



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**“Caracterización del patosistema fitoplasma-chile
(*Capsicum annuum* L.) en Zacatecas y Aguascalientes,
México”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOSISTEMÁTICA Y MANEJO DE
RECURSOS NATURALES Y AGRÍCOLAS**

PRESENTA:

ERICA GABRIELA HERNÁNDEZ AYALA

ZAPOPAN, JALISCO

ENERO 2018



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**“Caracterización del patosistema fitoplasma-chile
(*Capsicum annuum* L.) en Zacatecas y Aguascalientes,
México”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOSISTEMÁTICA Y MANEJO DE
RECURSOS NATURALES Y AGRÍCOLAS**

PRESENTA:

ERICA GABRIELA HERNÁNDEZ AYALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CARLA V. SÁNCHEZ HERNÁNDEZ
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ROBERTO REVELES TORRES

ZAPOPAN, JALISCO

ENERO 2018



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

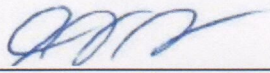
“Caracterización del patosistema fitoplasma-chile (*Capsicum annuum* L.) en
Zacatecas y Aguascalientes, México”

Por

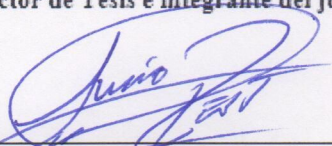
Biol. Erica Gabriela Hernández Ayala

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

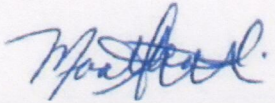
Aprobado por:


Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
Director de Tesis e integrante del jurado

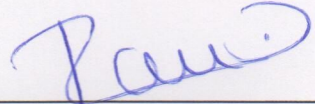
11 Dic / 2017
Fecha


Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Codirector de Tesis e integrante del jurado

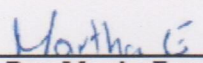
11 Dic / 2017
Fecha


Dra. Martha Isabel Torres Morán
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

01 Dic / 2017
Fecha


PhD Ramón Gutiérrez Luna
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

01 Dic / 2017
Fecha


Dra. Martha Escoto Delgadillo
Integrante del jurado

11 Dic / 2017
Fecha

AGRADECIMIENTOS

Cerrar ciclos siempre es sinónimo de experimentar “sentimientos encontrados”; y en mi caso, esta no es la excepción. Nostalgia, alegría y sobretodo una gran expectativa, son los que me inundan por haber llegado a este momento de mi vida. Al finalizar el desarrollo de una investigación ardua que exige dedicación, paciencia y disponibilidad como es la elaboración de una tesis, es inevitable no sentirme orgullosa de tan increíble hazaña.

Comienzo a recordar todos los esfuerzos y sacrificios que se hacen, pero es hoy cuando rinden fruto todas aquellas noches de desvelo, las “malpasadas”, las intensas horas en los laboratorios, las lágrimas derramadas, el esfuerzo emocional y físico. Sin lugar a dudas: toda una aventura. Pero también es en este momento cuando recuerdo que, alcanzar esta meta no hubiera sido posible sin todas esas personas que estuvieron conmigo a lo largo del viaje; por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresarles mis más sinceros agradecimientos.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar quiero agradecer de manera muy sincera a la Universidad de Guadalajara y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por ser mi casa de estudios durante los últimos 2 años, por brindarme la confianza al abrirme las puertas durante el desarrollo del programa de Maestría y por haber reafirmado los valores morales y profesionales con los que hoy cuento. Por fortalecer mi carácter e inculcarme el amor por la ciencia, gracias.

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría. Sin el apoyo económico brindado por esta institución no hubiera sido posible alcanzar este objetivo. Gracias por la confianza y todo el apoyo brindado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Zacatecas, por haberme permitido desarrollar la presente investigación proporcionándome los medios materiales y brindándome espacio tanto en el Laboratorio de Recursos Genéticos como en el Laboratorio de Entomología.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la persona que me ha hecho quien soy, por forjarme y conducirme en el correcto camino: mi madre Rocío Ayala Contreras. Ma, gracias por todo lo que ha hecho por mí, por luchar incansablemente por mi bienestar y mi felicidad. Gracias por ser fuente de inspiración y alentarme cuando más lo necesité. A usted gracias, por haberme acompañado en esta y todas las etapas de mi vida, por su amor tan sincero y por apoyarme de manera incondicional estando a mi lado bajo cualquier circunstancia.

