. María de Jesús Yanéz Morales, Dr. Gustavo Mora Aguilera, Dr. Daniel Téliz Ortíz, Dr. Ignacio Cid del Prado Véra, M. en C. Francisco Franco Navarro, Dr. Cristian Nava Díaz, Dra. Reina I. Rojas Martínez y Dr. Carlos de León García de Alba por sus valiosos consejos y enseñanzas.

Al Dr. Remigio Anastacio Guzmán Plazola mi más grande gratitud por su inestimable paciencia, asesoría y dirección durante toda mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez con admiración y aprecio por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi consejo particular: Dr. Remigio Anastacio Guzmán Plazola, Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez, Dr. Manuel Sandoval Villa, Dr. Manuel Livera Muñoz y Dr. Mateo Cadena Hinojosa por su disposición, apoyo y sugerencias en este trabajo.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a toda mi familia. En especial a mis padres Esteban Hernández Cordova e Isabel Flores Correa por su gran ejemplo de perseverancia y esfuerzo. A mis hermanos Edgar, Omar y Melitón por el apoyo brindado en todo momento y sobre todo por su amistad. A mi esposa Elena Santiago Santiago con todo mi amor por su comprensión, apoyo y valiosa compañía quien se ha vuelto la cómplice de mis logros y a mi princesa Camila Hernández Santiago por llenar mi vida de alegría.

## CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1. Planteamiento del problema.....	1
1.1 Objetivos.....	2
2. Revisión de literatura.....	3
2.1 Geminivirus .....	3
2.1.1 Introducción .....	3
2.1.2 Familia <i>Geminiviridae</i> .....	3
2.1.2.1 Género <i>Mastrevirus</i> .....	4
2.1.2.2 Género <i>Curtovirus</i> .....	4
2.1.2.3 Género <i>Topocuvirus</i> .....	5
2.1.2.4 Género <i>Begomovirus</i> .....	5
2.2 <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) .....	8
2.2.1 Introducción .....	8
2.2.2 Ciclo de vida .....	8
2.2.3 Daños .....	10
2.2.4 Rango de hospedantes.....	10
2.2.5 Distribución geográfica .....	12
2.2.6 Biotipos .....	13
3. Literatura citada.....	15
CAPÍTULO I.BEGOMOVIRUS ASOCIADOS AL CULTIVO DE TOMATE ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) EN LOCALIDADES DE COAHUILA, PUEBLA E HIDALGO. ....	32
RESUMEN .....	32
ABSTRACT .....	33
1.1 Introducción .....	34
1.2 Materiales y métodos.....	36
1.2.1 Colección de material vegetal.....	36

1.2.2 Amplificación por PCR .....	39
1.2.3 Análisis de secuencias .....	39
1.2.4 Estudio temporal de la incidencia de virosis y dinámica poblacional de mosca blanca .....	40
1.3 Resultados y discusión .....	40
1.3.1 Amplificación de fragmentos .....	40
1.3.2 Análisis de secuencias .....	42
1.3.3 Análisis temporal de la virosis y densidad de mosca blanca .....	46
1.4 Conclusiones .....	50
1.5 Literatura citada .....	50
CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE <i>Candidatus Liberibacter psyllaourous</i> ASOCIADO AL CULTIVO DE TOMATE ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) EN INVERNADERO, PUEBLA, MÉXICO.....	57
RESUMEN.....	57
ABSTRACT .....	58
2.1 Introducción .....	59
2.2 Materiales y métodos.....	60
2.2.1 Colección de material vegetal y extracción.....	60
2.2.2 Amplificación por PCR .....	62
2.2.3 Análisis de secuencias .....	63
2.3 Resultados y discusión .....	64
2.3.1 Sintomatología.....	64
2.3.2 Amplificación de fragmentos de ADN .....	64
2.3.3 Análisis de secuencias .....	66
2.4 Conclusión .....	68
2.5 Literatura citada .....	68
CONCLUSIONES GENERALES.....	73



## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 0.1 Genoma de los cuatro géneros de la familia *Geminiviridae* (Gutiérrez *et al.*, 2004). Proteínas codificadas: RepA, proteína asociada con la replicación interactuando con la proteína retinoblastoma; Rep, proteína asociada con el inicio de la replicación; REn, proteína potenciadora de la replicación; TrAP, proteína activadora de la transcripción; CP, proteína de la cápside; MP, proteína de movimiento y NSP, proteína de transporte nuclear. Las proteínas con funciones poco conocidas son nombradas de acuerdo en la posición en el mapa genético. Las regiones no codificantes son la region intergénica larga (LIR) y la región intergénica corta (SIR) en mastrevirus, región intergénica (IR) en curtovirus, y la región común (CR) en topocovirus y begomovirus. La secuencia TAATATTAC es el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante..... 7

Figura I.1 Síntomas asociados a begomovirus en plantas de tomate colectadas en San Pedro, Coahuila, México. (a) Retraso de crecimiento, enrollamiento de hojas hacia el haz, caída prematura de flores y reducción de número y tamaño de frutos, (b) acortamiento de entrenudos que dan un aspecto arbustivo a la planta, amarillamiento intervenal y marginal, (c) reducción moderada y (d) severa de la lámina foliar..... 37

Figura I.2 Síntomas asociados a begomovirus en plantas de tomate colectadas en Puebla. (a) Mosaicos cloróticos, (b) borde de la hoja ligeramente curvada hacia el haz y mosaicos cloróticos ligeros, (c) clorosis y síntomas ligeros de enchinamiento y (d) clorosis y arrugamiento de las hojas. .... 38

Figura I.3 Productos de PCR obtenidos con el par de iniciadores universales CoPR y AV494 para begomovirus. a) Malezas. Línea M, marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); línea 1, malva; línea 2, malva; línea 3, control negativo (planta de tomate sana); línea 4, tidestromia; línea 5, tidestromia; línea 6, verdolaga; línea 7, control positivo (planta de tomate infectada con begomovirus). b) Plantas de tomate. Línea M, marcador molecular 100 pb (hyperladder II® Bioline); Línea 1, control negativo (agua);

Línea 2, muestra colectada en Coahuila; Línea 3, control negativo (planta de tomate sana); Líneas 4-6, muestras colectadas en Puebla; Línea 7, muestra colectada en Hidalgo. .... 41

Figura I.4 Análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside de begomovirus identificados en este estudio (en negritas) y de secuencias reportadas en la base de datos Genbank. Como especie externa (outgroup) se utilizó la secuencia de *Spinach curly top virus*. El árbol filogenético fue elaborado con el algoritmo Neighbour-joining, al cual se le aplicó un bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores bootstrap se indican al inicio de cada nodo. .... 45

Figura I.5 Incidencia acumulada de plantas con síntomas asociados a begomovirus e infestación de mosca blanca a diferentes fechas de muestreo en un predio comercial de tomate denominado “Pachuca” en San Pedro de las Colonias, durante el ciclo de producción otoño-invierno 2009. .... 46

Figura I.6 Incidencia acumulada de plantas con síntomas asociados a begomovirus e infestación de mosca blanca a diferentes fechas de muestreo en un predio comercial de tomate denominado “Valvula 0” en San Pedro de las Colonias, durante el ciclo de producción otoño-invierno 2009. .... 47

Figura I.7 Incidencia acumulada de plantas con síntomas asociados a begomovirus e infestación de mosca blanca a diferentes fechas de muestreo en un predio comercial de tomate denominado “Marte” en San Pedro de las Colonias, durante el ciclo de producción otoño-invierno 2009. .... 48

Figura II.1 Síntomas asociados a la infección por *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en tomate. (a) Hojas de plantas infectadas muestran nervaduras de color púrpura, (b) clorosis intervenal, (c) epinastia, (d) planta severamente afectada con distorsión foliar, y (e) planta con distorsión foliar, abscisión de flores y crecimiento apical clorótico. .... 61

Figura II.2 Ubicación geográfica de sitios de muestreo en el estado de Puebla, durante el ciclo de cultivo primavera-verano de 2011. .... 62

Figura II.3 Productos de PCR amplificados en gel de agarosa (1.5%) de la región del gen 16S rRNA de *Candidatus Liberibacter* con los iniciadores CLi.po/O12c. Línea M, marcador molecular 100 pb (hyperladder II® Bionline); línea 1, control negativo (planta de tomate sana); línea 2, 3 y 7, muestras infectadas con *Ca. Liberibacter*; línea 4, 5 y 6, muestras libres de *Ca. Liberibacter*..... 64

Figura II.4 Análisis filogenético de un aislamiento de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* obtenido en este estudio (en negritas) y otras secuencias de especies de *Ca. Liberibacter* obtenidas del GenBank, basado en una secuencia de 803 pb de la región 16-ISR-23S rRNA amplificada usando los iniciadores LpFrag4-1161F/480R. Como especie externa (outgroup) se utilizó la secuencia de *Rhizobium leguminosarum*. El árbol filogenético fue elaborado con el algoritmo Neighbour-joining, al cual se le aplicó un bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores bootstrap se indican al inicio de cada nodo. .... 67

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 0.1 Rango de hospedantes de mosca blanca ( <i>B. tabaci</i> ). .....	11
Cuadro I.1 Begomovirus detectados mediante PCR con los iniciadores degenerados CoPR/AV494 en tomate y malezas de 2008 a 2012 en los estados de Coahuila, Puebla e Hidalgo. ....	43
Cuadro I.2 Resumen de los parámetros estadísticos de tres modelos de crecimiento poblacional linearizados para describir la curva de progreso de la enfermedad correspondiente a la infección por <i>Begomovirus</i> observada en tres predios comerciales de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) en San Pedro, Coahuila, México. ....	49
Cuadro II.1 Sitios de muestreo y resultados del análisis de <i>Candidatus</i> Liberibacter en plantas de tomate cultivadas en invernadero en el estado de Puebla. ....	65

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Planteamiento del problema

Las enfermedades causadas por begomovirus (Familia *Geminiviridae*, género *Begomovirus*) constituyen un serio obstáculo para los agroecosistemas tropicales y subtropicales a nivel mundial. En los últimos años estos virus también se han introducido en regiones templadas del mundo donde tienen un gran impacto y representan una seria amenaza para diversos cultivos en invernadero (Khan *et al.*, 2012). Los síntomas ocasionados por estos virus incluyen detención del crecimiento, distorsiones foliares, hojas y folíolos anormalmente pequeños en brotes terminales, patrones específicos de mosaicos, abscisión de flores y engrosamiento de nervaduras (Anon, 2001; Holguín-Peña *et al.*, 2004). Las enfermedades causadas por estos virus pueden en casos extremos reducir el rendimiento a cero causando pérdidas catastróficas en la agricultura.

En México, el tomate es una de las hortalizas económicamente más importantes. Anualmente se producen cerca de un millón 872 mil 481 toneladas, con un valor de 10 mil 337 millones de pesos (SAGARPA, 2012). Una de las mayores limitantes de la producción de este cultivo son las enfermedades virales, que se han incrementado en la última década ocasionando reducciones de rendimiento de hasta 100%. Actualmente, en el país se han reportado 11 begomovirus diferentes transmitidos por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae): *Chino del tomate virus* (CdTV, Sinón. Tomato leaf crumple virus) (Gallegos, 1978; Brown y Nelson, 1988; Paplomatas *et al.*, 1994); *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV, Sinóns. Texas pepper virus, Serrano golden mosaic virus, Pepper jalapeño virus) (Brown y Poulos, 1990; Holguín-Peña *et al.*, 2004; Lotrakul *et al.*, 2000; Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Stenger *et al.*, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1996); *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV, Sinón. Pepper huasteco virus) (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996); *Tomato leaf curl sinaloa virus* (ToLCSinV, Sinóns. Sinaloa tomato leaf curl virus, Tomato yellow mosaic virus-Costa Rica 2) (Brown *et al.*, 1993; Idris *et al.*, 1993; Idris y Brown, 1998); *Tomato yellow leaf curl virus*

(TYLCV) (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999); *Tomato mottle virus* (ToMoV, Sinón. Florida tomato virus) (Díaz-Plaza *et al.*, 2002; Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998); *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV) (Holguín-Peña *et al.*, 2004); *Tomato golden mottle virus* (ToGMoV) (Mauricio-Castillo *et al.*, 2007); *Squash leaf curl virus* (SLCV) (Lugo *et al.*, 2011); *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV, Sinón. Cucurbit leaf curl virus) (Lugo *et al.*, 2011); y *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2012; Holguín-Peña *et al.*, 2010).

Recientemente, una bacteria tentativamente llamada *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, se reportó en Nueva Zelanda afectando a cultivos de solanáceas (Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009), cuyo vector es el psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Trioziidae). Esta bacteria ha causado pérdidas de millones de dólares en la industria del tomate en invernaderos comerciales en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2009). En México se ha confirmado la presencia de *Ca. L.* en el cultivo de tomate en Sinaloa y Estado de México (Ling *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009a), en Chile en Sinaloa y Michoacán (Camacho *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009b) y en papa en Coahuila, Estado de México, Guanajuato y Puebla (DGSV-CNRF, 2011; Rubio-Covarrubias *et al.*, 2011).

Debido a la importancia de estos patógenos en el cultivo de tomate en México, en la presente investigación se plantearon siguientes objetivos:

## 1.1 Objetivos

- Determinar la presencia de begomovirus en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de áreas de producción de Coahuila, Puebla e Hidalgo.
- Identificar las malezas hospedantes de begomovirus en San Pedro, Coahuila.
- Determinar la asociación de mosca blanca con la incidencia de plantas de tomate con síntomas de virosis.
- Determinar la presencia y distribución de *Candidatus Liberibacter* en tomate en el estado de Puebla.

## **2. Revisión de literatura**

### **2.1 Geminivirus**

#### **2.1.1 Introducción**

Los geminivirus son fitopatógenos que pertenecen a la familia *Geminiviridae*. Fueron descritos por primera vez por Goodman (1977). *Geminiviridae* es una de las tres familias virales con mayor importancia económica a nivel mundial y la segunda más grande de los virus fitopatógenos (Yadava *et al.*, 2010). Afectan a una gran diversidad de especies de plantas en zonas tropicales y subtropicales (Martínez *et al.*, 2006). Las infecciones por geminivirus dentro de los agroecosistemas son dinámicas y de interacciones complejas, pues involucran diversos factores como la especie de geminivirus, el ambiente y el biotipo del vector (Zúñiga y Ramírez, 2002).

Este grupo recibe su nombre debido a la morfología de las partículas virales vistas al microscopio electrónico, mismas que se asemejan a dos poliedros idénticos fusionados (Gemini=gemelos). Los viriones están constituidos por un par de icosaedros y cada uno consta de 110 subunidades de proteína de cápside, de 29-30kD cada una. La replicación se lleva a cabo en el núcleo de la célula infectada por el mecanismo del círculo rodante. Su genoma codifica para unas pocas proteínas que son divergentemente transcritas. Estos virus dependen de las ARN y ADN polimerasas nucleares de la planta hospedante para su replicación y transcripción (Davies y Stanley 1989; Fauquet y Fargette, 1990; Hamilton *et al.*, 1983; Harrison, 1985; Lazarowitz, 1992; Mayo y Martelli, 1993). Presentan una región intergénica que incluye un tallo-asa conservado en todos los geminivirus, el cual contiene regiones ricas en A-T e incluye el sitio de inicio de la replicación (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999).

#### **2.1.2 Familia *Geminiviridae***

Los geminivirus se clasifican en cuatro géneros, previamente denominados subgrupos, que se caracterizan por el tipo de insecto vector (de las familias Cicadellidae, Membracidae o Aleyrodidae), las plantas hospedantes (monocotiledónea

o dicotiledónea) y la estructura del genoma (ADN monopartita o bipartita) que poseen (Hanley *et al.*, 2000; Hull, 2002; Padidam *et al.*, 1995; Pringle, 1999; Rybicki, 1994). Los géneros son *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*.

#### **2.1.2.1 Género *Mastrevirus***

Comprende virus que tienen un genoma de cadena sencilla. Infectan a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, son transmitidos por insectos de la familia *Cicadellidae* y poseen un genoma típicamente monopartita, de aproximadamente 2.8 kb (Bock, 1974; Harrison *et al.*, 1977; Ribicky y Huges, 1990). Poseen dos genes en el sentido viral, V1 (MP) encargado de la proteína de movimiento y el V2 (CP) que codifica para la cápside viral; y dos genes en el sentido complementario, el gen C1 (Rep A) que codifica una proteína asociada con la replicación y C2 (Rep) que codifica una proteína ligada con el inicio de la replicación (Gutiérrez *et al.*, 2004; Martínez, 1998; Ramos, 2004). La especie tipo es *Maize streak virus* (MSV). Algunos de los miembros más frecuentemente estudiados son: MSV; *Wheat dwarf virus*, WDV; *Sugarcane streak virus*, SSV; y *Bean yellow dwarf virus*, BeYDV (Figura 0.1).

#### **2.1.2.2 Género *Curtovirus***

Los *Curtovirus* infectan un amplio rango de hospedantes que incluyen cultivos y malezas de varias familias de plantas dicotiledóneas (Bennett, 1971). Los virus de este género presentan un genoma circular de cadena sencilla de aproximadamente 3.0 kb (Creamer *et al.*, 2005). Son transmitidos por cicadélidos y su genoma es monopartita (Bridson *et al.*, 1989; Mumford, 1974). Los virus de este género están conformados por siete genes, tres en sentido viral y cuatro en la cadena complementaria (Gutiérrez *et al.*, 2004). Los genes que están distribuidos en la cadena viral son: V1 (CP) que codifica la cápside del virus y que también es requerida para la infectividad, empaquetamiento y transmisión por cicadélidos; V2 (NSP, nuclear shuttle protein) responsable del transporte del genoma viral del núcleo a citoplasma (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999) y V3 (MP) responsable del movimiento del virus de célula a célula,



mientras que los genes que se encuentran en la cadena complementaria son: C1 (REP) que codifica la proteína que interviene en la replicación viral, el gen C2 (TrAp) que codifica la proteína que controla la transactivación de los genes V1 (CP) y V2 (NSP), el gen C3 (REn) que incrementa la eficiencia de la multiplicación viral, y el gen C4 que aún se desconoce su función. La especie tipo es *Beet curly top virus* (BCTV) (Figura 0.1).

### **2.1.2.3 Género *Topocuvirus***

Este género es el más recientemente establecido y tiene una sola especie (también la especie tipo): *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que tiene un genoma monopartito de 2.8 kb y es transmitido por membrácidos a plantas dicotiledóneas (Delatte *et al.*, 2005; Fauquet y Stanley, 2005; Morales y Anderson, 2001; Polston y Anderson, 1997). Su genoma está conformado por seis genes, dos en sentido viral y cuatro en el sentido complementario. Los genes ubicados en la cadena viral son el gen V1 (CP) que codifica para la proteína de la cápside del virus y el gen V2 (NSP) responsable del transporte del genoma viral del núcleo al citoplasma. Los genes ubicados en la cadena complementaria son: C1 (Rep) que codifica para la proteína ligada con el inicio de la replicación, el gen C2 (TrAp) que controla la transactivación de los genes V1 y V2, el gen C3 (REn) que incrementa la eficiencia de la multiplicación viral, y el gen C4 (se desconoce su función) (Gutiérrez *et al.*, 2004) (Figura 0.1).