Asimismo agradezco a mis hermanos Francisco y Daniela, por enseñarme que a pesar de todo siempre estaremos juntos, por su amor, apoyo y comprensión. Hops, gracias por impulsarme, por creer en mí en todo momento y por tus muestras de afecto. Te agradezco porque, a pesar de ser menor que yo, me has enseñado muchas cosas, porque eres para mí un gran ejemplo de madurez.

A dos personas que son una parte importante en mi vida y se convirtieron en una pieza fundamental a lo largo de mis estudios de Maestría, mis primos Ibeth y Sven Roehl; mil gracias por todo el apoyo brindado, por tener siempre una palabra de aliento y por nunca dejar de creer en mí.

Mi más sincero agradecimiento a mi tío: Ing. Ángel López Rodríguez y a su familia por el cariño brindado. A mi tío por representar en mi vida un gran ejemplo a seguir, por demostrarme que todo esfuerzo tiene una recompensa.

Aprovecho este espacio para externar mi agradecimiento a la Doctora Patricia Zarazúa Villaseñor, coordinadora del programa de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas, gracias a ella el proceso de postulación de solicitud de beca se realizó en tiempo y forma y se obtuvo un resultado favorable. También por dirigir de una manera muy eficiente la coordinación del posgrado, por su apoyo en todas las solicitudes realizadas y por su comprensión ante diversas circunstancias.

A la Doctora Carla V. Sánchez Hernández, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis bajo su dirección. Por su apoyo y comprensión; por exigirme siempre más, pues con eso lograba sacar lo mejor de mí. Porque cuando enfrentamos adversidades siempre trató de darme alternativas de solución a los problemas. Doctora, siempre le estaré muy agradecida por todo el conocimiento que compartió conmigo y por su profesionalismo, de esta manera usted contribuyó en mi crecimiento personal y profesional.

Al Doctor Luis R. Reveles Torres, porque a lo largo de estos años me ha brindado algo que considero invaluable: su sincera amistad. Mi admiración para usted, por haber fungido como mi director de tesis en la Licenciatura, y por ahora haber dirigido mi tesis de Maestría. Su apoyo y confianza en mi investigación y su capacidad para guiar mis ideas es algo que jamás terminaré de agradecer. Por brindarme los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Gracias de corazón Doctor.

A la Doctora Isa Torres Morán, por haber aceptado formar parte de mi comité particular y por las importantes aportaciones que hizo a mi tesis. Gracias Dra. por la confianza y amistad que encontré en usted. Porque cuando tuvo la oportunidad y cuando yo más lo necesitaba me regaló una sonrisa y palabras de aliento.

A la Doctora Martha Escoto Delgadillo por haber aceptado formar parte de mi comité sinodal y por haberse tomado el tiempo para revisar la presente tesis. Pero sobre todo por su labor como Docente, por el ejemplo que nos dio en las aulas y su profesionalismo.

De una manera muy especial, quiero agradecer al mejor asesor de tesis, colaborador y amigo que pude encontrar **PhD Ramón Gutiérrez Luna**, por haberme acompañado en esta y muchas otras etapas de mi desarrollo académico. A seis años de conocerlo, me ha demostrado el valor que tiene ser una persona profesional, y se ha convertido en una figura a seguir. Su experiencia y su ímpetu fueron motivo para no permitirme dar por vencida durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias Doctor, porque a su lado aprendí que si me caigo 7 veces, debo levantarme 8 y seguir adelante contra todo. Por creer en mí y generarme confianza, por ayudarme a enfrentar la realidad de la ciencia y por brindarme un apoyo incondicional y desinteresado. Me permito externar que, sin su orientación y el amplio conocimiento compartido, finalizar este trabajo de tesis no hubiera sido posible. Mi admiración y respeto siempre Doctor; por ser y estar: gracias totales.

Al Doctor Rodolfo Velásquez Valle, por su disposición al atender diversas dudas que surgieron a lo largo del desarrollo de la presente tesis, por ser una persona tan profesional y ejemplar. Por confiar en mi investigación y en lo que puedo lograr.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Marcadores Moleculares: Alex, Víctor, Samuel, Memo, “La china”, Julio, Efra y la Dra. Pau, porque de alguna u otra forma estuvieron siempre presentes en el desarrollo de esta tesis. Me permito agradecer especialmente a Víctor Quezada Camargo, por ser tan paciente (a veces) y por compartir su conocimiento conmigo; por todas aquellas horas de intenso trabajo compartidas en el laboratorio, porque juntos superamos muchos obstáculos y por ser un amigo leal, gracias Vic.