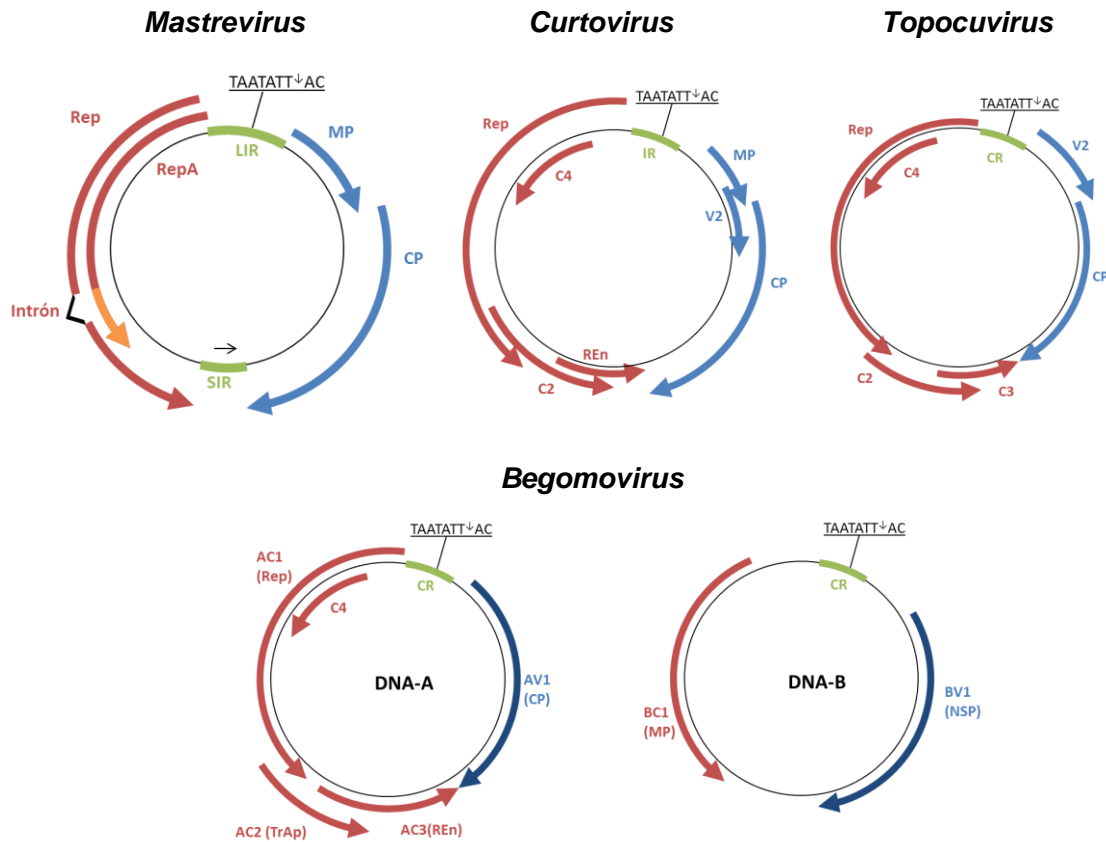
### **2.1.2.4 Género *Begomovirus***

Estos virus se caracterizan por presentar un genoma circular de cadena sencilla. Infectan a plantas dicotiledóneas y son transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Fauquet *et al.*, 2008; Gálvez y Castaño, 1976; Padidam *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 2005). La mayoría de los begomovirus tienen genoma bipartito con dos componentes denominados A y B, cada uno con una longitud de 2.5-3.0 kb. Ambas cadenas tienen una región común de aproximadamente 200 nucleótidos (nt) de longitud altamente conservada en ambos componentes, con secuencias repetidas (iterones), que son los

sitios de unión de la proteína Rep (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Moffat, 1997). Sin embargo, un número menor de begomovirus son monopartitas y tienen un único componente de ADN genómico que es un homólogo al A que codifica todas las proteínas requeridas para la replicación, expresión génica, transmisión e infección sistémica (Stanley *et al.*, 2005).

El componente A típicamente codifica 5 genes, denominados AV1, AC1, AC2, AC3 y AC4, en tanto que el B codifica 2 genes, BV1 y BC1. El componente A contiene toda la información necesaria para la replicación y encapsidación del virus, mientras que el componente B codifica a las proteínas involucradas en el movimiento viral célula-célula y sistémico (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). El producto del gen AV1 es la proteína de la cápside o CP (Kallender *et al.*, 1988) y es necesaria para la transmisión por el insecto (Azzam *et al.*, 1994). El producto de AC1 es Rep, una proteína multifuncional que se une a secuencias específicas, posee actividad de endonucleasa y ATPasa, interactúa con reguladores del ciclo celular, y es esencial para la replicación de ambos componentes genómicos (Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992, Fontes *et al.*, 1994; Gutiérrez, 1999). El producto del gen AC2 es TrAP (proteína activadora de la transcripción), está involucrado en la regulación de los genes virales que se expresan en etapas tardías de la infección (CP y BV1), y actúa como un supresor del mecanismo del silenciamiento de plantas (Sunter *et al.*, 1994; Van Wezel *et al.*, 2001; Van Wezel *et al.*, 2002; Van Wezel *et al.*, 2003). El producto de AC3 se ha denominado REn (proteína potenciadora de la replicación), la cual interactúa con Rep para hacer más eficiente la replicación (Elmer *et al.*, 1988; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Sung y Coutts, 1995; Sunter *et al.*, 1990). El producto de BV1 es la proteína de transporte nuclear (NSP), la cual facilita el movimiento viral del núcleo hacia el citoplasma (Sanderfoot y Lazarowits, 1996), en tanto que el producto de BC1, la proteína de movimiento (MP), funciona como una proteína de movimiento clásica, promoviendo un incremento en el límite de exclusión de los plasmodesmos (Sudarshana *et al.*, 1998; Ward y Lazarowitz, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2004). La especie tipo es *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Los miembros más frecuentemente estudiados son: BGMV; *Tomato Golden mosaic virus*,

TGMV; *African cassava mosaic virus*, ACMV; *Squash leaf curl virus*, SqLcV y *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV. (Figura 0.1).



**Figura 0.1** Genoma de los cuatro géneros de la familia *Geminiviridae* (Gutiérrez *et al.*, 2004). Proteínas codificadas: RepA, proteína asociada con la replicación interactuando con la proteína retinoblastoma; Rep, proteína asociada con el inicio de la replicación; REn, proteína potenciadora de la replicación; TrAP, proteína activadora de la transcripción; CP, proteína de la cápside; MP, proteína de movimiento y NSP, proteína de transporte nuclear. Las proteínas con funciones poco conocidas son nombradas de acuerdo en la posición en el mapa genético. Las regiones no codificantes son la region intergénica larga (LIR) y la región intergénica corta (SIR) en mastrevirus, región intergénica (IR) en curtovirus, y la región común (CR) en topocovirus y begomovirus. La secuencia TAATATTAC es el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante.

## **2.2 *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)**

### **2.2.1 Introducción**

*Bemisia tabaci* (Gennadius) es una de las plagas más destructivas de muchos cultivos a nivel mundial (Bedford *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Byrne y Bellows 1991; Ellsworth y Martínez-Carrillo, 2001; Viscaret *et al.*, 2003). Fue descrita hace más de 100 años como plaga del tabaco en Grecia (Gennadius, 1889). Se ubica en el orden Hemiptera, suborden Sternorrhyncha, familia Aleyrodidae, subfamilia Aleyrodinae. Es una de las 1160 especies de aleyródidos (Gill, 1992) y una de las más estudiadas en los últimos años debido a su amplia distribución geográfica, número de hospedantes, ciclo corto de vida y velocidad reproductiva que permite que alcance altas poblaciones y generaciones resistentes a insecticidas (Hilje, 1995; Rodríguez *et al.*, 2005). Es un insecto polífago con más de 600 hospedantes vegetales, tanto especies silvestres como de importancia económica, pero su mayor importancia es debida al daño indirecto que ocasiona al transmitir geminivirus que causan enfermedades importantes, traducida a su vez en daños severos y pérdidas económicas en los cultivos (Oliveira *et al.*, 2001). El 10% de todos los virus fitopatógenos de plantas conocidos a la fecha son transmitidos por *B. tabaci* (Fauquet *et al.*, 2005; Fauquet *et al.*, 2008). *B. tabaci* presenta numerosos biotipos que difieren en características biológicas y genéticas (Brown *et al.*, 1995; Perring, 2001). Los biotipos B y Q son considerados los más dañinos debido a que son polípagos, propensos a desarrollar resistencia y tienen dispersión global por transporte de material vegetal infestado (Denholm *et al.*, 1998; Horowitz *et al.*, 2005).

### **2.2.2 Ciclo de vida**

*B. tabaci* se caracteriza por tener una metamorfosis incompleta, con seis etapas de vida (huevo, cuatro instares ninfales y adulto). Los huevos miden en promedio 0.2 mm de longitud por 0.1 mm de ancho; inicialmente son de color blanco y se tornan de color marrón a medida que maduran. Presentan una textura lisa y de forma elíptica, con

la parte superior terminada en punta, redondeada en la parte inferior. Presentan un pedicelo o pedúnculo por el cual la hembra fija el huevo en la epidermis del hospedante. Son depositados o adheridos en forma individual, en semi-círculos o en pequeños grupos en el envés de hoja (Mound, 1983). La duración del estadio de huevo varía dependiendo de la temperatura. Bajo condiciones controladas, la duración de la fase de huevo es de 22.5 días a 16.7°C, 7.7 días a 25°C y 5 días a 32.5°C, pero los huevos no eclosionan a 36° (Butler *et al.*, 1983). A 25°C, 75% HR y 16:8 h de luz/oscuridad, el estadio de huevo dura 16.14 días en plantas de frijol, 6.37 días en tabaco, 6.9 en lantana, 7.3 días en tomate y 7.7 días en algodón (Cock, 1986).

El primer instar ninfal es el único que tiene movimiento; es de tamaño pequeño (en promedio 0.26 mm de longitud y 0.16 mm de ancho), hialino y de forma oval. Las ninfas recién emergidas de huevos se mueven unos pocos milímetros para localizar su sitio de alimentación. El segundo y tercer instar son similares, tienen forma acorazonada, son de color blanco verdoso y miden aproximadamente 0.36 mm de longitud y 0.24 mm de ancho. En el cuarto y último instar la ninfa es plana y transparente. A medida que avanza su desarrollo se vuelve opaca y abultada; está provista de dos ojos rojos visibles. Su longitud es de 0.84 mm y 0.59 mm de ancho (Morales *et al.*, 2006). Los criterios para el reconocimiento de los instares ninfales de *B. tabaci* son el tamaño y la secreción de cera del segundo y tercer instar ninfal, lo cual no ocurre en el cuarto. Este último en cierto momento suspende su alimentación y forma una especie de cápsula (pupario), donde se transforma en adulto y del cual emerge a través de una fisura en forma de “T” invertida (Serra, 1996).

Los adultos miden aproximadamente 1-1.5 mm de largo y tienen las alas recubiertas por una sustancia serosa, la cual la vuelve impermeable al agua. Recién emergidas de la pupa son de color amarillo pálido pero en el transcurso de 3-5 horas adquieren el color blanco característico (Caballero, 1996). Los machos viven un promedio de 7.6 y 11.7 días, y las hembras viven en promedio de 8.0 y 10.4 días, a 26.7 y 32.2°C, respectivamente (Butler *et al.*, 1983).

El ciclo de vida de *B. tabaci* varía considerablemente de acuerdo con la temperatura estacional y la planta hospedante. El desarrollo ocurre a temperaturas de entre 10 a 32°C. El ciclo total de huevo a adulto varía de 65.1 días a 14.9°C a 16.6 días a 30°C (Butler *et al.*, 1983). En Egipto, el período de desarrollo es más corto en verano (14-20 días), que en invierno (74-75 días) (Azab *et al.*, 1971). A 26.7°C, en hospedantes como lechuga, pepino, berenjena, y calabacita el desarrollo de *B. tabaci* fue completado en 30% menos tiempo en que en brócoli o zanahoria (Coudriet *et al.*, 1985).

### **2.2.3 Daños**

Los adultos y ninfas de *B. tabaci* se alimentan en el floema de las plantas (Hendrix *et al.*, 1992); cuando son atacadas manifiestan debilitamiento y marchitez (Berlinger, 1986) así como maduración irregular de frutos (Cohen *et al.*, 1992). Sus excreciones, llamadas mielecilla, pueden contener azúcares de la planta y otros azúcares. La acumulación de mielecilla en el envés de las hojas sirve de sustrato para el crecimiento de un hongo saprófito (*Fumago* spp.), el cual tiene un efecto adverso en la fotosíntesis, al impedir la llegada de luz a la superficie foliar (CIAT, 1986; Van Lenteren y Noldus, 1990). Cuando su incidencia es alta llega a invadir también las flores y los frutos (Berlinger, 1986). El rendimiento y la calidad del producto pueden verse reducidos. Además de estos daños potenciales, *B. tabaci* transmite diversos virus pertenecientes a seis géneros (*Begomovirus*, *Closterovirus*, *Carlavirus*, *Potyvirus*, *Nepovirus* y *Luteovirus*) (Duffus, 1996).

De los virus transmitidos por mosca blanca aproximadamente el 90% pertenecen al género *Begomovirus* (Jones, 2003), muchos de los cuales causan pérdidas severas de rendimientos en sus plantas hospedantes (EPPO, 2004).

### **2.2.4 Rango de hospedantes**

Las plantas hospedantes son muy importantes en la supervivencia de *B. tabaci* cuando las condiciones ambientales son desfavorables (Cohen *et al.*, 1996). Esta plaga

sobrevive tanto en cultivos comerciales como en plantas silvestres, las cuales utiliza como refugio o como alimento (Coudriet *et al.*, 1985). *B. tabaci* ha sido registrada alimentándose en más de 600 especies de plantas (Greathead, 1986; Mound y Halsey, 1978; Secker *et al.*, 1998) ubicadas en 74 familias, incluyendo hortalizas, plantas ornamentales, cultivos industriales y numerosas especies silvestres. Entre los hospedantes cultivados atacados por este insecto se encuentran comúnmente plantas que pertenecen a las familias *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, *Cruciferae* y *Compositae*, entre otras (Cuadro 0.1).

**Cuadro 0.1** Rango de hospedantes de mosca blanca (*B. tabaci*).

Familia	Nombre científico	Nombre común
<i>Solanaceae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Chile
	<i>Capsicum frutescens</i>	Pico paloma
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco
	<i>Solanum melongena</i>	Berenjena
	<i>Solanum tuberosum</i>	Papa
	<i>Citrullus lanatus</i>	Sandía
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis melo</i>	Melón
	<i>Cucumis sativus</i>	Pepino
	<i>Cucurbita maxima</i>	Calabaza
	<i>Cucurbita argyrosperma</i>	Pipian silvestre
	<i>Cucurbita moschata</i>	Ayote
	<i>Cucurbita pepo</i>	Calabacita
	<i>Glycine max</i>	Soya
<i>Leguminosae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol
	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa
	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	Col
<i>Cruciferae</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. italica	Brócoli
	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	Coliflor
	<i>Raphanus sativus</i>	Rábano
<i>Compositae</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Girasol
<i>Malvaceae</i>	<i>Hibiscus esculentus</i>	Okra
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	Camote
<i>Asteraceae</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga
<i>Passifloraceae</i>	<i>Passiflora edulis</i> f. flavicarpa	Maracuyá
<i>Pedaliaceae</i>	<i>Sesamum indicum</i>	Ajonjolí
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Uva

Fuente: Brown, (1990); Brown, (1993); Lourencao y Nagai, (1994); Oliveira *et al.* (2001) y Yuki *et al.* (2002).

Aunque *B. tabaci* ha sido considerada como una especie polífaga, se han descubierto poblaciones monófagas (Brown *et al.*, 1995; Perring, 2001; Thompson, 2003).

### 2.2.5 Distribución geográfica

La mosca blanca tiene su origen en la región centro del Oriente Asiático. Fue descrita por primera vez en 1889 por Panayiotis Gennadius como *Aleyrodes tabaci*, posteriormente fue transferida al género *Bemisia* (Gennadius, 1889; Takahashi, 1936). En el Continente Americano esta especie fue reportada por primera vez en 1897 en Estados Unidos, atacando camote (*Ipomoea batatas*). Fue descrita originalmente como *Aleyrodes inconspicua* Quaintance y recibió el nombre común de mosca blanca del camote (Quaintance, 1900). Actualmente, se encuentra ampliamente distribuida al norte de Estados Unidos y Canadá, las Islas del Caribe, América Central y América del Sur y México. Está presente en gran parte del Sur de Europa, África e India y recientemente se dispersó a Australia (Greathead, 1986; McAuslane, 2000; Mound y Halsey, 1978; Secker *et al.*, 1998).

La mayoría de biotipos tienen un limitado rango geográfico y de hospedantes, transmitiendo geminivirus autóctonos de distribución local y son de baja importancia agrícola. Por el contrario, el biotipo B es altamente polífago y se ha dispersado globalmente con el comercio de plantas ornamentales (Brown *et al.*, 1995; Cervera *et al.*, 2000). El biotipo B fue introducido en los Estados Unidos a finales de la década de 1980 (Brown *et al.*, 1995; Ellsworth y Martínez-Carrillo, 2001). Posteriormente, fue identificado en Antigua, Barbados, República Dominicana, Granada, Guadalupe, Puerto Rico, Trinidad y Tobago. A principios de la década de 1990 se detectó en México en el estado de Quintana Roo (Brown, 1994). En 1992, este biotipo fue encontrado al oeste de México (Sonora), Belice y Nicaragua (Brown, 1993). En 1993, también se informó de su presencia en casi toda América Central y Brasil (Brown *et al.*, 1995). Actualmente, *B. tabaci* ha sido reportada ocasionando daños severos en las regiones hortícolas de Sinaloa, Sonora, Baja California, Nayarit, Guerrero, Jalisco, Chiapas y Tamaulipas (Pacheco, 1985).



En el Caribe y América Latina los biotipos A y B están presentes en México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, República Dominicana, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (Chang, 2000; García y López-Ávila, 2000; Hilje *et al.*, 2000; Mejía *et al.*, 2000; Salas y Arnal, 2001; Sermeño y Cervantes, 2000; Torres *et al.*, 2000; Valarezo y Arias de López, 2000; Valencia *et al.*, 2000; Villar *et al.*, 2000). Los países donde se ha reportado el biotipo B son: Belice, Cuba, Puerto Rico, Jamaica, Brasil, Nicaragua y Argentina (Brown, 1993; Brown *et al.*, 2002; Haji *et al.*, 2000; Holguín-Peña *et al.*, 2010; Pantoja y Cabrera, 2000; Vázquez *et al.*, 2000; Viscarret *et al.*, 2003). Mientras que el biotipo Q se ha reportado en China, Túnez, Siria, Egipto, Francia, Israel, Japon, Marruecos, México, Países bajos y España (Bel-Kadhi *et al.*, 2008; Guiro *et al.*, 1997; Fujiie *et al.*, 2009; Horowitz *et al.*, 2003; Horowitz *et al.*, 2005).

### **2.2.6 Biotipos**

Por varias décadas, la mosca blanca fue considerada una única especie cosmopolita morfológicamente invariable (Brown *et al.*, 1995; De Barro *et al.*, 2011). La presencia de biotipos fue reconocida por primera vez en la década de 1950, cuando se descubrió que poblaciones de *B. tabaci* morfológicamente indistinguibles mostraron diferentes rasgos biológicos con respecto a rango de hospedantes, adaptabilidad a la planta hospedante y capacidad de transmisión de virus fitopatógenos (Bird, 1957). Actualmente se conoce que la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) exhibe una gran variación genética y biológica entre las poblaciones naturales (Bedford *et al.*, 1994; Brown, 1993; Brown *et al.*, 1995).

Se ha propuesto la clasificación con base en criterios moleculares, utilizando el gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I [mtCOI] donde de han delimitado hasta 34 especies (Alemndri *et al.*, 2012; De Barro *et al.*, 2011; Dinsdale *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011). Sin embargo, el término biotipo sigue siendo utilizado para identificar las diferentes poblaciones de mosca blanca, no obstante que dicha denominación es considerada ampliamente desacreditada por algunos autores (De Barro *et al.*, 2011; Tay *et al.*, 2012).

Dentro de los biotipos de mosca blanca, los más difundidos son el biotipo A (originario en América), el B (originario del viejo mundo) y el Q (localizado en la cuenca del mar Mediterráneo (Perring, 1996). El biotipo B afecta cultivos que se desarrollan en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Simmonds *et al.*, 2002) y se considera el más importante a nivel mundial (Byrne *et al.*, 1994) ya que ataca en forma severa a cultivos de alfalfa, brócoli, algodón, tomate y papa en Estados Unidos, ocasionando pérdidas cercanas a los 500 millones de dólares (Perring *et al.*, 1993). El biotipo B contrasta con el A en los siguientes aspectos (Perring, 1996): la longevidad del biotipo B es de 34 días y su fecundidad promedio es de 211 huevos con una tasa de oviposición de 6.09 huevos/día (Manzano *et al.*, 2009) casi el doble del biotipo A. El biotipo B, tiene mayor tolerancia al frío que el A, lo cual le permite invadir zonas ubicadas a mayor altitud, así como soportar períodos adversos y recuperar sus poblaciones en forma rápida. El biotipo B presenta mayor rango de hospedantes y ataca cultivos que el A no afecta, entre los que sobresalen el repollo, coliflor, brócoli, lechuga, cítricos y papaya; además, puede completar su ciclo en el cultivo de tomate (Hilje, 2003). Asimismo, ha mostrado altos niveles de resistencia a insecticidas convencionales y susceptibilidad a insecticidas tales como neonicotinoides y reguladores de crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2005; Cahill *et al.*, 1996). El biotipo B induce desórdenes fisiológicos en tomate y maduración desuniforme de los frutos; es el principal diseminador de las enfermedades begomovirales en este cultivo (Holguín-Peña *et al.*, 2010). El biotipo A no se reproduce en el cultivo de tomate (solo en forma leve y esporádica, al final de la temporada del cultivo). Los adultos del biotipo B tienen gran habilidad para diseminar begomovirus. Por ejemplo en estaciones lluviosas bastan densidades de apenas 0,3 adultos/planta para provocar 100% de incidencia en parcelas de tomate (Cubillo *et al.*, 1999). El biotipo A transmite begomovirus causantes de más de 40 enfermedades en cultivos como algodón, papa, tomate, batata, lechuga, frijol, yuca y pepino (Giraldo, 2003).

El biotipo Q se reporta como altamente resistente a insecticidas incluyendo los neo-nicotinoides, los cuales se usan para el control del biotipo B (Martínez y Brown,

2007). Asimismo, el biotipo Q ha demostrado tener una mayor capacidad de adquisición y transmisión de begomovirus (Sánchez-Campos *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2011).

### 3. Literatura citada

- Alemandri V, De Barro P, Bejerman N, Argüello CEB, Dumón AD, Mattio MF, Rodríguez SM and Truoli G. 2012. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *Journal of Economic Entomology* 105:48-53.
- Anon. 2001. Crop Protection Compendium, Global Module, 3rd edn. CAB International CD-Rom Database.
- Ascencio-Ibañez JT, Díaz-Plaza R, Méndez-Lozano J, Monsalve-Fonnegra ZI, Arguello-Astorga GR and Rivera-Bustamante RF. 1999. First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83:1178.
- Ascencio-Ibañez JT, Monsalve-Fonnegra ZI, Pruna-Camacho MB, Díaz-plaza R y Rivera-Bustamante RF. 1999. Los Geminivirus. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:113-127.
- Azab AK, Megahed MM and El-Mirsawi DH. 1971. On the Biology of *Bemisia tabaci* (Genn.). *Societe Entomologie D'Egypte Bulletin* 55:305-315.
- Azzam O, Frazer J, De la Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P and Maxwell DP. 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204:289-296.
- Bañuelos-Hernández B, Mauricio-Castillo JA, Cardenas-Conejo Y, Guevara-González RG and Arguello-Astorga GR. 2012. A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. *Archives of Virology* 157:1835-1841.
- Bedford ID, Briddon RW, Jones P, Alkaff N and Markham PG. 1994. Differentiation of three whitefly-transmitted geminivirus from the Republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology* 100:243-257.

- Bel-Kadhi MS, Onillon JC and Cenis JL. 2008. Molecular characterization of *Bemisia tabaci* biotypes in Southern Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection* 3:79-85.
- Bennett CW. 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants. Monograph No. 7 The American Phytopathological Society St. Paul MN. 81p.
- Berlinger MJ. 1986. Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. *Agriculture Ecosystems and Environment* 17:69-82.
- Bird J. 1957. A whitefly-transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. Technical paper. Agricultural Experimental Station. University of Puerto Rico 22:1-35.
- Bock KR. 1974. Maize streak virus. *In: CMI/AAB Descriptions of plant viruses* No. 133, New England. Commonwealth Mycology Institute. 4p.
- Bridson RW, Watts J, Markham PG and Stanley J. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172:628-633.
- Brown JK and Nelson MR. 1988. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72:866-869.
- Brown JK and Poulos BT. 1990. Serrano golden mosaic virus: a newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and México. *Plant Disease* 74:720.
- Brown JK, 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin* 42:3-32.
- Brown JK, Coats SA, Bedford ID, Markham PG, Bird J and Frohlich DR. 1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemical Genetics* 33:205-214.
- Brown JK, Frohlich DR and Rosell RC. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annual Review of Entomology* 40:511-534.
- Brown JK, Idris AM and Fletcher DC. 1993. *Sinaloa tomato leaf curl virus*, a newly described geminivirus of tomato and pepper in West Coastal Mexico. *Plant Disease* 77:1262.

- Brown JK. 1990. An update on the whitefly-transmitted geminivirus in the Americas and the Caribbean Basin. *FAO Plant Protection Bulletin* 39:5-23.
- Brown JK. 1993. Evaluación crítica sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. Pp. 1-9. *In*: Hilje L y Arboleda O. (eds.). *Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe*. Turrialba, CR, CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico no. 205. 66p.
- Brown S, McLaughlin W, Torres JI, Brown JK. 2002. Identification and distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) haplotypes in Jamaica. *Tropical Agriculture* 79:140-149.
- Butler GD, Henneberry TJ and Clayton TE. 1983. *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): Development, oviposition, and longevity in relation to temperature. *Annals of Entomological Society of America* 76:310-313.
- Byrne DN and Bellows TS. 1991. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* 36:431-457.
- Byrne FJ, Cahill M, Denholm I and Devonshire LA. 1994. A biochemical and toxicological study of the role of insensitive acetylcholinesterase in organophosphorus resistant *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) from Israel. *Bulletin of Entomological Research* 84:179-184.
- Caballero R. 1996. Identificación de moscas blancas. Pp:1-10. *In*: Hilje L. (ed.). *Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus*. CATIE. Turrialba, CR. 135p.
- Cahill M, Gorman K, Day S and Denholm I. 1996. Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research* 86:343-349.
- Camacho-Tapia M, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Hernández-Deheza MG, Carrillo-Salazar JA, Revollar-Alviter A and Ochoa-Martínez DL. 2011. Aetiology of Chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *Journal of Plant Pathology* 93:331-335.

- Cervera MT, Cabezas JA, Simón B, Martínez-Zapater JM, Beitia F and Cenis JL. 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research* 90:391-396.
- Chang R. 2000. Informe de Panamá. Pp:167-169. *In*: Hilje L. (Ed.). *Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus*. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1986. Mosca blanca en el cultivo de yuca: Biología y control. Serie 045C-0405. Auditorial. Cali, Colombia. 34p.
- Cock MJW. 1986. *Bemisia tabaci* a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography. CAB International Institute of Biological Control, Ascot, UK, 121p.
- Cohen AC, Henneberry TJ and Chu CC. 1996. Geometric relationship between whitefly feeding behavior and vascular bundle arrangements. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 78:135-142.
- Cohen S, Duffus JE and Liu HY. 1992. A new *Bemisia tabaci* biotype in the southwestern United States and its role in silverleaf of squash and transmission of lettuce infectious yellow virus. *Phytopathology* 82:86-90.
- Coudriet DL, Prabhaker N, Kishaba AN and Meyerdirk DE. 1985. Variation in Developmental Rate on Different Hosts and Overwintering of the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology* 14:516-519.
- Creamer R, Hubble H and Lewis A. 2005. Curtovirus infection of chile pepper in New Mexico. *Plant Disease* 89:480-486.
- Cubillo D, Sanabria G y Hilje L. 1999. Eficacia de coberturas vivas para el manejo de *Bemisia tabaci* como vector de geminivirus, en tomate. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 51:10-20.
- Davies JW and Stanley J. 1989. Geminivirus genes and vectors. *Trends in Genetics* 5:77-81.

- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM and Dinsdale AB. 2011. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. Annual Review of Entomology 56:1-19.
- Delatte H, Martín DP, Naze F, Goldbach R, Reynaud B, Peterschmitt M and Lett JM. 2005. South West Indian Ocean Islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. Journal of General Virology 86:1533-1542.
- Denholm I, Cahill M, Dennehy TJ and Horowitz AR 1998. Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly *Bemisia tabaci*. Philosophical Transactions: Biological Science 353:1757-1767.
- DGSV-CNRF. 2011. *Candidatus Liberibacter solanacearum* Liefing *et al.*, 2009. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. (DGSV-CNRF) Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. México, D.F. 10p.
- Díaz-Plaza R, Avilés-Baeza WI, Peña-Ramírez R and Rivera-Bustamante R.F. 2002. Geminivirus detected in habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jac) in Yucatán Peninsula. Proceeding of the 16th International pepper conference. Tampico, Tamaulipas, México. November 10-12pp.
- Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM and De Barro P. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. Annals of the Entomological Society of America 103:196-208.
- Duffus JE. 1996. Whitefly borne viruses. Pp:255-263. *In*: Gerling D and Mayer RT. (eds.). *Bemisia* 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management. Intercept Limited., Andover, Hants, UK. 702p.
- Ellsworth PC and Martínez-Carrillo JL. 2001. IPM for *Bemisia tabaci*: a case study from North America. Crop Protection 20:853-869.
- Elmer JS, Brand L, Sunter G, Gardiner WE, Bisaro NM and Rogers SG. 1988. Genetic analysis of *tomato golden mosaic virus*. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. Nucleic Acids Research 16:7043-7060.

- EPPO. 2004. *Bemisia tabaci*. Diagnostic protocols for regulated pests. Pp:281-288. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34.
- Fauquet C and Fargette D. 1990. *African cassava mosaic virus*: etiology, epidemiology, and control. *Plant Disease* 74:404-411.
- Fauquet CM and Stanley J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: Are view of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150:2151-2179.
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M and Zhou X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783-821.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA. 2005. Virus taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 1162p.
- Fontes EP, Gladfelter HJ, Schaffer RL, Petty IT and Hanley-Bowdoin L. 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *The Plant Cell* 6:405-416.
- Fontes EPB, Luckow VA and Hanley-Bowdoin L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *The Plant Cell* 4:597-608.
- Fujiie A, Omar AMS, Sawas AB, Abbas A, Hadi MA, Sawas EA, Barakat A, Ueda S and Natsuaki KT. 2009. Geographic distribution of *Bemisia tabaci* biotypes collected from Autumn-cultured potato fields in Syria. *J ISSASS* 15:12-20.
- Gallegos, HML. 1978. Enchinamiento del tomate (chino disease of tomato). Pp:119. *In: Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa*. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Sinaloa, México. 213p.
- Galvez G and Castaño M. 1976. Purification of the whitefly-transmitted *bean golden mosaic virus*. *Turrialba* 26:205-207.
- García J y López-Ávila A. 2000. Informe de Colombia. Pp:179-183. *In: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus*. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación



- Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Garrido-Ramírez ER and Gilbertson RL. 1998. First report of *tomato mottle geminivirus* infecting tomatoes in Yucatan, Mexico. *Plant Disease* 82:592.
- Garzón-Tiznado JA, Torres-Pacheco I, Ascencio-Ibáñez JT, Herrera-Estrella L and Rivera-Bustamante RF. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83:514-521.
- Gennadius P. 1889. Disease of the tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. *Ellenike Georgia* 5:1-3.
- Gill RJ. 1992. A review of the sweet potato whitefly in Southern California. *Pan-Pacific Entomology* 68:144-152.
- Giraldo BAM. 2003. Problemática de moscas blancas en Caldas como plagas agrícolas y niveles de resistencia a insecticidas en *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Caldas Manizales.
- Goodman RM. 1977. Single-stranded-DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* 1:171-179.
- Greathead AH. 1986. Host plants. Pp:17-26. *In: Cock MJW. (eds.). Bemisia tabaci a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography.* CAB International Institute, Biological Control. Silwood Park, UK. 121p.
- Guiro P, Beita F and Cenis JL. 1997. Biotype determination in Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin Entomological Research* 87:559-587.
- Gutiérrez C, Ramírez-Parra E, Castello MM, Sanz-Burgos AP, Luque A and Missich R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology* 98:111-119.
- Gutiérrez C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:313-329.
- Haji FNP, Lima MF, Barbosa FR, De Alencar JA, Oliveira MRV, Araújo LH A, Bleicher E, Da Silva PHS, Da S and Carneiro J. 2000. Relatório do Brasil. Pp:187-191. *In:*

- Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Hamilton WDO, Bisaro DM, Coutts RHA and Buck KW. 1983. Demonstration of the bipartite nature of genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research* 11:7387-7396.
- Hanley BL, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S and Robertson D. 1999. Geminiviruses; Models for plant DNA replication, transcripción, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106.
- Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S and Robertson D. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcripción, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35:105-140.
- Harrison BD, Barker H, Bock KR, Guthrie EJ, Meredith G and Atkinson M. 1977. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270:760-762.
- Harrison BD. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82.
- Hendrix DL, Wei Y and Leggett JE. 1992. Homopteran honeydew sugar composition is determined by both insect and plant species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 101:23-27.
- Hilje L, Ramírez P and Sibaja G. 2000. Informe de Costa Rica. Pp:163-166. *In*: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Hilje L. 2003. Estatus del manejo de *Bemisia tabaci* en America Latina y el Caribe: ocho preguntas pertinentes. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 70:88-99.
- Hilje L. 1995. Aspectos bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamérica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 35:46-54.

- Holguín-Peña RJ, Hernández-Montiel LG y Latisnere-Barragán H. 2010. Identificación y distribución geográfica de *Bemisia tabaci* Gennadius y su relación con enfermedades begomovirales en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Baja California, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:58-60.
- Holguín-Peña RJ, Vázquez-Juárez R y Rivera-Bustamante R. F. 2004. Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del *virus mosaico dorado del chile* (PepGMV) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:206-215.
- Horowitz AR, Denholm I, Gorman K, Cenis JL, Kontsedalov S and Ishaaya I. 2003. Biotype Q of *Bemisia tabaci* identified in Israel. *Phytoparasitica* 31:94-98.
- Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V and Ishaaya I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives Insect Biochemistry and Physiology* 58:216-225.
- Hu J, De Barro P, Zhao H, Wang J, Nardi F and Liu SS. 2011. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS One* 6:1-9.
- Hull R. 2002. *Matthews' plant virology*, 4th Edición. San Diego: Academic Press. 1001p.
- Idris AM and Brown JK. 1998. *Sinaloa tomato leaf curl geminivirus*: Biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88:648-657.
- Idris AM, Fletcher DC and Brown JK. 1993. Identification and partial characterization of *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV), a new whitefly-transmitted geminivirus affecting tomato and pepper from Sinaloa, Mexico. *Phytopathology* 83:692.
- Jones DR. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109:195-219.
- Kallender H, Petty ITD, Stein VE, Panico M, Blench IP, Etienne AT, Morris HR, Coutis RHA and Buck KW. 1988. Identification of the coat protein gene of *tomato golden mosaic virus*. *Journal of General Virology* 69:1351-1357.
- Khan MS, Ji SH and Chun SC. 2012. Begomovirus and their emerging threats in South Korea: A review. *Plant Pathology Journal* 28:123-136.
- Lazarowitz SG. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11:327-349.

- Liefting LW, Perez-Egusquiza ZC, Clover GRG and Anderson JAD. 2008. A New '*Candidatus Liberibacter*' Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92:1474.
- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS and Clover GRG. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93:208-214.
- Ling K-S, Lin H, Lewis IML, Zhang W and Miller SA. 2011. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Naturally Infecting Tomatoes in the State of Mexico, Mexico. *Plant Disease* 95:1026.
- Lotrakul P, Valverde RA, De la Torre R and Sim J. 2000. Occurrence of a strain of Texas *pepper virus* in *Tabasco* and *Habanero pepper* in Costa Rica. *Plant Disease* 84:168-172.
- Lourencao AL and Nagai H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de Sao Paulo. *Bragantia* 53:53-59.
- Lugo MOY, Guzmán UR, García ERS y León FJ. 2011. Geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate del Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:109-118.
- Manzano MMR, Mosos MAW and Vélez MCA. 2009. Estadísticos vitales de *Bemisia tabaci* biotipo B en frijol e interacción con el parasitoide *Amitus fuscipennis*. *Acta Agronómica* 58:251-259.
- Martínez CJL and Brown KJ. 2007. First Report of the Q Biotype of *Bemisia tabaci* in Southern Sonora, México. *Phytoparasitica* 35:282-284.
- Martínez Y, Quiñones M, Palenzuela I y Muñoz Y. 2006. Diversidad de Begomovirus presentes en Cuba. *Revista Protección Vegetal* 3:149-154.
- Martínez Y. 1998. Contribución al conocimiento de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Cuba. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la Habana. Fructuoso Rodríguez, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Tesis de Doctorado. La Habana 119p.
- Mauricio-Castillo JA, Argüello-Astorga GR, Ambriz-Granados S, Alpuche-Solís AG and Monreal-Vargas CT. 2007. First Report of *Tomato golden mottle virus* on

- Lycopersicum esculentum* and *Solanum rostratum* in Mexico. *Plant Disease* 91:1513.
- Mayo MA and Martelli GP. 1993. New families and genera of plant viruses. *Archives of Virology* 133:496-498.
- Mcauslane H. 2000. *Bemisia tabaci* (Gennadius) or *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring. [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/laf/silverleaf\\_whitefly.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/laf/silverleaf_whitefly.htm). (consulta, enero 2013).
- Mejía L, Palmieri M y Dardon D. 2000. Informe de Guatemala. Pp:148-151. *In*: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Méndez-Lozano J, Rivera-Bustamante RF, Fauquet CM and De la Torre-Almaraz R. 2001. *Pepper hausteco virus* and *Pepper golden mosaic virus* are geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico. *Plant Disease* 85:1291.
- Moffat AS. 1997. Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat. *Science* 286:1835.
- Morales FJ, Cardona C, Bueno MJ y Rodríguez I. 2006. Manejo Integrado de Enfermedades de Plantas causadas por virus transmitidos por moscas blancas. (ed). Francisco J Morales. CIAT. Colombia. 43p.
- Morales FJ and Anderson PK. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin América. *Archives of Virology* 146:415-441
- Mound LA and Hasley SH. 1978. *Whitefly of the World: a Systematic Catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data*. Wiley, New York. 340p.
- Mound LA. 1983. Biology and Identity of whitefly vectors of plant pathogens. Pp:305-313. *In*: Plumb RT and Thresh JM. (eds.). *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell Scientific, Oxford, England. 377p.
- Mumford DL. 1974. Purification of *beat curly top virus*. *Phytopathology* 64:136-139.

- Munyanaza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, Garzón-Tiznado JA, and Cardenas-Valenzuela OG. 2009a. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in México. *Plant Disease* 93:1076.
- Munyanaza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, Garzón-Tiznado JA and Cardenas-Valenzuela OG. 2009b. First Report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in Pepper Plants in México. *Plant Disease* 93:1076.
- Oliveira MRV, Henneberry TJ and Anderson P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20:709-723.
- Pacheco MF. 1985. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. SARH/INIA/CIANO. México. 414 p.
- Padidam M, Beachy RN and Fauquet CM. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76:249-263.
- Pan H, Chu D, Ge D, Wang S, Wu Q, Xie W, Jiao X, Liu B, Yang N, Su Q, Xu B and Zhang Y. 2011. Further spread of and domination by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q on field crops in China. *Journal of Economic Entomology* 104:978-985.
- Pantoja A y Cabrera I. 2000. Informe de Puerto Rico. Pp:176-178. *In*: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Papomatas EJ, Patel VP, Hou YM, Noueiry AO and Gilbertson RL. 1994. Molecular characterization of a new sap-transmission bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology* 84:1215-1224.
- Perring TM, Parrar CA, Rellows TS, Cooper AD and Rodríguez RJ. 1993. Evidence for a new species of whitefly: UCR findings and implications. *California Agriculture* 47:7-8.
- Perring TM. 1996. Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptive advantage. Pp:3-16. *In*: Gerling D and Mayer RT. (eds.). *Bemisia* 1995:

- Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management. Intercept Limited, Andover, Hants, UK. 702p.
- Perring TM. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Protection 20:725-737.
- Polston JE and Anderson PK. 1997. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. Plant Disease 8:1358-1369.
- Pringle CR. 1999. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology. Archives of Virology 144:2065-2070.
- Quaintance AL. 1900. Contributions toward a monograph of the American Aleurodidae. US Department of Agriculture Technical Services Bureau of Entomology. 8:9-64.
- Ramos P. 2004. Identificación y caracterización biológica y molecular de una nueva especie de Begomovirus bipartito: *Tomato mottle taino virus*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Departamento de Plantas, Laboratorio de Virología Vegetal. Cuba. 139 p.
- Rodríguez I, Morales H, Bueno MJ y Cardona MC. 2005. El Biotipo B de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) adquiere mayor importancia en el Valle de Cauca. Revista Colombiana de Entomología 31:21-28.
- Rubio-Covarrubias OA, Almeyda-León IH, Cadena-Hinojosa MA y Lobato-Sánchez R. 2011. Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en lotes comerciales de papa. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2:17-28.
- Rybicki EP and Huges FL. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. Journal of General Virology 71:2519-2526.
- Rybicky EP. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. Archives of Virology 139:49-77
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulta, enero 2013).

- Salas J y Arnal E. 2001. *Bemisia tabaci* (Gennadius 1889) biotipo B, primer reporte en Venezuela a través de RAPD-PCR. *Entomotrópica* 16:181-185.
- Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Camero R, Soria C, Díaz JA, Moriones E. 1999. Displacement of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043
- Sanderfoot AA and Lazarowitz SG. 1996. Getting it together in plant virus movement: Co-operative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology* 6:353-358.
- Secker AE, Bedford IA, Markham PG and William MEC. 1998. Squash, a reliable field indicator for the presence of B biotype of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. Pp:837-842. *In: Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases*. British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- Sermeño JM y Serrano L. 2000. Informe de El Salvador. Pp:152-1561. *In: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus*. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Serra CA. 1996. *Biología de la Mosca Blanca*. CATIE. Guía para el Manejo Integrado de Plagas (MIP). Turrialba, Costa Rica. 11p.
- Simmonds AM, Abd-Rabou S and Mccutcheon GS. 2002. Incidence of parasitoids and parasitism of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in numerous crops. *Journal of Economic Entomology* 31:1030-1036.
- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP and Stenger DC. 2005. Geminiviridae. Pp:301-326. *In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA. (eds.). Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, London. 1162p.
- Stenger DC, Duffus JE and Villalon B. 1990. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.



- Sudarshana MR, Wang HL, Lucas WJ and Gilbertson RL. 1998. Dynamics of Bean Dwarf Mosaic Geminivirus Cell-to Cell and Long-Distance Movement in *Phaseolus vulgaris* Revealed, Using the Green Fluorescent Protein. The American Phytopathological Society 11:277-291.
- Sung YK and Coutts RHA. 1995. Mutational analysis of *potato yellow mosaic geminivirus* 76:1773-1780.
- Sunter G, Hartitz MD, Hormuzdi SG, Brough CL and Bisaro DM 1990. Genetic analysis of *tomato golden mosaic virus*. ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. Virology 179:69-77.
- Sunter G, Stenger DC and Bisaro DM. 1994. Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. Virology 203:203-210.
- Takahashi R. 1936. Some Aleyrodidae, Aphididae, Coccidae (Homoptera) and Thysanoptera from Micronesia. Tenthredo 1:109-120.
- Tay WT, Evans GA, Boykin LM and De Barro PJ. 2012. Will the Real *Bemisia tabaci* Please Stand Up? PLoS ONE 7(11):e50550.
- Thompson WMO. 2003. A new host plant species for the cassava biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hom, Aleyrodidae). Journal of Applied Entomology 127:374-376
- Torres C, Martínez JL y Ramírez JC. 2000. Informe de México. Pp:144-147. In: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.
- Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A and Rivera-Bustamante RF. 1996. Detection and distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. Phytopathology 86:1186-1192.
- Valarezo O y Arias de López M. 2000. Informe de Ecuador. Pp:192-193. In: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.

- Valencia L, Mujica N y Cisneros F. 2000. Informe de Perú: Pp:194-198. *In*: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Van Lenteren JC and Noldus PJJ. 1990. Whiteflies-plant relationships: behavioral and ecological aspects. Pp:47-89. *In*: Gerling D. (Ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept. Andover, RU. 348p.
- Van-Wezel R, Dong X, Liu H, Tien P, Stanley J and Hong Y. 2002. Mutation of Three Cysteine Residues in *Tomato Yellow Leaf Curl Virus-China* C2 Protein Causes Dysfunction in Pathogenesis and Posttranscriptional Gene-Silencing Suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:203-208.
- Van-Wezel R, Liu H, Tien P, Stanley J and Hong Y. 2001. Gen en C2 of the Monopartite Geminivirus *Tomato Yellow leaf curl virus-China* Encodes a Pathogenicity Determinant That Is Localized in The Nucleus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:1125-1128.
- Van-Wezel R, Liu H, Wu Z, Stanley J and Hong Y. 2003. Contribution of the Zinc Finger to Zinc and DNA Binding by a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal Virology* 77:696-700.
- Vázquez LL, Gómez O, González G y Quiñones M. 2000. Informe de Cuba. Pp:170-172. *In*: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.
- Villar A, Álvarez P, Escarramás V y Gómez E. 2000. Informe de Costa Rica. Pp:173-175. *In*: Hilje L. (Ed.). Memorias IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Ministerio de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 22 al 24 de noviembre. Panamá, República de Panamá.

- Viscarret MM, Torres-Jerez I, Agostini de Maneo E, López SN, Botto EE and Brown JK. 2003. Mitochondrial DNA evidence for a distinct New World group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to Argentina and Bolivia, and presence of the old world B biotype in Argentina. *Entomological Society of America* 96:65-72.
- Ward BM and Lazarowits SG. 1999. Nuclear export in plants: Use of geminivirus movement proteins for an in vitro cell based export assay. *Plant Cell* 1:1267-1276.
- Yadava P, Suyal G and Mukherjee SK. 2010. Begomovirus DNA replication and Pathogenicity. *Current Science* 98:360-368.
- Yuki VA, Novaes QS, São José AR, Rezende JAM y Kitajima EW. 2002. Un begomovirus en maracuyá. *Manejo Integrado de Plagas* 64: Mosca Blanca al Día no. 39.
- Zúñiga C y Ramírez P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 64:25-33.

## **CAPÍTULO I. BEGOMOVIRUS ASOCIADOS AL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) EN LOCALIDADES DE COAHUILA, PUEBLA E HIDALGO.**

### **RESUMEN**

En julio de 2009 se observó detención general del crecimiento, clorosis, deformación foliar, reducción de tamaño y cantidad de frutos, característicos de infección por begomovirus en plantas de tomate cultivadas en invernadero en San Pedro, Coahuila; Aquixtla, Altepexi, Atlixco, Ixcaquixtla, Tecamachalco y Tianguismanalco, Puebla; y Metztlán, Hidalgo. Con la finalidad de determinar la presencia de begomovirus en estos tres estados, se colectó tejido foliar de plantas de tomate y de malezas que mostraban los síntomas antes descritos. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales y PCR con iniciadores degenerados para begomovirus. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados. Los resultados de la secuenciación y análisis de BLAST confirmaron la presencia en plantas de tomate de *Tomato yellow leaf curl virus* en Coahuila, *Tomato golden mottle virus*, *Tomato severe leaf curl virus*, *Tomato chino La Paz virus* y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) en Puebla y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) en Hidalgo. Asimismo, se detectó a *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* y *Malva parviflora* como hospedantes de PHYVV y a PepGMV infectando a *Solanum pimpinellifolium*. Se evaluó la incidencia de plantas de tomate con síntomas virales y la dinámica poblacional de mosca blanca en San Pedro, Coahuila. La incidencia de plantas con síntomas de virosis se ajustó mejor al modelo de Gompertz que a los Logístico y Monomolecular y mostró una asociación directa con el mayor incremento de población de mosca blanca.

**Palabras clave:** Mosca blanca, geminivirus, jitomate, malezas, análisis temporal.

## ABSTRACT

In July of 2009, typical symptoms of Begomovirus infection, associated with general growth reduction, chlorosis, leaf deformation and reduction of size and fruit number, were observed in greenhouse grown tomatoes in San Pedro, Coahuila; Aquixtla, Altepexi, Atlixco, Ixcaquixtla, Tecamachalco y Tianguismanalco, Puebla; and Metztlán, Hidalgo. In order to confirm the presence of Begomoviruses in the three States, plant samples of symptomatic tomatoes and associated weeds were collected. Total DNA was extracted from all samples and PCR was run using degenerated primers recommended for Begomovirus. All amplified DNA segments were sequenced. BLAST analysis confirmed the presence of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomatoes of Coahuila, *Tomato golden mottle virus*, *Tomato severe leaf curl virus*, *Tomato chino La Paz virus* and *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) in Puebla, and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) in Hidalgo. *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* and *Malva parviflora* were found to be PHYVV hosts. Also, PepGMV infected *Solanum pimpinellifolium*. Incidence of Begomovirus symptoms on tomato plants and whitefly population dynamics was followed in three locations of San Pedro, Coahuila. Disease dynamics fitted Gompertz models better than Logistic and Monomolecular ones and resulted closely associated with whitefly population peak.

**Keywords:** Whitefly, geminiviruses, tomato, weeds, temporal analysis.

## 1.1 Introducción

La mosca blanca *Bemisia tabaci* Gen. (Hemiptera: Aleyrodidae) se ha convertido en una de las plagas de mayor importancia económica en la producción de vegetales en México debido al daño directo que ocasionan en las plantas, como resultado de su alimentación, y por ser vectoras de virus. El primer reporte de *B. tabaci* como vector de virus en el país fue en el cultivo de algodón en el Valle de Mexicali, a principios de 1950 (Brown y Nelson, 1987). El incremento de las poblaciones, la introducción de nuevos biotipos, la rápida dispersión geográfica y el amplio rango de hospedantes de mosca blanca han dado lugar a un aumento de la incidencia de infecciones virales en los sistemas de producción agrícola desde finales de 1980 (Martínez-Carrillo y Brown, 2007; Rojas *et al.*, 2005; Seal *et al.*, 2006). Los begomovirus son ampliamente transmitidos por *B. tabaci* y causan pérdidas de rendimiento de 20 a 100% (Brown y Bird, 1992). Estos virus se caracterizan por presentar partículas de forma icosaédrica geminada de aproximadamente 18 nm x 30 nm y genoma circular de cadena sencilla (Fauquet *et al.*, 2008; Padidam *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 2005). La mayoría de los begomovirus tienen genoma bipartito con dos componentes denominados A y B, cada uno con una longitud de 2.5-3 kb. Tanto el A y B tienen una región común de aproximadamente 200 nt de longitud, altamente conservada en ambos componentes, con secuencias repetidas (iterones), que son los sitios de unión de la proteína Rep (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Moffat, 1997). Sin embargo, un número menor de begomovirus son monopartitas teniendo un único componente genómico que es un homólogo al A que codifica todas las proteínas requeridas para la replicación, expresión génica, transmisión e infección sistémica (Stanley *et al.*, 2005).

El tomate, uno de los cultivos hortícolas más importantes en México, es severamente afectado por begomovirus, de los cuales el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) es el más devastador y de mayor distribución geográfica (Abhary *et al.*, 2007; Picó *et al.*, 1996). Este virus tiene un genoma circular monopartito (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Navot *et al.*, 1991) y se transmite en forma persistente y circulativa por *B. tabaci* (Cohen y Nitzany, 1966; Rubinstein y Czosnek, 1997). Se identificó por primera

vez en Israel en 1939 (Picó *et al.*, 1996) y en México se le detectó en 1996 en la península de Yucatán (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999); posteriormente se ha encontrado en Sinaloa (Brown y Idris, 2006; Gámez-Jiménez *et al.*, 2006), Sonora (Idris *et al.*, 2007), Baja California Sur (Cárdenas-Conejo, 2010) y San Luis Potosí (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2012). Las plantas infectadas muestran enanismo y crecimiento erecto o vertical, con entrenudos cortos, y frecuentemente suelen tener un aspecto arbustivo. Las hojas son extremadamente pequeñas, se enrollan hacia el haz, muestran un fuerte rizado, amarillamiento intervenal y marginal, y se tornan coriáceas. El ataque del virus también produce abscisión de flores y reducción de tamaño y cantidad de frutos (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010; de Sá *et al.*, 2008; Idris *et al.*, 2007; Salati *et al.*, 2002). Además del TYLCV, los begomovirus reportados en México afectando al cultivo del tomate son *Pepper golden mosaic virus* (Brown y Poulos, 1990; Stenger *et al.*, 1990), *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (Brown *et al.*, 1993; Idris *et al.*, 1993), *Tomato mottle virus* (Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998), *Chino del tomate virus* (Brown y Nelson, 1988; Paplomatas *et al.*, 1994), *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2012; Holguín-Peña *et al.*, 2010), *Pepper huasteco yellow vein virus* (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996), *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV) (Holguín-Peña *et al.*, 2004), *Squash leaf curl virus* (Lugo *et al.*, 2011), *Cucurbit leaf crumple virus* (Lugo *et al.*, 2011) y *Tomato golden mottle virus* (ToGMoV) (Mauricio-Castillo *et al.*, 2007). De todos ellos los más importantes por su distribución, ocurrencia y patogenicidad son el *Pepper huasteco yellow vein virus* y *Pepper golden mosaic virus* (Holguín-Peña *et al.*, 2004).

Los virus antes indicados se han reportado principalmente en los estados de Sinaloa, Baja California, Sonora, San Luis Potosí y Morelos. Sin embargo, no hay información de su ocurrencia en otras entidades federativas por lo que se planeó la presente investigación con el objetivo de identificar a los begomovirus que atacan el cultivo de tomate y malezas asociadas, en localidades de Coahuila, Puebla e Hidalgo y analizar la asociación entre la dinámica de la mosca blanca y la incidencia de plantas de tomate con síntomas de virosis.

## 1.2 Materiales y métodos

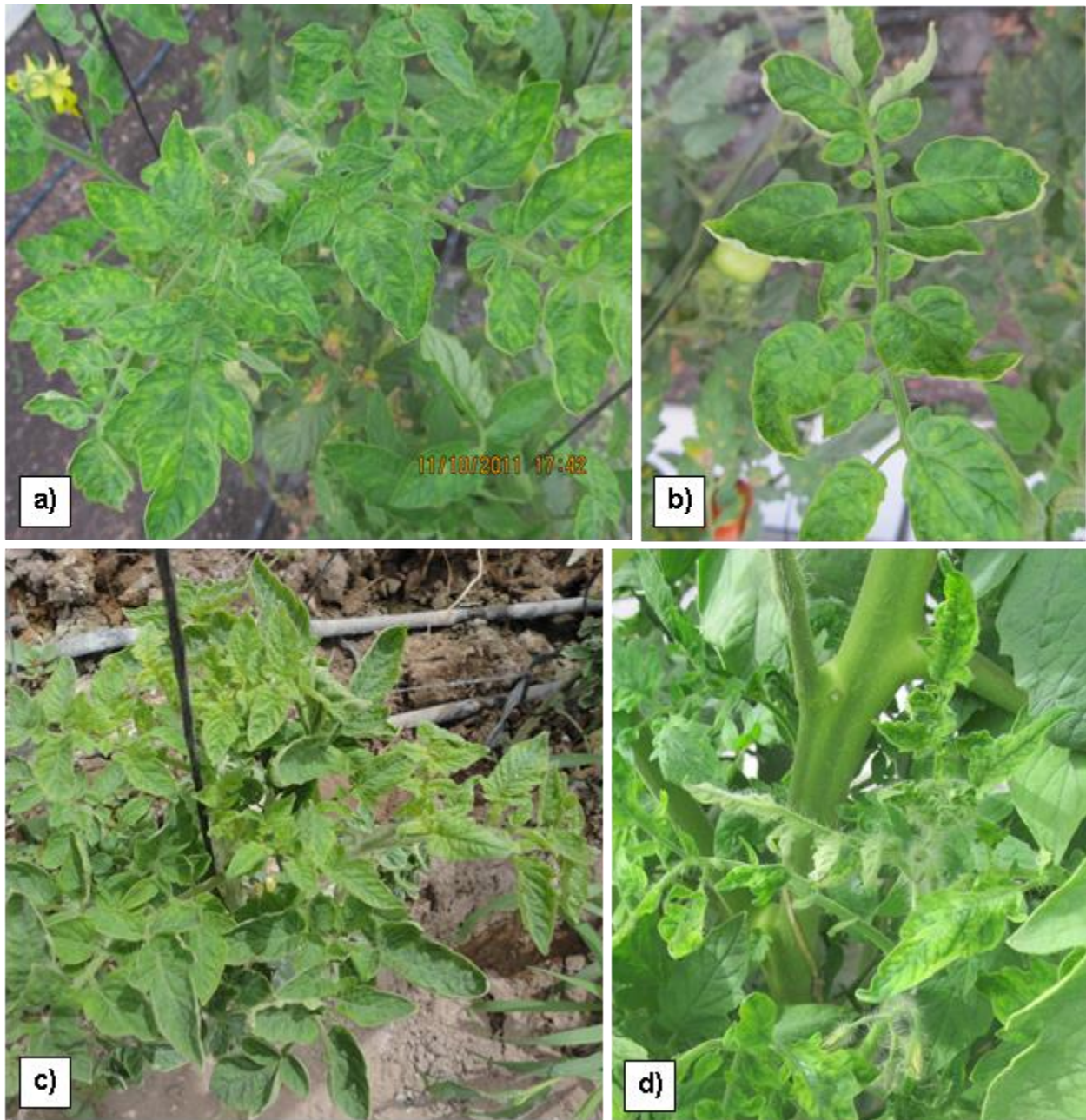
### 1.2.1 Colección de material vegetal

Plantas de tomate y de malezas con síntomas típicos de begomovirus (Figura I.1 y I.2) y asintomáticas, fueron colectadas en el período 2009-2012 en invernaderos de producción comercial localizados en San Pedro, Coahuila; Aquixtla, Altepexi, Atlixco, Ixcaquixtla, Tecamachalco y Tianguismanalco, Puebla; y en Metztlán, Hidalgo. En San Pedro, Coahuila la colecta se realizó en la comunidad de Rosita, en octubre de 2009, donde se muestrearon 13 plantas de tomate, 11 de tigestromia (*Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia*), ocho de malva (*Malva parviflora*), siete de diente de león (*Taraxacum officinale*), siete de verdolaga (*Portulaca oleraceae*), siete de la hierba del negro (*Sphaeralcea angustifolia*), siete de trompillo (*Solanum elaeagnifolium*), seis de nabo de campo (*Brassica rapa*) y cinco de quelite espinoso (*Amaranthus spinosus*). Un segundo muestreo se realizó en esta misma localidad en septiembre de 2012 en la cual se colectaron 17 plantas de tigestromia, ocho de verdolaga, siete de trompillo, siete de malva, cinco de tabachín (*Nicotiana glauca*) y cuatro de tomate. En Puebla la toma de muestras se realizó durante los meses de abril y mayo de 2011, donde se colectaron un total de 68 plantas de tomate; 13 en la localidad de Coayuca, Aquixtla; 11 en El León, Atlixco; 10 en San Juan Tianguismanalco, Tianguismanalco; nueve en San José la Portilla, Tecamachalco; nueve en Ixcaquixtla, Ixcaquixtla; ocho en Cuatro Rayas, Ixcaquixtla; y ocho en San Rafael, Altepexi. En Metztlán, Hidalgo, el muestreo se realizó en la comunidad de La Paila en agosto de 2011, donde se colectaron nueve plantas de tomate y dos de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium*). Las malezas colectadas se identificaron a nivel de especie con ayuda de las claves de Villarreal (1983). La especie *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* fue identificada por Ph.D. James M. Andre, del Departamento de Biología, Reserva Sweeney Granite Mountains Desert Research Center, Universidad de California en Riverside.





**Figura I.1** Síntomas asociados a begomovirus en plantas de tomate colectadas en San Pedro, Coahuila, México. (a) Retraso de crecimiento, enrollamiento de hojas hacia el haz, caída prematura de flores y reducción de número y tamaño de frutos, (b) acortamiento de entrenudos que dan un aspecto arbustivo a la planta, amarillamiento intervenal y marginal, (c) reducción moderada y (d) severa de la lámina foliar.



**Figura I.2** Síntomas asociados a begomovirus en plantas de tomate colectadas en Puebla. (a) Mosaicos cloróticos, (b) borde de la hoja ligeramente curvada hacia el haz y mosaicos cloróticos ligeros, (c) clorosis y síntomas ligeros de enchinamiento y (d) clorosis y arrugamiento de las hojas.

### 1.2.2 Amplificación por PCR

En todos los casos se extrajo ADN total utilizando el producto comercial Plant RNA Purification Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de begomovirus se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores degenerados CoPR, 5'-GA(AGCT)G(GC)ATG(ACT)GT(AG)CA(AGT)GCCATATA-3' y AV494, 5'-GCC(CT)AT(AG)TA(CT)AG(AG)AAGCC(AC)AG-3' que amplifican un fragmento de 570 pb (Zhang *et al.*, 2008). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µL conteniendo 4 µL de cada iniciador (10 µM), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 1 µL dNTPs (10 mmol/L), 5 µL 10xPCR buffer y 0.4 µL de Taq polimerasa (5U/µL). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador automático (Perkin-Elmer Cetus<sup>®</sup>, Norwalk, CT, 2400) con las siguientes condiciones: 94°C por 4 min, 35 ciclos de amplificación a 94°C por 1 min, 50°C por 45 s y 72°C por 45 s, seguido por un paso de elongación final a 72°C por 10 min (Chouchane *et al.*, 2006). Cada fragmento obtenido fue purificado mediante el kit comercial Wizard PCR Preps<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI) y posteriormente secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 1.2.3 Análisis de secuencias

La búsqueda en la base de datos del GenBank para secuencias homólogas fue realizada utilizando el servicio de red BLASTn, disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD, USA). Múltiples secuencias representativas de nucleótidos (nt) de begomovirus obtenidas del GenBank fueron alineadas con el módulo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del software Mega versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Como especie externa (outgroup) se utilizó la secuencia de *Spinach curly top virus* (número de acceso NC\_005860). Se construyeron árboles filogenéticos con el algoritmo Neighbour-joining, utilizando como método de distancia el modelo de Kimura 2-parámetros, en el programa MEGA ver. 4 (Tamura *et al.*, 2007). Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis de re-muestreo con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

#### **1.2.4 Estudio temporal de la incidencia de virosis y dinámica poblacional de mosca blanca**

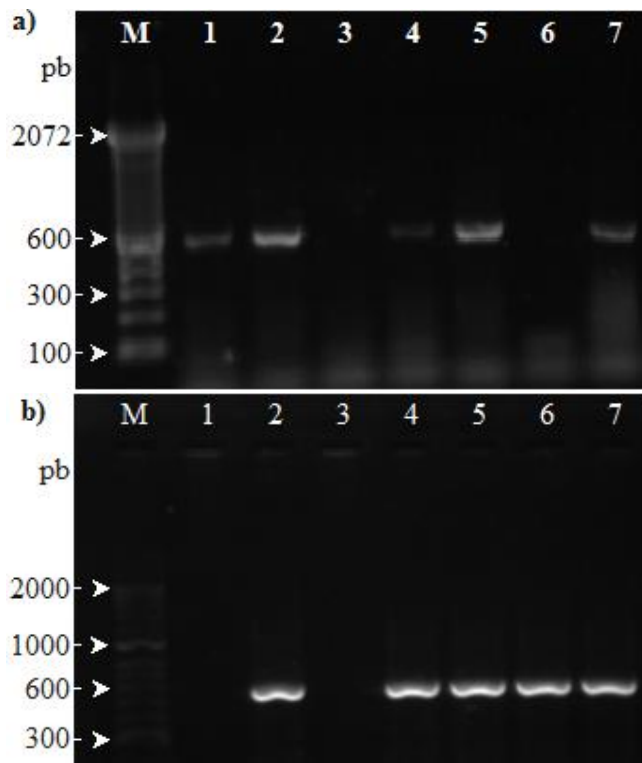
La incidencia acumulada de plantas con virosis fue monitoreada en tres plantaciones comerciales de tomate del 10 de agosto al 26 de octubre de 2009 en la localidad de Rosita, San Pedro, Coahuila. En cada predio comercial (cuatro hectáreas) se hizo una inspección visual cada siete días de 300 plantas para registrar la aparición de síntomas tales como deformación foliar, moteados, clorosis, detención del crecimiento, abscisión de flores y reducción de tamaño y cantidad de frutos, característicos de begomovirus (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010; Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998; Mauricio-Castillo *et al.*, 2006), bajo un esquema de muestreo sistemático. Los datos de incidencia de cada predio se graficaron con respecto al tiempo para obtener curvas de progreso de la enfermedad usando los modelos de Gompertz (Berger, 1981), Monomolecular y Logístico (Varderplank, 1963) y determinar el modelo de mejor ajuste. El análisis fue realizado mediante el programa SAS (Statistical Analysis System ver. 9.0). Asimismo, cada siete días, durante el período del 31 de agosto al 19 de octubre de 2009, se revisó la hoja de la parte superior ubicada inmediatamente debajo de la inflorescencia abierta más alta de 100 plantas de tomate por predio para registrar el número de adultos de mosca blanca. El monitoreo se realizó por la mañana antes de las 9:00 h, cuando la actividad de vuelo de los adultos es baja.

### **1.3 Resultados y discusión**

#### **1.3.1 Amplificación de fragmentos**

Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 570 pb en tejido analizado por PCR (Figura I.3) con el par de iniciadores degenerados CoPR/AV494, de muestras de tomate y malezas procedentes de Coahuila (Figura I.1), Puebla (Figura I.2) e Hidalgo que mostraban síntomas putativos a la infección por begomovirus. En las muestras de tomate procedentes de Coahuila se detectó amplificación en ocho de 13 y tres de cuatro muestras procesadas, en el primer y segundo muestreo, respectivamente. Cinco

muestras del primer muestreo y dos del segundo fueron secuenciadas. En el caso de las malezas se observó amplificación en dos de ocho muestras de malva y en dos de 11 muestras en tidestromia colectadas en el primer muestreo; todas ellas fueron secuenciadas. No hubo amplificación en muestras de verdolaga, trompillo, quelite espinoso, diente de león, nabo de campo, tabachín y hierba del negro. En el segundo muestreo no se tuvo amplificación en ninguna de las muestras de maleza colectadas.



**Figura I.3** Productos de PCR obtenidos con el par de iniciadores universales CoPR y AV494 para begomovirus. a) Malezas. Línea M, marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); línea 1, malva; línea 2, malva; línea 3, control negativo (planta de tomate sana); línea 4, tidestromia; línea 5, tidestromia; línea 6, verdolaga; línea 7, control positivo (planta de tomate infectada con begomovirus). b) Plantas de tomate. Línea M, marcador molecular 100 pb (hyperladder II® Bioline); Línea 1, control negativo (agua); Línea 2, muestra colectada en Coahuila; Línea 3, control negativo (planta de tomate sana); Líneas 4-6, muestras colectadas en Puebla; Línea 7, muestra colectada en Hidalgo.

En el estado de Puebla se tuvo amplificación en 11 de 68 muestras de tomate analizadas de las cuales siete fueron secuenciadas. En el caso del estado de Hidalgo se detectó amplificación en dos de nueve muestras de tomate y en las dos muestras de tomate silvestre colectadas. En todos estos casos se realizó también la secuenciación del producto amplificado en PCR.

### 1.3.2 Análisis de secuencias

Las siete muestras de tomate procedentes de Coahuila que amplificaron y fueron secuenciadas mostraron una similaridad del 100% con aislamientos de TYLCV de Baja California, Sonora y Sinaloa. Las secuencias de las dos muestras de malva y las dos de tidiestromia mostraron una identidad del 99% un aislamiento de *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) de Oaxaca, México (núm. de acceso HE967657). En el caso del estado de Puebla, la muestra de tomate colectada en Atlixco y las dos procedentes de Tianguismanalco mostraron una identidad del 98% con un aislamiento de *Tomato golden mottle virus* (ToGMoV) de Rioverde, San Luis Potosí (núm. de acceso EF501976); mientras que las dos muestras colectadas en Tecamachalco mostraron una identidad del 99% con aislamientos de PHYVV y la muestra colectada en la comunidad de Cuatro Rayas, Ixcaquixtla mostró una identidad del 98% con el aislamiento *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV) de Guatemala (núm. de acceso AF130415). La muestra procedente de Ixcaquixtla, Ixcaquixtla, tuvo una identidad de 99% con un aislamiento de *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) (núm. de acceso DQ347948). En el estado de Hidalgo las dos muestras de tomate y las dos muestras de tomate silvestre mostraron una identidad del 98% con aislamientos de *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV). La variedad de begomovirus identificados en este estudio es reportada en el Cuadro I.1.

No todas las plantas de tomate que mostraban síntomas característicos de begomovirus reportados por otros autores amplificaron para éstos, lo cual sugiere la posibilidad de que hayan sido infectadas por otros virus de los géneros *Nepovirus*, *Tospovirus*, *Crinivirus* y *Torradovirus* que han sido previamente reportados en México

(Álvarez-Ruíz *et al.*, 2007; De La Torre-Almaráz *et al.*, 2002; Holguín-Peña y Rueda-Puente, 2007; Pérez-Moreno *et al.*, 2004; Verbeek *et al.*, 2008).

**Cuadro I.1** Begomovirus detectados mediante PCR con los iniciadores degenerados CoPR/AV494 en tomate y malezas de 2008 a 2012 en los estados de Coahuila, Puebla e Hidalgo.

<b>Begomovirus</b>	<b>Planta hospedante</b>	<b>Sitio de colecta</b>	<b>Año de colecta</b>	<b>Números de acceso GenBank</b>
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	<i>S. lycopersicum</i>	San Pedro, Coahuila.	2009 y	KC479056
		(25°50'59.25"N y 103°07'41.52"O).	2012	KC479057
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i> (PHYVV)	<i>T. suffruticosa</i> var. <i>oblongifolia</i>	San Pedro, Coahuila.	2009	KC479058
		(25°50'59.25"N y 103°07'41.52"O).		
	<i>M. parviflora</i>	San Pedro, Coahuila.	2009	KC479059
		(25°50'59.25"N y 103°07'41.52"O).		
	<i>S. lycopersicum</i>	Tecamachalco, Puebla.	2011	KC479060
		(97°44'56.20"N y 18°48'52.21"O).		
<i>Tomato golden mottle virus</i> (ToGMoV)	<i>S. lycopersicum</i>	Atlixco, Pue.	2011	KC479061
		(98°27'46.69"N y 18°55'56.07"O).		
	<i>S. lycopersicum</i>	Tianguismanalco, Puebla.	2011	KC479062
		(98°26'14.94"N y 18°59'56.81"O).		
<i>Tomato chino La Paz virus</i> (ToChLPV)	<i>S. lycopersicum</i>	Ixcaquixtla, Puebla.	2011	KC479063
		(18°28'16.90"N y 97°51'11.74").		KC479064
<i>Tomato severe leaf curl virus</i> (ToSLCV)	<i>S. lycopersicum</i>	Ixcaquixtla, Puebla.	2011	KC479065
		(18°32'26.95"N y 97°50'48.12"W).		KC479066
<i>Pepper golden mosaic virus</i> (PepGMV)	<i>S. lycopersicum</i>	Metztitlán, Hidalgo.	2011	KC479067
	y <i>S. pimpinellifolium</i>	(20°32'10.70"N y 98°43'17.90"O).		

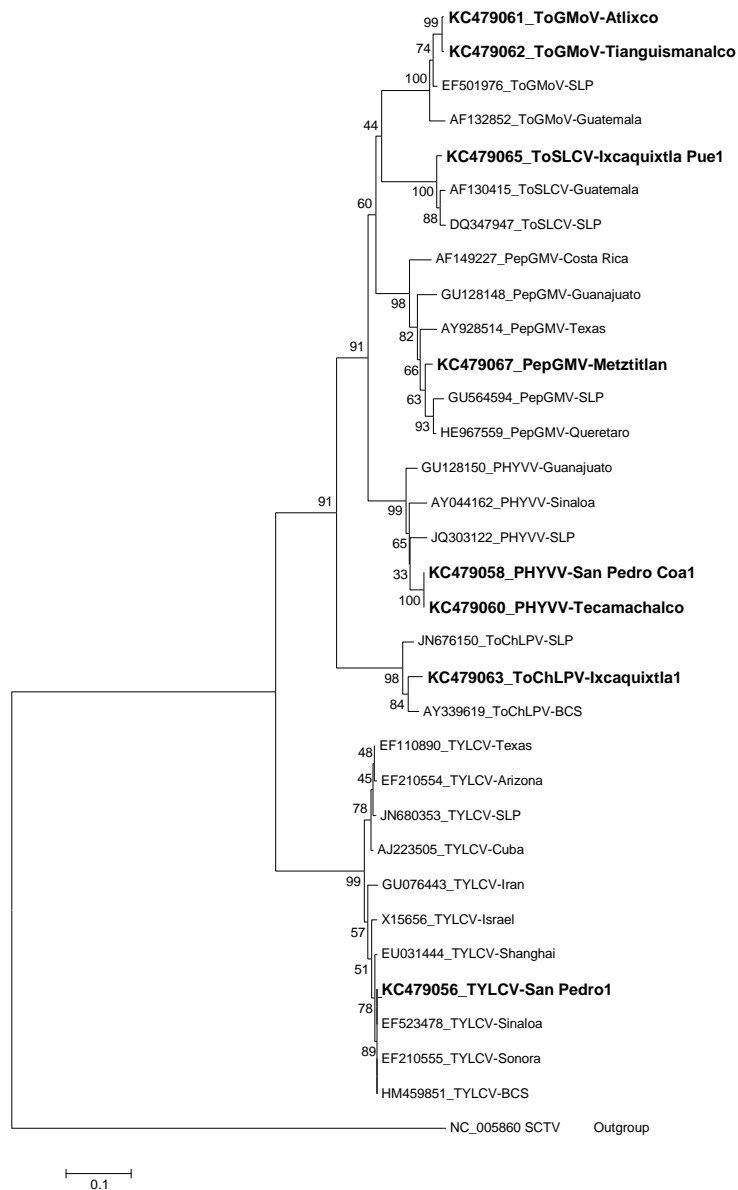
Los begomovirus PepGMV y PHYVV detectados en este estudio han sido reportados frecuentemente en cultivos de tomate en México (Méndez-Lozano *et al.*,

2003; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996) y son considerados los más importantes de este género en México por su distribución, ocurrencia y patogenicidad (Holguín-Peña *et al.*, 2004). Los virus TYLCV, ToGMoV, ToSLCV y ToChLPV tienen una distribución más restringida ya que sólo se les ha reportado en ciertos estados de la república mexicana, por lo que las detecciones hechas en el presente estudio contribuyen al conocimiento de la distribución geográfica de begomovirus en este país.

En este estudio se encontró a la malva y al tomate silvestre como hospedantes de begomovirus, tal como lo reportó Jones (2003). Por otro lado, Nischwitz y Olsen (2011) señalaron a *Tidestromia lanuginosa* (Gomphrenoideae, Amaranthaceae) como hospedante de virus del género *Curtovirus* (familia *Geminiviridae*) mientras que en la presente investigación se detectó al *Pepper huasteco yellow vein virus* en esta misma especie vegetal, por lo que este es el primer reporte de un begomovirus asociado a este hospedante, el cual se encuentra restringido a los desiertos de América del Norte con los niveles más altos de endemismo en el desierto de Sonora (Sánchez-del Pino y Motley, 2010).

El análisis filogenético basado en los fragmentos amplificados de la secuencia del aislamiento de TYLCV identificado en este estudio en Coahuila mostró una relación más estrecha con aislamientos de Sonora, Baja California, Sinaloa y Shanghai, los cuales forman una rama independiente (Figura 1.4). Estos aislamientos estuvieron menos relacionados con el aislamiento de TYLCV de San Luis Potosí que presenta una delección de 29 nucleótidos similar a la de los aislamientos de Texas y Arizona (Idris *et al.*, 2007). Los aislamientos de ToGMoV y ToSLCV detectados en Puebla estuvieron estrechamente relacionados con aislamientos de ToGMoV y ToSLCV de San Luis Potosí y de Guatemala, respectivamente, mientras que el aislamiento de ToChLPV detectado en Puebla mostró una relación más cercana con el aislamiento de Baja California Sur. Finalmente, los aislamientos de PHYVVy PepGMV tuvieron una relación estrecha con otros aislamientos mexicanos (Figura 1.4).

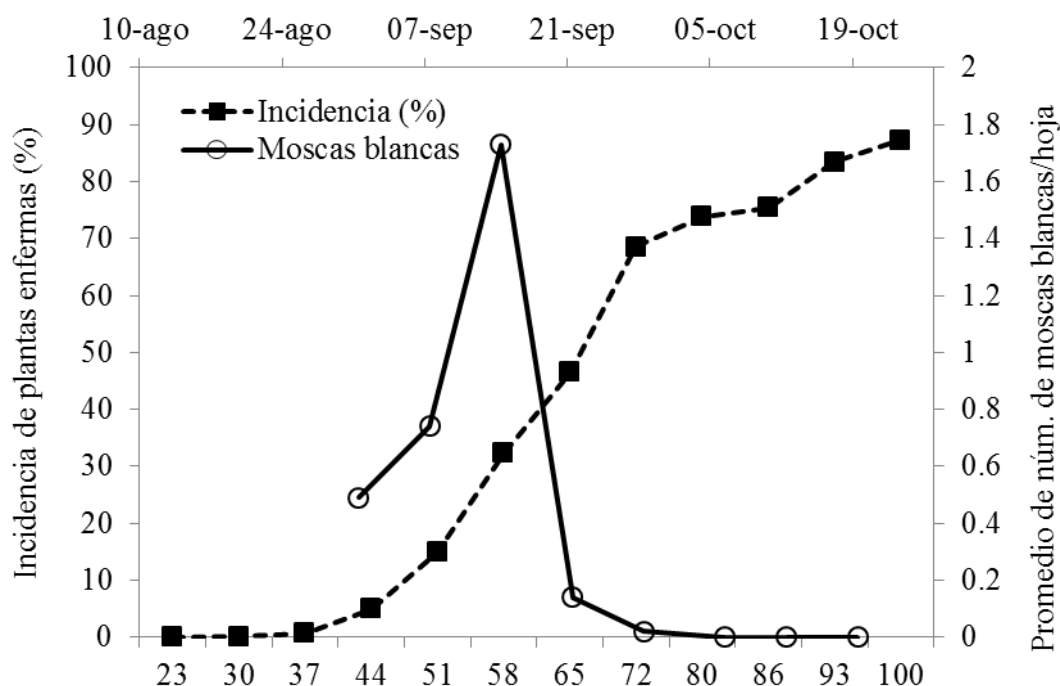




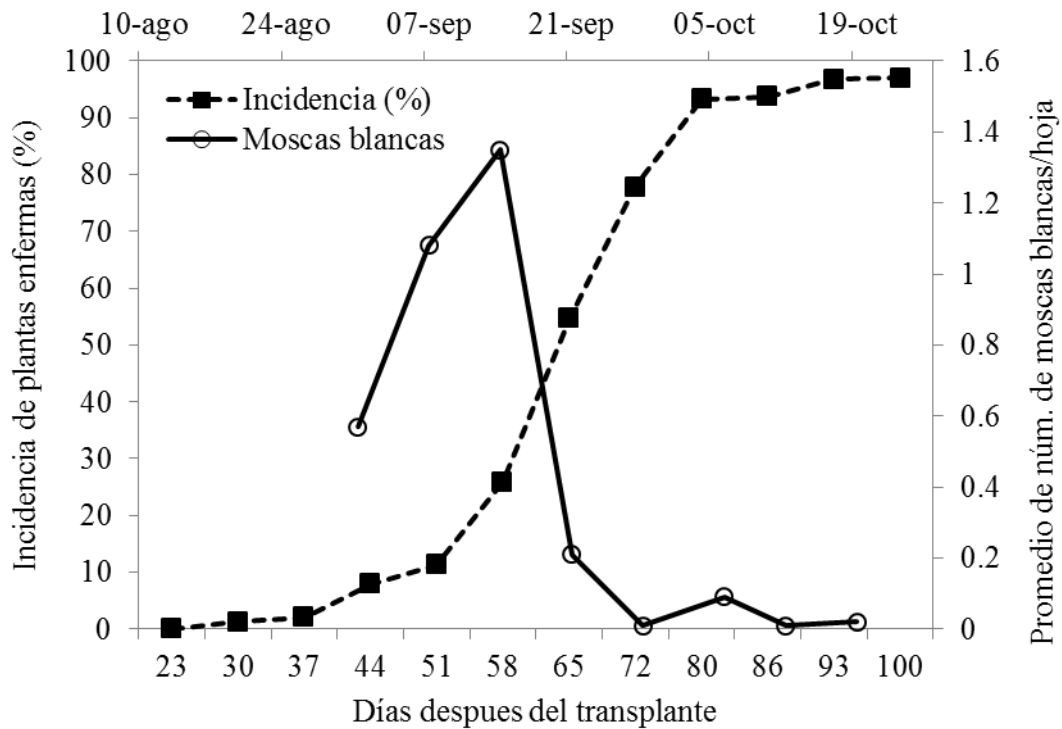
**Figura I.4** Análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside de begomovirus identificados en este estudio (en negritas) y de secuencias reportadas en la base de datos Genbank. Como especie externa (outgroup) se utilizó la secuencia de *Spinach curly top virus*. El árbol filogenético fue elaborado con el algoritmo Neighbour-joining, al cual se le aplicó un bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores bootstrap se indican al inicio de cada nodo.

### 1.3.3 Análisis temporal de la virosis y densidad de mosca blanca

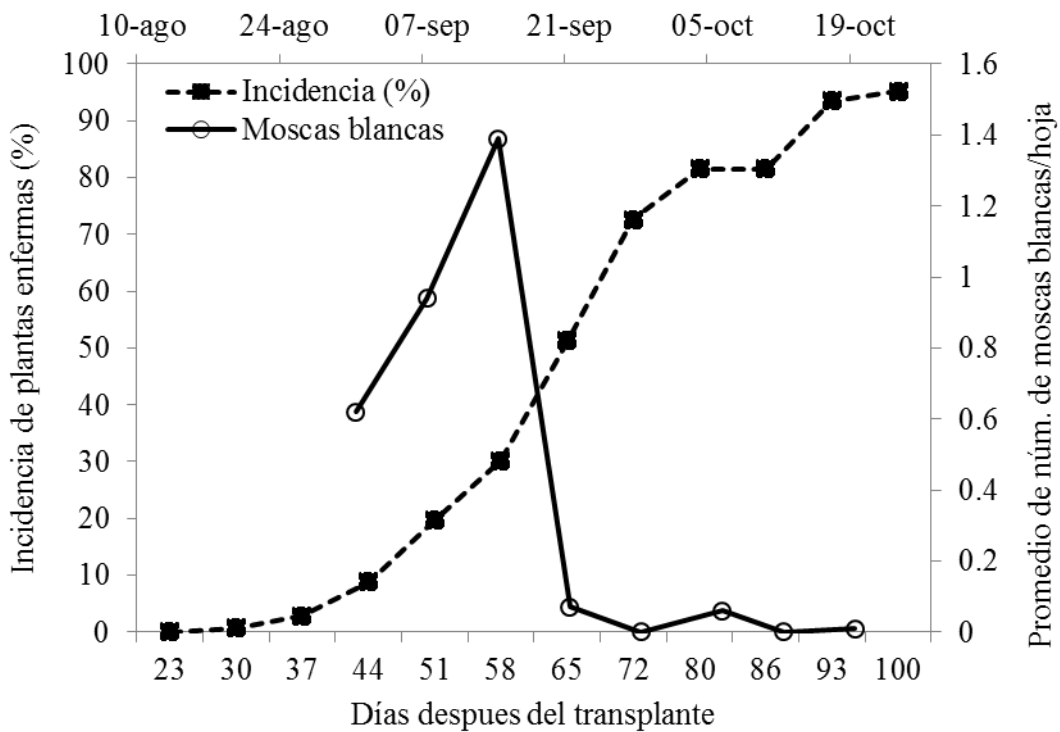
La incidencia de plantas con síntomas de virosis mostró una relación consistente con la dinámica del vector. Los primeros síntomas virales se observaron a los 30 días después del trasplante (ddt) alcanzando una incidencia de 87 a 97% a los 100 ddt. Las curvas de incidencia de virosis en los tres predios fueron similares. El nivel de infección se incrementó de finales de agosto a septiembre y alcanzó una meseta en octubre (Figuras I.5, I.6 y I.7). Las curvas del progreso de la enfermedad en las tres localidades tuvieron mejor ajuste al modelo de Gompertz, con un coeficiente de determinación ( $R^2 > 96$ ) y significancia estadística ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro I.2).



**Figura I.5** Incidencia acumulada de plantas con síntomas asociados a begomovirus e infestación de mosca blanca a diferentes fechas de muestreo en un predio comercial de tomate denominado “Pachuca” en San Pedro de las Colonias, durante el ciclo de producción otoño-invierno 2009.



**Figura I.6** Incidencia acumulada de plantas con síntomas asociados a begomovirus e infestación de mosca blanca a diferentes fechas de muestreo en un predio comercial de tomate denominado “Valvula 0” en San Pedro de las Colonias, durante el ciclo de producción otoño-invierno 2009.



**Figura I.7** Incidencia acumulada de plantas con síntomas asociados a begomovirus e infestación de mosca blanca a diferentes fechas de muestreo en un predio comercial de tomate denominado “Marte” en San Pedro de las Colonias, durante el ciclo de producción otoño-invierno 2009.

**Cuadro I.2** Resumen de los parámetros estadísticos de tres modelos de crecimiento poblacional linealizados para describir la curva de progreso de la enfermedad correspondiente a la infección por *Begomovirus* observada en tres predios comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum*) en San Pedro, Coahuila, México.

Parcela	Modelo	Criterios estadísticos				
		Parámetros de los modelos	Significancia de los parametros	R <sup>2</sup>	Pr > F	CME
<b>Pachuca</b>	Gompertz	$\beta_{0=}$ -3.5482	<0.0001	0.9878	<0.0001	0.0288
		$\beta_{1=}$ 0.0574	<0.0001			
	Logístico	$\beta_{0=}$ -9.7716	<0.0001	0.8812	<0.0001	1.6573
		$\beta_{1=}$ 0.1321	<0.0001			
	Monomolecular	$\beta_{0=}$ -1.0405	0.0001	0.9265	<0.0001	0.0472
		$\beta_{1=}$ 0.0291	<0.0001			
<b>Valvula 0</b>	Gompertz	$\beta_{0=}$ -4.3492	<0.0001	0.9662	<0.0001	0.1589
		$\beta_{1=}$ 0.0803	<0.0001			
	Logístico	$\beta_{0=}$ -9.7528	<0.0001	0.9200	<0.0001	1.3003
		$\beta_{1=}$ 0.1457	<0.0001			
	Monomolecular	$\beta_{0=}$ -2.0003	0.0008	0.8737	<0.0001	0.2874
		$\beta_{1=}$ 0.0531	<0.0001			
<b>Marte</b>	Gompertz	$\beta_{0=}$ -3.8082	<0.0001	0.9880	<0.0001	0.0384
		$\beta_{1=}$ 0.0670	<0.0001			
	Logístico	$\beta_{0=}$ -9.2093	<0.0001	0.8904	<0.0001	1.5197
		$\beta_{1=}$ 0.1324	<0.0001			
	Monomolecular	$\beta_{0=}$ -1.5037	0.0007	0.8818	<0.0001	0.1548
		$\beta_{1=}$ 0.0405	<0.0001			

$\beta_{0=}$  Intercepción de los modelos;  $\beta_{1=}$  Pendiente de los modelos; R<sup>2</sup>= Coeficiente de determinación; Pr>F= significancia estadística; y CME= Cuadrado Medio del Error.

Los niveles de infestación de mosca blanca variaron de 0 a 1.5 adultos por hoja y las densidades poblacionales más altas se observaron de agosto a octubre, período que coincidió con la cosecha del 91% (13,140 ha) de la superficie sembrada de algodón en el municipio de San Pedro, Coahuila (SAGARPA, 2010). Lo anterior sugiere

el movimiento de una elevada cantidad de moscas blancas hacia los cultivos hortícolas establecidos en la región. El desplazamiento o migración de mosca blanca de plantaciones de algodón a otros cultivos ha sido observada en el suroeste de los Estados Unidos (Blua *et al.*, 1994; Nuessly *et al.*, 1994). *B. tabaci* puede reproducirse en más de 500 especies diferentes de plantas (Greathead, 1986), por lo que resulta imposible eliminar completamente todas las plantas hospedantes de un área. Sin embargo, períodos libres de cultivos pueden reducir las migraciones masivas de este insecto directamente de un cultivo a otro y así reducir el impacto de poblaciones de mosca blanca y la incidencia de virus.

#### **1.4 Conclusiones**

En plantas de tomate con síntomas de infección por begomovirus procedentes de Coahuila, Puebla e Hidalgo, se detectaron los virus TYLCV, PHYVV, ToGMoV, ToSLCV, ToChLPV y PepGMV. Asimismo, se encontró a *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* y *M. parviflora* como hospedantes de PHYVV y a PepGMV infectando a *S. pimpinellifolium*. En los predios comerciales de tomate evaluados en San Pedro, Coahuila, el inicio de la manifestación de síntomas virales ocurrió a los 30 días después del trasplante (ddt) alcanzando una incidencia final del 87 a 97% a los 100 ddt, asociada con las poblaciones de mosca blanca. La incidencia de plantas con síntomas se ajustó al modelo de Gompertz.

#### **1.5 Literatura citada**

- Abhary M, Patil BL and Fauquet CM. 2007. Molecular biodiversity, taxonomy, and nomenclature of tomato yellow leaf curl-like viruses. Pp:85-118. *In*: Czosnek H. (ed.), Tomato Yellow Leaf Curl Disease, Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 448p.
- Alvarez-Ruiz P, Jimenez CG, Leyva-López NE and Méndez-Lozano J. 2007. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Sinaloa, México. *Plant Pathology* 56:1043.

- Ascencio-Ibañez JT, Díaz-Plaza R, Méndez-Lozano J, Monsalve-Fonnegra ZI, Arguello-Astorga GR and Rivera-Bustamante RF. 1999. First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83:1178.
- Bañuelos-Hernández B, Mauricio-Castillo JA, Cardenas-Conejo Y, Guevara-González RG and Arguello-Astorga GR. 2012. A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. *Archives of Virology* 157:1835-1841.
- Berger RD. 1981. Comparison of the Gompertz and Logistic equations to describe plant disease progress. *Phytopathology* 71:716-719.
- Blua MJ, Perring TM, Nuessly GS, Duffus JE and Toscano NC. 1994. Seasonal cropping pattern effects on abundance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and incidence of lettuce infectious yellows virus. *Environmental Entomology* 23:1422-1427.
- Brown JK and Bird J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76:220-225.
- Brown JK and Idris AM. 2006. Introduction of the exotic monopartite *Tomato yellow leaf curl virus* into West Coast Mexico. *Plant Disease* 90:1360.
- Brown JK and Nelson MR. 1987. Host range and vector relationships of cotton leaf crumple virus. *Plant Disease* 71:522-524.
- Brown JK and Nelson MR. 1988. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72:866-869.
- Brown JK and Poulos BT. 1990. *Serrano golden mosaic virus*: a newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and México. *Plant Disease* 74:720.
- Brown JK, Idris AM and Fletcher DC. 1993. *Sinaloa tomato leaf curl virus*, a newly described geminivirus of tomato and pepper in West Coastal Mexico. *Plant Disease* 77:1262.
- Cárdenas-Conejo Y, Arguello-Astorga G, Poghosyan A, Hernández-González J, Lebsky V, Holguín-Peña J, Medina-Hernández D and Vega-Peña S. 2010. First Report of

- Tomato yellow leaf curl virus* Co-infecting Pepper with *Tomato chino La Paz virus* in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 94:1266.
- Chouchane SG, Gorsane F, Louzir H, Nakhla MK, Marrakchi M and Fakhfakh H. 2006. Development of a real-time PCR for *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*. *Acta Virologica* 50:101-105.
- Cohen S and Nitzany FE. 1966. Transmission and host range of the *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 56:1127-1131.
- De La Torre-Almaráz R, Cervantes-Díaz L, Houston HA and Valverde R. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia* 36:211-221.
- de Sá PB, Seebold KW and Vincelli P. 2008. First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in greenhouse tomatoes in Kentucky. *Plant Health Progress*. [www.plantmanagementnetwork.org/](http://www.plantmanagementnetwork.org/) (consulta, julio 2012).
- Fauquet C, Briddon R, Brown J, Moriones E, Stanley J and Zerbini M. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783-821.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Gámez-Jiménez C, Álvarez-Ruiz P, Ruelas-Ayala RD, Leyva-López NE and Méndez-Lozano J. 2006. Presence of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting tomato in Sinaloa, México. *Phytopathology* 96:S38.
- Garrido-Ramirez ER and Gilbertson RL. 1998. First report of tomato mottle geminivirus infecting tomatoes in Yucatán, México. *Plant Disease* 82:592.
- Garzón-Tiznado JA, Torres-Pacheco I, Ascencio-Ibáñez JT, Herrera-Estrella L and Rivera-Bustamante RF. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83:514-521.
- Greathead AH. 1986. Host plants. Pp:17-26. *In*: Cock MJW. (ed.). *Bemisia tabaci* a Literature Survey on the Cotton Whitefly with an Annotated Bibliography. CAB International Institute, Biological Control. Silwood Park, UK. 121p.



- Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S and Robertson D. 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106.
- Holguín-Peña RJ and Rueda-Puente EO. 2007. Detection of *Tomato spotted wilt virus* in Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease* 91:1682.
- Holguín-Peña RJ, Hernández-Montiel LG y Latisnere-Barragán H. 2010. Identificación y distribución geográfica de *Bemisia tabaci* Gennadius y su relación con enfermedades begomovirales en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Baja California, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:58-60.
- Holguín-Peña RJ, Vázquez-Juárez R y Rivera-Bustamante RF. 2004. Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y rango de hospedantes en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:206-215.
- Idris AM, Fletcher DC and Brown JK. 1993. Identification and partial characterization of *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV), a new whitefly-transmitted geminivirus affecting tomato and pepper from Sinaloa, Mexico. *Phytopathology* 83:692.
- Idris AM, Guerrero JC and Brown JK. 2007. Two Distinct Isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* Threaten Tomato Production in Arizona and Sonora, Mexico. *Plant Disease* 91:910.
- Jones DR. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109:195-219.
- Lugo MOY, Guzmán UR, García ERS y León FJ. 2011. Geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate del Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:109-118.
- Martínez-Carrillo JL and Brown JK. 2007. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in southern Sonora, Mexico. *Phytoparasitica* 35:282-284.
- Mauricio-Castillo JA, Argüello-Astorga GR, Alpuche-Solís AG, Monreal-Vargas CT, Díaz-Gómez O and De La Torre-Almaraz R. 2006. First Report of *Tomato severe leaf curl virus* in México. *Plant Disease* 90:1116.
- Mauricio-Castillo JA, Argüello-Astorga GR, Ambriz-Granados S, Alpuche-Solís AG and Monreal-Vargas CT. 2007. First Report of *Tomato golden mottle virus* on

- Lycopersicon esculentum* and *Solanum rostratum* in Mexico. *Plant Disease* 91:1513.
- Méndez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM and Rivera-Bustamante RF. 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93:270-277.
- Moffat AS. 1997. Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat. *Science* 286:1835.
- Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D and Czosnek H. 1991. *Tomato yellow leaf curl virus*: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185:151-161.
- Nischwitz C and Olsen M. 2011. Beet Curly Top Disease (Curtoviruses) in Spinach and Table Beets in Arizona. University of Arizona Cooperative Extension Publication AZ1552. 4p.
- Nuessly GS, Meyerdirk DE, Coudriet DL and Henneberry TJ. 1994. The effect of short season cotton production schedules on *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Southwestern Entomologist* 19:209-217.
- Padidam M, Beachy RN and Fauquet CM. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76:249-263.
- Paplomatas EJ, Patel V, Hou YM, Noueiry AO and Gilbertson RL. 1994. Molecular characterization of a new sap-transmission bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in México. *Phytopathology* 84:1215-1224.
- Pérez-Moreno L, Rico-Jaramillo E, Sánchez-Palé JR, Ascencio-Ibáñez JT, Díaz-Plaza R y Rivera-Bustamante RF. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:187-197.
- Picó B, Díez MJ and Nuez F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus*-a review. *Scientia Horticulturae* 67:151-196.

- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ and Gilbertson RL. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43:361-394
- Rubinstein G and Czosnek H. 1997. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78:2683-2689.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulta, agosto 2012).
- Salati R, Nahkla MK, Rojas MR, Guzman P, Jaquez J, Maxwell DP and Gilbertson RL. 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92:487-496.
- Sánchez-del Pino I and Motley TJ. 2010. Evolution of *Tidestromia* (Amaranthaceae) in the Deserts of the Southwestern United States and Mexico. *Taxon* 59:38-48.
- Seal SE, vandenBosch F and Jeger MJ. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:23-46.
- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP and Stenger DC. 2005. Family Geminiviridae. Pp:301–326. *In*: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA. (eds.). *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press. 1259p.
- Stenger DC, Duffus JE and Villalon B. 1990. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A and Rivera-Bustamante RF. 1996. Detection and distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.
- Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Herrera-Estrella L and Rivera-Bustamante RF. 1993. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology* 74:2225-2231.
- Vanderplank JE. 1963. *Plant disease: Epidemics and Control*. New York and London. Academic Press. 349 p.
- Verbeek M, Dulleman AM., van den Heuvel JF, Maris PC and van der Vlugt RA. 2008. Tomato marchitez virus, a new plant picorna-like virus from tomato related to tomato torrado virus. *Archives of Virology* 153:127-134
- Zhang YP, Zhu WM, Cui HM, Qiu Y, Sha K, Wan YH, Zhu LY, Yu L and Hui Z. 2008. Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TLCV isolate from Shanghai of China. *Virus Genes* 36:547-551.

## **CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE *Candidatus Liberibacter psyllaeus* ASOCIADO AL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN INVERNADERO, PUEBLA, MÉXICO**

### **RESUMEN**

La bacteria fitopatógena *Candidatus Liberibacter psyllaeus* (Orden Rhizobiales, Familia Phyllobacteriaceae), también conocida como *Ca. L. solanacearum*, fue identificada por primera vez en México en el estado de Sinaloa en el 2009 y desde entonces ha sido reportada en otros estados (Sinaloa, Coahuila, Estado de México, Michoacán, Guanajuato y Puebla) en cultivo de chile, papa y tomate en invernadero y campo abierto. Durante el 2011 síntomas típicos por infección de *Ca. L. psyllaeus*, tales como detención general de crecimiento, clorosis, deformación foliar y abscisión de flores, fueron observados en cultivo de tomate en invernadero en el estado de Puebla. Con la finalidad de determinar la posible presencia de *Ca. L.*, durante abril a agosto de 2011, muestras de plantas de tomate con síntomas y asintomáticas fueron colectadas en 12 municipios de Puebla. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales a partir de la vena central de hojas y pecíolos, y PCR con los pares de iniciadores CLi.po/O12c, y Lp Frag 4-(1611F)/Lp Frag 4-(480R), que amplifican un fragmento de la región del gen 16S rADN y de la región 16S-ISR-23S rADN, respectivamente. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados. Los resultados del análisis de BLAST y filogenético confirmaron la presencia de *Ca. L. psyllaeus* en plantas de tomate en los municipios de Atlixco, Ixcaquixtla, Juan N. Méndez, Tecamachalco, Tepexi de Rodríguez y Tianguismanalco, Puebla. Este es el primer reporte de *Ca. L. psyllaeus* asociado con cultivo de tomate en Puebla.

**Palabras clave:** *Bactericera cockerelli*, diagnóstico molecular, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sintomatología.

## ABSTRACT

The bacterial plant pathogen *Candidatus Liberibacter* (Order Rhizobiales, Family Phyllobacteriaceae), also known as *Ca. Liberibacter solanacearum* was identified for the first time in Sinaloa, Mexico in 2009 and since then it has been reported in other states (Sinaloa, Coahuila, Estado de Mexico, Michoacan, Guanajuato and Puebla) on pepper, potato and tomato grown under greenhouse and field conditions. During 2011, typical symptoms of *Ca. Liberibacter* infection, associated with general growth reduction, chlorosis, leaf deformation and flower abscission, were observed in greenhouse grown tomatoes in Puebla. In order to determine the possible presence of *Ca. L. psyllauros*, during April-August 2011, symptomatic and asymptomatic tomato plant samples were collected in 12 municipalities of the state of Puebla. Plant DNA was extracted from leaf midribs and petioles of plants and tested by PCR for '*Ca. Liberibacter*' species with primer pairs CLi.po/O12c, y Lp Frag 4-(1611F)/Lp Frag 4-(480R), which amplify a sequence from the 16S rDNA and partial 16S-ISR-23S rDNA region, respectively. All amplified DNA segments were sequenced. The results of BLAST and phylogenetic analysis confirmed the presence of *Ca. L. psyllauros* in tomato plants in the municipalities of Atlixco, Ixcaquixtla, Juan N. Mendez, Tecamachalco, Tepexi of Rodriguez and Tianguismanalco, Puebla. This is the first report of *Ca. L. psyllauros* associated with tomatoes in Puebla.

**Keywords:** *Bactericera cockerelli*, molecular diagnostics, polymerase chain reaction (PCR), symptomatology.

## 2.1 Introducción

Los psílicos (Hemiptera: Psylloidea) son plagas importantes de cultivos a nivel mundial (Camerota *et al.*, 2012; Munyaneza, 2010). Estos insectos pueden causar daño a las plantas por alimentación directa, así como por la transmisión de patógenos. Recientemente, una bacteria asociada a *Liberibacter*, tentativamente llamada *Candidatus Liberibacter psyllaourous* (también conocida como *Ca. L. solanacearum*), se reportó en Nueva Zelanda afectando a cultivos de solanáceas (Liefting *et al.*, 2008a; Liefting *et al.*, 2009); su vector es el psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) (Hansen *et al.*, 2008). La bacteria fue posteriormente identificada en este mismo país en tamarillo (*Solanum betaceum*) y uchuva (*Physalis peruviana*) (Liefting *et al.*, 2008b), y en papa y tomate en Estados Unidos (Abad *et al.*, 2009; Crosslin y Bester, 2009; Lin *et al.*, 2009; McKenzie y Shatters, 2009). Aunque hay evidencias de que *Ca. L. psyllaourous* se encontraba afectado a cultivos de tomate en EU desde el 2002 (McKenzie y Shatters, 2009).

En México, se ha confirmado la presencia de *Ca. L. psyllaourous* en el cultivo de tomate en Sinaloa y Estado de México (Ling *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009a), en chile en Sinaloa y Michoacán (Camacho *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009b) y en papa en Coahuila, Estado de México, Guanajuato y Puebla (DGSV-CNRF, 2011; Rubio-Covarrubias *et al.*, 2011).

Los síntomas ocasionados por *Ca. Liberibacter* en tomate están asociados a la enfermedad conocida como “permanente del tomate”, que es comúnmente relacionada con fitoplasmas (Holguín-Peña *et al.*, 2007) y que se reportó en México por primera vez en el área del Bajío (Garzón- Tiznado, 1984). Esta bacteria causa pérdidas de millones de dólares en la industria del tomate en invernaderos comerciales en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2009). Asimismo, los síntomas ocasionados con este patógeno en plantas de papa se relacionan con los síntomas de la enfermedad conocida como “Zebra Chip” o punta morada de la papa (Secor *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2008a; Munyaneza *et al.*, 2009c), enfermedad que fue identificada por primera vez en campos comerciales de papa en Saltillo, Coahuila, en el año de 1994 y

que ha causado pérdidas de varios millones de dólares para los agricultores de la zona central y oeste de Estados Unidos, México y Centroamérica (Lin *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2007).

El patógeno *Ca. L. psyllauros* es una alfa-proteobacteria limitada al floema, gram-negativa, no cultivable en medios artificiales, se transmite de una planta enferma a una sana por injerto o por el psílido vector (Bove, 2006). Los síntomas ocasionados por *Ca. Liberibacter* en tomate incluyen clorosis o moteado general, crecimiento apical clorótico con una coloración púrpura de venas medias dependiendo del cultivar, deformación de las hojas, brotes excesivos de yemas axilares, retraso en el crecimiento de la planta, aborto de flores, reducción del tamaño y mala calidad de frutos y en algunos cultivares deformación de frutos. La fruta se puede deformar, tomar una apariencia similar a la fresa y tener un desarrollo desigual de los lóculos (Brown *et al.*, 2010; Liefting *et al.*, 2009; McKenzie y Shatters, 2009; Munyaneza *et al.*, 2009a).

Debido a la importancia de este patógeno, el presente estudio tiene como objetivo determinar la ocurrencia de *Ca. Liberibacter* en las regiones productoras de tomate en el Estado de Puebla.

## **2.2 Materiales y métodos**

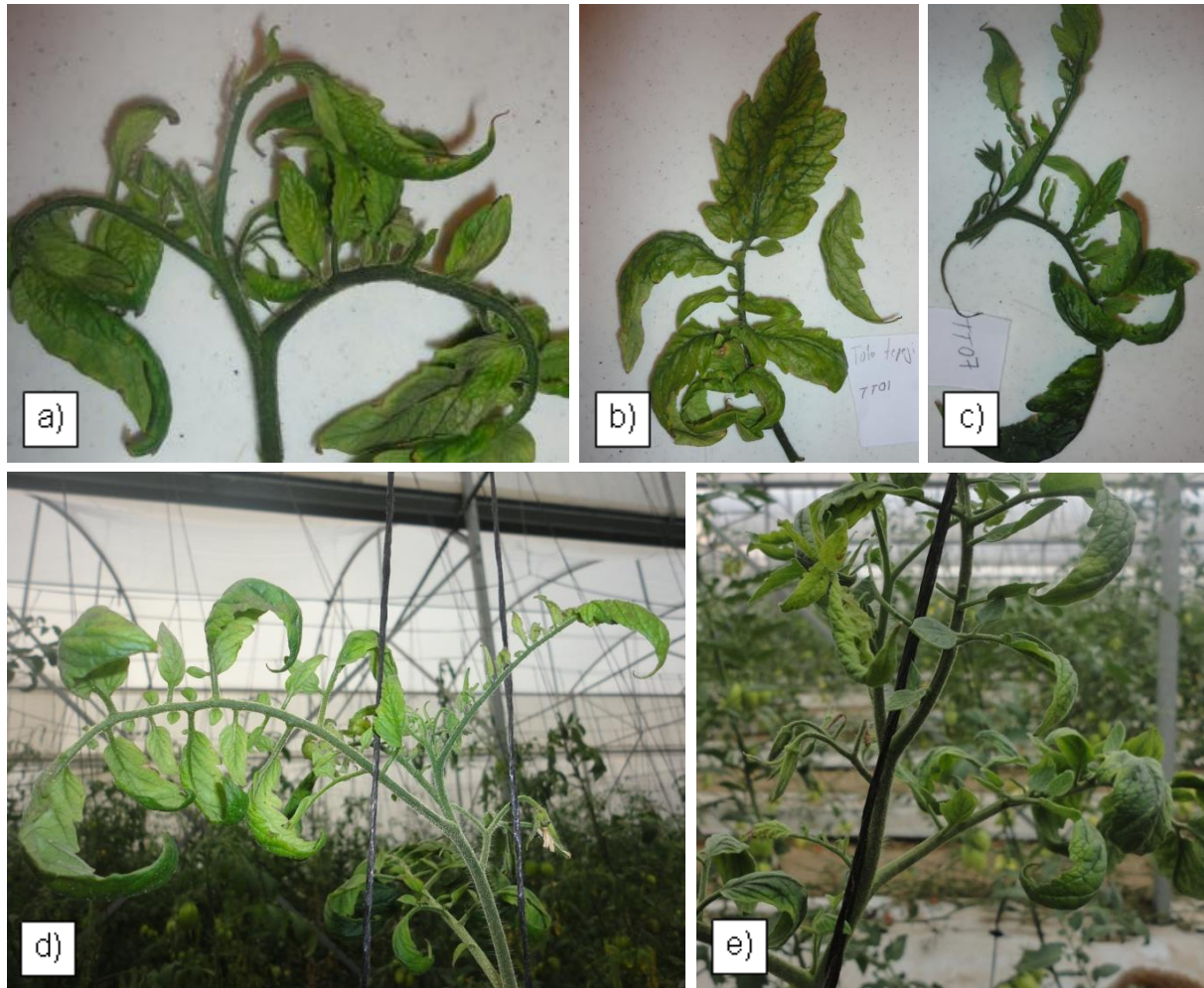
### **2.2.1 Colección de material vegetal y extracción**

Plantas de tomate con síntomas similares a los ocasionados por *Ca. Liberibacter* (Figura II.1), tales como retraso en el crecimiento, clorosis, distorsión foliar y abscisión de flores (Brown *et al.*, 2010; Liefting *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2011; McKenzie y Shatters, 2009; Munyaneza *et al.*, 2009a) y asintomáticas, fueron colectadas en abril, mayo y agosto de 2011, en el estado de Puebla. Se colectaron un total de 72 plantas de tomate; 13 en la localidad de Coayuca, Aquixtla; ocho en El León, Atlixco; tres en Ixcaquixtla, Ixcaquixtla, seis en Guadalupe Victoria, Juan N. Méndez; tres en Moriyotla, San Andrés Cholula; siete en San José la Portilla, Tecamachalco; seis en La Constanza, Tepanco de López; dos en La Joya, Tepexco; siete en Tula, Tepexi de

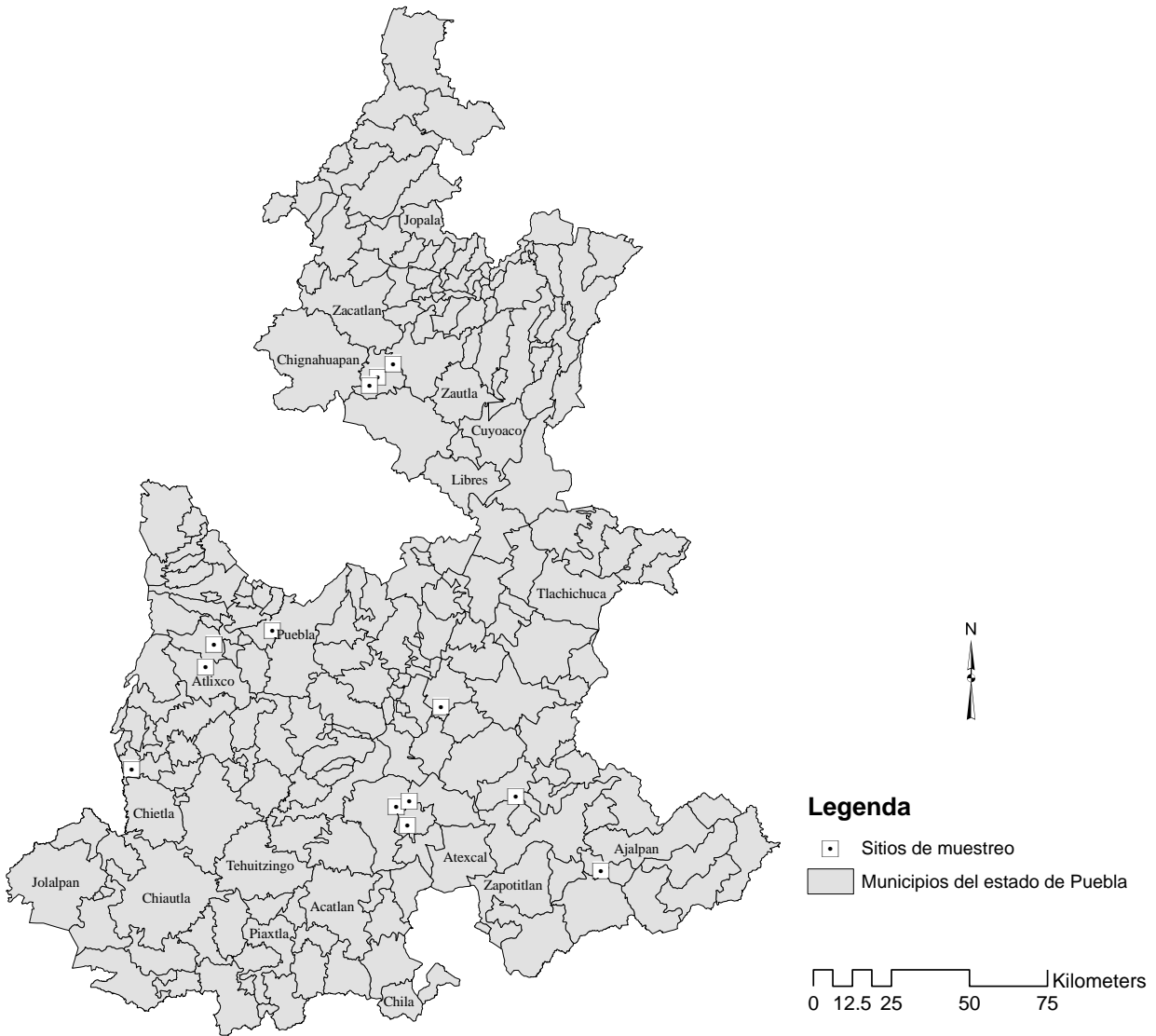


Rodríguez; ocho en San Martín (El Llano), Tetela de Ocampo; seis en San Juan Tianguismanalco, Tianguismanalco; y cuatro en Zinacatepec, Zinacatepec (Figura II.2).

Se extrajo el ADN total de la vena central de las hojas y pecíolos utilizando el producto comercial Plant Purification Reagent® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



**Figura II.1** Síntomas asociados a la infección por *Candidatus Liberibacter psyllaeus* en tomate. (a) Hojas de plantas infectadas muestran nervaduras de color púrpura, (b) clorosis intervenal, (c) epinastia, (d) planta severamente afectada con distorsión foliar, y (e) planta con distorsión foliar, abscisión de flores y crecimiento apical clorótico.



**Figura II.2** Ubicación geográfica de sitios de muestreo en el estado de Puebla, durante el ciclo de cultivo primavera-verano de 2011.

### 2.2.2 Amplificación por PCR

Las muestras fueron analizadas por PCR usando los iniciadores; CLi.po, 5'-TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT-3' y O12c, 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3', que amplifica un fragmento de 1,070 pb de la región del gen 16S rRNA de *Ca. L. psyllauros* (Jagoueix *et al.*, 1996; Secor *et al.*, 2009), y Lp Frag 4-(1611F), 5'-

GGTTGATGGGGTCATTTGAG-3' y Lp Frag 4-(480R), 5'-CACGGTACTGGTTCACTATCGGTC-3', para amplificar un fragmento de 918 pb de la región 16S-ISR-23S rADN (Hansen *et al.*, 2008). La amplificación se realizó en un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo 2 µl 10x PCR buffer, 1.2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/l), 0.4 µl de dNTPs (10 mmol/l), 0.5 µl de cada iniciador (10 µM) y 0.2 µl de Taq polimerasa (5U/µl). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador automático (Perkin-Elmer Cetus<sup>®</sup>, Norwalk, CT, 2400) con las siguientes condiciones: 94°C por cinco min, 40 ciclos de amplificación a 94°C por 30 s, 48°C por 30 s y 72°C por 1 min, seguido por un paso de elongación final a 72°C por 10 min (Liefiting *et al.*, 2009). El ADN amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y purificado mediante el kit comercial Wizard PCR Preps<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI). Estos fragmentos fueron posteriormente secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 2.2.3 Análisis de secuencias

La búsqueda en la base de datos del GenBank para secuencias homólogas fue realizada utilizando el servicio de red BLASTn, disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD, USA). Múltiples secuencias de nucleótidos representativas de *Ca. Liberibacter* spp. y *Rhizobium leguminosarum* (usada como el fuera de grupo) fueron alineadas con el módulo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del software Mega versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Se construyeron árboles filogenéticos mediante el algoritmo Neighbour-joining, utilizando como método de distancia el modelo de Kimura 2- parámetros, en el programa MEGA ver. 4 (Tamura *et al.*, 2007). Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis de re-muestreo con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985).

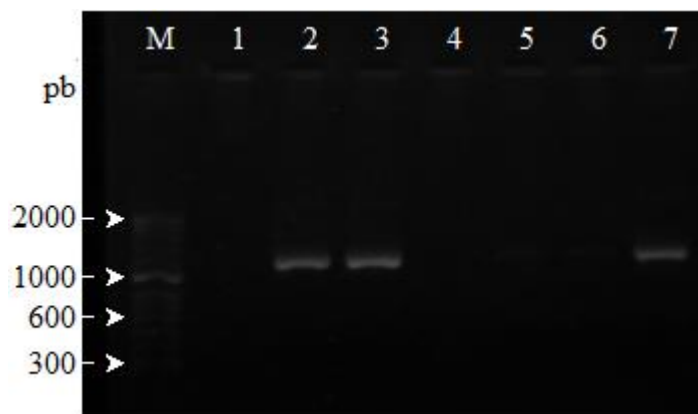
## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Sintomatología

Los síntomas que se encontraron asociados en plantas de tomate infectadas con *Ca. L. psyllaureus* fueron detención del crecimiento, abscisión de flores, crecimiento apical clorótico, hojas con nervaduras de color púrpura, clorosis intervenal y epinastia (Figura II.1). Estos síntomas observados son similares a lo reportado por otros autores en este mismo cultivo (Liefting *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Amplificación de fragmentos de ADN

De un total de 72 muestras de tejido examinadas por PCR, se obtuvo amplificación en 11 de ellas. Los fragmentos amplificados con el par de iniciadores CLi.po/O12c, fueron de aproximadamente 1,070 pb (Figura II.3) y de aproximadamente 920 pb con el par de iniciadores Lp Frag 4-(1611F)/Lp Frag 4-(480R).



**Figura II.3** Productos de PCR amplificados en gel de agarosa (1.5%) de la región del gen 16S rRNA de *Candidatus Liberibacter* con los iniciadores CLi.po/O12c. Línea M, marcador molecular 100 pb (hyperladder II® Bioline); línea 1, control negativo (planta de tomate sana); línea 2, 3 y 7, muestras infectadas con *Ca. Liberibacter*; línea 4, 5 y 6, muestras libres de *Ca. Liberibacter*.

Cinco y dos fragmentos amplificados con el par de iniciadores CLi.po/O12c, y Lp Frag 4-(1611F)/Lp Frag 4-(480R), respectivamente, fueron directamente secuenciados. La frecuencia de amplificación del gen 16S rRNA, y de la región 16S-ISR-23S rADN por sitio de muestreo fue de 28.6% en la localidad de San José la Portilla, Tecamachalco; 16.7% en San Juan Tianguismanalco, Tianguismanalco; 25% en El León, Atlixco; 33.3% en Ixcaquixtla, Ixcaquixtla, 57.1% en Tula, Tepexi de Rodríguez y 16.7% en Guadalupe Victoria, Juan N. Méndez. No hubo amplificación en muestras colectadas en los municipios de Aquixtla, Tetela de Ocampo, Zinacatepec, San Andrés Cholula, Tepanco de López y Tepexco (Cuadro II.1).

**Cuadro II.1** Sitios de muestreo y resultados del análisis de *Candidatus* Liberibacter en plantas de tomate cultivadas en invernadero en el estado de Puebla.

<b>Municipio</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	<b>Muestras positivas/ total de muestras</b>	<b>Fecha de colecta</b>
Aquixtla	19°46'15.02"N y 97°56'05.64"O	0/7	23/10/2010
Aquixtla	19°44'48.63"N y 97°57'33.22"O	0/5	23/10/2010
Atlixco	18°55'56.07"N y 98°27'46.69"O	2/8	09/05/2011
Ixcaquixtla	18°28'16.90"N y 97°51'11.74"O	1/3	11/10/2011
Juan N. Méndez	18°32'26.95"N y 97°50'48.12"O	1/6	11/10/2011
San Andrés Cholula	19°02'16.60"N y 98°15'35.55"O	0/3	09/05/2011
Tecamachalco	18°48'52.21"N y 97°44'56.20"O	2/7	14/04/2011
Tepanco de López	18°33'07.29"N y 97°31'25.60"O	0/6	11/10/2011
Tepexco	18°38'12.32"N y 98°41'18.52"O	0/2	15/10/2011
Tepexi de Rodríguez	18°31'30.86"N y 97°53'12.59"O	4/7	11/10/2011
Tetela de Ocampo	19°48'28.40"N y 97°53'13.19"O	0/8	23/10/2010
Tianguismanalco	18°59'56.81"N y 98°26'14.94"O	1/6	16/04/2011
Zinacatepec	18°20'03.96"N y 97°16'04.22"O	0/4	14/04/2011

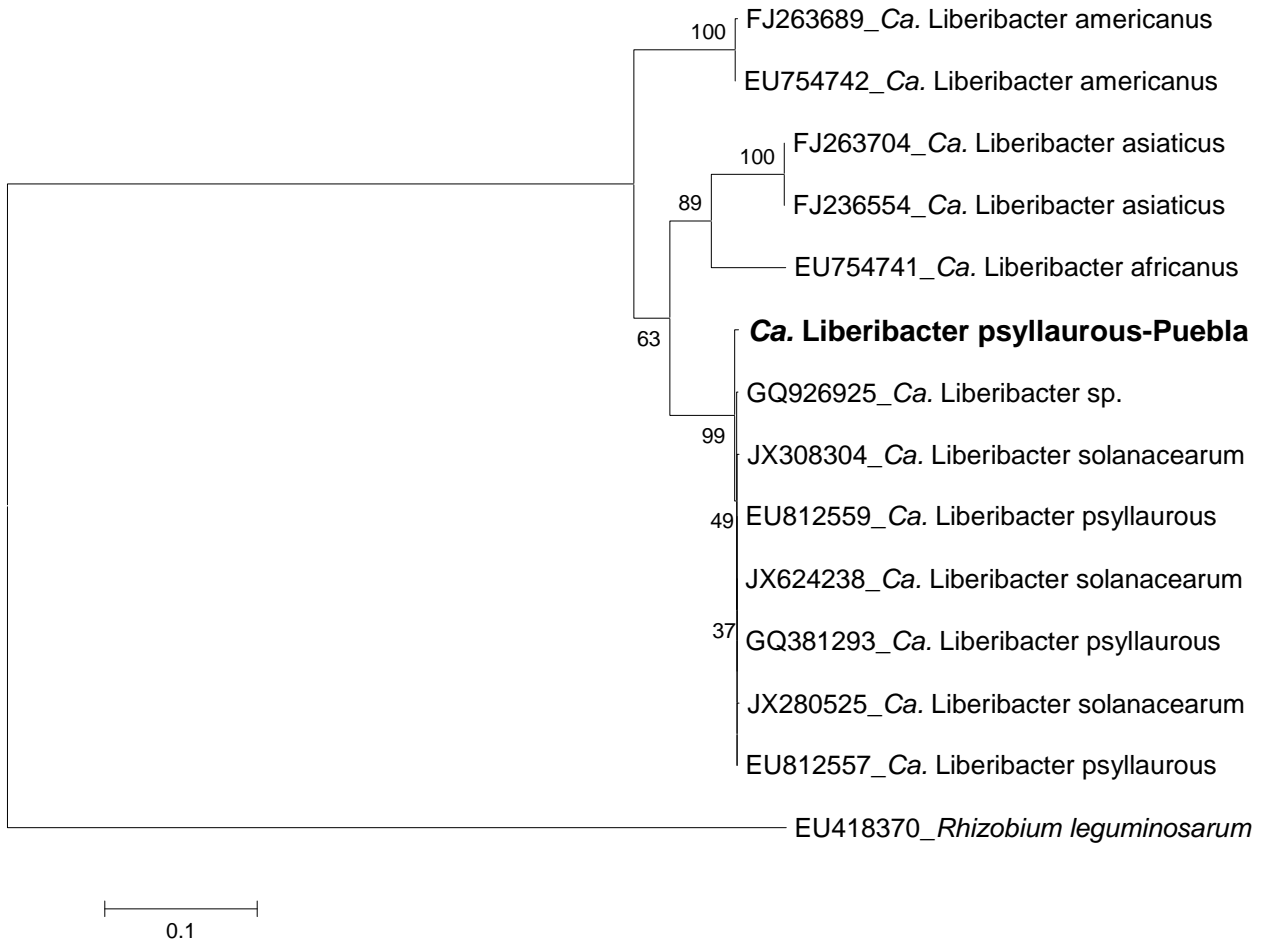
### 2.3.3 Análisis de secuencias

El análisis de la secuencia por BLAST de las muestras que resultaron positivas mostraron una similaridad del 99% con aislamientos de *Candidatus* L. psyllaourous. En comparación con otras secuencias de especies de liberibacter depositadas en el GenBank, las secuencias de *Ca. L. psyllaourous* obtenidas en este estudio mostraron una similaridad del 89% con respecto a *Ca. L. asiaticus* (p.e. FJ236554), del 89% con *Ca. L. africanus* (p.e. EU754741) y del 85% con *Ca. L. americanus* (p.e. FJ263689). El análisis filogenético basado en la secuencia de 803 pb de la región 16S-ISR-23S obtenido en este estudio muestra consistentemente que los aislamientos de liberibacter obtenidos de plantas de tomate en el estado de Puebla pertenecen a la especie putativa *Ca. L. psyllaourous* (Figura II.4).

Se conoce que *Ca. L. psyllaourous* afecta principalmente a cultivos de solanaceas, incluyendo papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicon*), chile (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*), tomatillo (*Physalis* spp.), tamarillo (*Solanum betaceum*), y varias malezas de la familia Solanaceae (Abad *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2010; Crosslin y Munyaneza 2009; Crosslin *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2008a, Liefting *et al.*, 2008b; Liefting *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Munyaneza *et al.*, 2009c, Munyaneza *et al.*, 2009b; Rehman *et al.*, 2010; Secor *et al.*, 2009; Sengoda *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2009). El patógeno es transmitido a especies solanaceas por *B. cockerelli*. El patógeno *Ca. L. psyllaourous* también ha sido detectado en plantas de zanahoria (*Daucus carota*), donde es transmitido a este hospedante por el psílido *Trioza apicalis* (Munyaneza *et al.*, 2010; Munyaneza *et al.*, 2011). Asimismo, ha sido documentado que afecta a apio (*Apium graveolens*) en asociación con *Bactericera trigonica* (EPPO, 2012).

El psílido *B. cockerelli* vector de *Ca. L. psyllaourous* en cultivos solanáceas es una de las plagas de mayor importancia en México (Luna-Cruz *et al.*, 2011). Actualmente se distribuye en todas las áreas de la República Mexicana donde se cultiva papa y tomate (Avilés *et al.*, 2002). La amplia distribución geográfica de *B. cockerelli* y disponibilidad

de hospedantes susceptibles a *Ca. L. psyllauros*, puede favorecer una rápida dispersión y establecimiento de *Ca. L. psyllauros* en el país.



**Figura II.4** Análisis filogenético de un aislamiento de *Candidatus Liberibacter psyllauros* obtenido en este estudio (en negritas) y otras secuencias de especies de *Ca. Liberibacter* obtenidas del GenBank, basado en una secuencia de 803 pb de la región 16-ISR-23S rRNA amplificada usando los iniciadores LpFrag4-1161F/480R. Como especie externa (outgroup) se utilizó la secuencia de *Rhizobium leguminosarum*. El árbol filogenético fue elaborado con el algoritmo Neighbour-joining, al cual se le aplicó un bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores bootstrap se indican al inicio de cada nodo.

*Ca. L. psyllaorous* constituye una serie amenaza para la producción de tomate y otras especies solanáceas en México. Las detecciones recientes de *Ca. L. psyllaorous* afectando a cultivos de papa, tomate y chile en varios estados de la república (Camacho *et al.*, 2011; DGSV-CNRF, 2011; Ling *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2009c; Munyaneza *et al.*, 2009b; Rubio-Covarrubias *et al.*, 2011), y su detección en el presente estudio en el cultivo de tomate en el estado de Puebla, crea la necesidad de desarrollar estrategias de manejo para reducir el impacto de este patógeno emergente. Por lo tanto, la ampliación del conocimiento sobre la biología y epidemiología del agente causal de la enfermedad y su insecto vector es esencial.

## 2.4 Conclusión

En este estudio se identificó a *Candidatus Liberibacter psyllaorous* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivadas en invernadero en los municipios de Atlixco, Ixcaquixtla, Juan N. Méndez, Tecamachalco, Tepexi de Rodríguez y Tianguismanalco, Puebla. Los síntomas en plantas infectadas por liberibacter fueron detención del crecimiento, abscisión de flores, crecimiento apical clorótico, hojas con nervaduras de color púrpura, clorosis intervenal y epinastia.

## 2.5 Literatura citada

- Abad JA, Bandla M, French-Monar RD, Liefting LW and Clover GRG. 2009. First report of the detection of "*Candidatus Liberibacter*" species in Zebra Chip disease infected potato plants in the United States. *Plant Disease* 93:108.
- Avilés GMC, Garzón T, Marín TA y Caro MPH. 2002. El psílido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc): biología, ecología y su control. Pp:21-35. *In*: Memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* (Sulc): Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Fundación Produce Sinaloa-Comité Estatal de Sanidad Vegetal Sinaloa. Culiacán, México.
- Bove JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.



- Brown JK, Rehman M, Rogan D, Martin RR and Idris AM. 2010. The First report of “*Candidatus Liberibacter psyllaourus*” (synonym “*Ca. L. solanacearum*”) associated with tomato vein-greening and tomato psyllid yellows diseases in commercial greenhouses in Arizona. *Plant Disease* 94:376.
- Camacho-Tapia M, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Hernández-Deheza MG, Carrillo-Salazar JA, Revollar-Alviter A and Ochoa-Martínez DJ. 2011. Aetiology of Chili pepper variegation from yurécuaro, México. *Journal of Plant Pathology* 93:331-335.
- Camerota C, Raddadi N, Pizzinat A, Gonella E, Crotti E, Tedeschi R, Mozes-Daube N, Ember I, Acs Z, Kolber M, Zchori-Fein E, Daffonchio D and Alma A. 2012. Incidence of ‘*Candidatus Liberibacter europaeus*’ and phytoplasmas in *Cacopsylla* species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants. *Phytoparasitica* 40:213-221.
- Crosslin JM and Bester G. 2009. First report of *Candidatus Liberibacter psyllaourus* in zebra chip symptomatic potatoes from California. *Plant Disease* 93:551.
- Crosslin JM, Munyaneza JE, Brown JK and Liefing LW. 2010. Potato zebra chip disease: a phytopathological tale. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2010-0317-01-RV.
- DGSV-CNRF. 2011. *Candidatus Liberibacter solanacearum* Liefing *et al.*, 2009. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. (DGSV-CNRF) Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. México, D.F. 10 pp.
- EPPO. 2012. First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ on carrots and celery in Spain, in association with *Bactericera trigonica*. *EPPO Reporting Service – Pests and Diseases* 6:4-5.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Garzón-Tiznado JA. 1984. Enfermedad del “permanente” del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Guanajuato. *In: Resúmenes del XI Congreso*

- Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. México. 138p.
- Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R and Paine TD. 2008. A new Huanglongbing species, "*Candidatus Liberibacter psyllaurosus*," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology* 74:5862-5865.
- Holguín-Peña RJ, Vázquez-Juárez RC and Martínez-Soriano JP. 2007. First Report of a 16Srl-B Group Phytoplasma Associated with a Yellowing-Type Disease Affecting Tomato Plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease* 91:328.
- Jagoueix S, Bové JM and Garnier M. 1996. PCR detection of the two '*Candidatus Liberobacter* species' associated with greening disease of citrus. *Molecular Cellular Probes* 10:43-50.
- Liefting LW, Perez-Egusquiza ZC, Clover GRG and Anderson JAD. 2008a. A New '*Candidatus Liberibacter*' Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92:1474.
- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS and Clover GRG. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93:208-214.
- Liefting LW, Ward LI, Shiller JB and Clover GRG. 2008b. A New '*Candidatus Liberibacter*' Species in *Solanum betaceum* (Tamarillo) and *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) in New Zealand. *Plant Disease* 92:1588.
- Lin H, Doddapaneni H, Munyaneza JE, Civerolo EL, Sengoda VG, Buchman JL and Stenger DC. 2009. Molecular characterization and phylogenetic analysis of 16S rRNA from a new "*Candidatus Liberibacter*" strain associated with zebra chip disease of potato (*Solanum tuberosum* L.) and the potato psyllid (*Bactericera cockerelli* Sulc). *Journal of Plant Pathology* 9:215-219.
- Lin H, Lou B, Glynn JM, Doddapaneni H, Civerolo EL, Chen C, Duan Y, Zhou L and Vahling CM. 2011. The Complete Genome Sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the Bacterium Associated with Potato Zebra Chip Disease. *PLoS ONE* 6:1-13.

- Ling K-S, Lin H, Lewis IML, Zhang W and Miller SA. 2011. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Naturally Infecting Tomatoes in the State of Mexico, Mexico. *Plant Disease* 95:1026.
- Luna-Cruz A, Lomeli-Flores JR, Rodríguez-Leyva E, Ortega-Arenas LD and Huerta-de la Peña A. 2011. Toxicity of four insecticides on *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae) and its host *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Acta Zoológica Mexicana* 27:509-526.
- McKenzie CL and Shatters RG. 2009. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" associated with psyllid yellows of tomato in Colorado. *Plant Disease* 93:1074.
- Munyanza JE. 2010. Psyllids as vectors of emerging bacterial diseases of annual crops. *Southwestern Entomologist* 35:471-477.
- Munyanza JE, Crosslin JM and Upton JEJE. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "Zebra Chip," a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100:656-663.
- Munyanza JE, Fisher TW, Sengoda VG, Garczynski SF, Nissinen A and Lemmetty A. 2010. Association of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" with the psyllid *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entomology* 103:1060–1070.
- Munyanza JE, Lemmetty A, Nissinen AI, Sengoda VG and Fisher TW. 2011. Molecular detection of aster yellows phytoplasma and "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in carrots affected by the psyllid *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Finland. *Journal of Plant Pathology* 93:697-700.
- Munyanza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, De la Rosa-Lozano G and Sánchez A. 2009c. First report of '*Candidatus Liberibacter psyllauros*' in potato tubers with Zebra Chip disease in Mexico. *Plant Disease* 93:552.
- Munyanza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, Garzón-Tiznado JA and Cardenas-Valenzuela OG. 2009b. First Report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in Pepper Plants in Mexico. *Plant Disease* 93:1076.

- Munyanzeza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, Garzón-Tiznado JA and Cardenas-Valenzuela OG. 2009a. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in México. *Plant Disease* 93:10.
- Rehman M, Melgar J, Rivera C, Urbina N, Idris AM and Brown JK. 2010. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllaourous*" or "*Ca. Liberibacter solanacearum*" associated with severe foliar chlorosis, curling, and necrosis and tuber discoloration of potato plants in Honduras. *Plant Disease* 94:376.
- Rubio-Covarrubias OA, Almeyda-León IH, Cadena-Hinojosa MA y Lobato-Sánchez R. 2011. Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:17-28.
- Secor GA, Rivera VV, Abad JA, Lee I-M and Clover GRG. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93:574-583.
- Sengoda VG, Munyanzeza JE, Crosslin JM, Buchman JL and Pappu HR. 2010. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip diseases of potato. *American Journal of Potato Research* 87:41-49.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Wen A, Mallik I, Alvarado VY, Pasche JS, Wang X, Li W, Levy L, Lin H, Scholthof HB, Mirkov TE, Rush CR and Gudmestad NC. 2009. Detection, distribution, and genetic variability of '*Candidatus Liberibacter*' species associated with zebra complex disease of potato in North America. *Plant Disease* 93:1102-1115.

## CONCLUSIONES GENERALES

En plantaciones comerciales de tomate en los estados de Coahuila, Puebla e Hidalgo, se detectaron a los virus TYLCV, PHYVV, ToGMoV, ToSLCV, ToChLPV y PepGMV. Asimismo, se encontró a *Tidestromia suffruticosa* var. *oblongifolia* y *M. parviflora* como hospedantes de PHYVV, y a PepGMV infectando a *S. pimpinellifolium*. Los síntomas en plantas de tomate infectadas por begomovirus fueron retraso de crecimiento, acortamiento de entrenudos, clorosis, mosaicos, distorsión foliar, caída prematura de flores, reducción de número y tamaño de frutos.

El progreso temporal de la incidencia acumulada de síntomas virales en predios comerciales de tomate evaluados en San Pedro, Coahuila, se ajustó al modelo de Gompertz. El inicio de la manifestación de síntomas virales ocurrió a los 30 días después del trasplante (ddt) alcanzando una incidencia final del 87 a 97% a los 100 ddt, asociada con las poblaciones de mosca blanca.

Asimismo, en este estudio se identificó a *Candidatus Liberibacter psyllaorous* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivadas en invernadero en el estado de Puebla. Los síntomas en plantas infectadas por este patógeno fueron detención del crecimiento, abscisión de flores, crecimiento apical clorótico, hojas con nervaduras de color púrpura, clorosis intervenal y epinastia.