Al M en C Julio César Nava de la Riva, por brindarme una amistad leal y sincera, por todo el apoyo que recibí durante el desarrollo de la Maestría, por ser una persona que me ha demostrado que no existen cosas imposibles, y porque con sus consejos he crecido personal y profesionalmente. Gracias amigo, porque sé que siempre podré contar contigo.

Agradezco a una de las personas que nunca dejó de alentarme, que ante la peor situación, tenía siempre una sonrisa para mí. Quien me dio ánimos durante el proceso de mi tesis, gracias a mi apreciable y querida amiga nigga Estrella A. García Araujo.

A los mejores amigos que pude encontrar en la Licenciatura y que estuvieron apoyándome a lo largo de la Maestría: Ale, Beto y Gaby... gracias por todos los momentos compartidos, por soportarme en las “crisis de tesis”. Por ayudarme a disfrutar esta maravillosa carrera de Biología y por todas las aventuras que quedarán grabadas en nuestra memoria.

A mis amigos incondicionales, los que estuvieron en los peores pero también en los mejores momentos de esta etapa: Paul, Samara, Gaby, Gil y Sarahí, por siempre alentarme a seguir adelante, por no dejarme sola nunca, por demostrarme que los sueños se pueden alcanzar. Mil gracias hermanos.

Agradezco a todos mis profesores de la maestría, pues ellos, al ejercer la labor tan noble de la enseñanza, me brindaron todas las herramientas para poder desenvolverme profesionalmente y con su ejemplo, me mostraron la actitud ética y responsable en el desempeño del trabajo.

Infinitamente agradecida...Erica.

DEDICATORIA

Por ser una pieza fundamental en este trayecto, por confiar en mí, por haber estado a mi lado en cada momento e impedir que me rindiera.

Esta tesis está dedicada a una de mis mayores fuentes de inspiración: PhD Ramón Gutiérrez Luna. A usted, que me ha enseñado que no hay meta imposible cuando algo se quiere de verdad.

Con enorme admiración y respeto, Erica.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia del cultivo de <i>Capsicum annuum</i> en México	3
2.2 Fitoplasmas	5
2.2.1 Características generales	5
2.2.2 Clasificación de los fitoplasmas	5
2.2.3 Distribución geográfica de los grupos de fitoplasmas	11
2.2.4 Sintomatología asociada a fitoplasmas	13
2.2.5 Técnicas moleculares para la detección e identificación de fitoplasmas	14
2.3 Transmisión de fitoplasmas	16
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 Localidad	20
5.2 Colecta de hospederas vegetales alternas	21
5.3 Colecta de insectos vectores	21
5.4 Detección e identificación de fitoplasmas	22
5.4.1 Extracción de DNA	22
5.4.2 PCR	22
5.4.3 Clonación	23
5.4.4. Análisis de secuencia	23
5.5 Análisis estadístico	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1 Frecuencia de plantas hospederas alternas y detección de fitoplasmas	25
6.2 Diversidad de cicadélidos y fluctuación poblacional de los géneros portadores de fitoplasmas	31
6.3 Detección de fitoplasmas en el vector <i>C. tenellus</i>	36

6.4 Detección de fitoplasmas en cultivo de chile tipo mirasol	38
6.4 Identificación del grupo taxonómico de los fitoplasmas.	41
6.5 Influencia de las variables agroclimáticas sobre poblaciones de hospederos de fitoplasmas.	43
8. CONCLUSIONES.....	51
9. LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntomas que con frecuencia se asocian a fitoplasmas, dentro de los cuales destacan enanismo generalizado de la planta (A), amarillamiento y enrollamiento de las láminas foliares (B), malformaciones de tipo “escoba de bruja” (C) y malformaciones de tipo “yema grande” (D).....15
- Figura 2.** Frecuencia de plantas hospederas alternas registradas en Zacatecas (A) y Aguascalientes (B). Las especies que están señaladas con un asterisco (*) son especies que en investigaciones previas se han reportado como reservorios de fitoplasmas.....26
- Figura 3.** Síntomas que se presentaron con mayor frecuencia en plantas hospederas alternas; la especie tomada como ejemplo es *Eruca sativa*. Los síntomas fueron: enanismo generalizado y amarillamiento foliar (A), enanismo y ausencia de botones florales (B), malformación del tipo “escoba de bruja” (C) y enrollamiento de láminas foliares (D).....29
- Figura 4.** Especies representativas de los géneros de cicadélidos registrados en Zacatecas y Aguascalientes. Los géneros identificados son *Aceratagallia* (A), *Agallia* (B), *Cuerna* (C), *Empoasca* (D), *Circulifer* (E), *Draeculacephala* (F), *Texananus* (G), *Dalbulus* (H, I), *Graminella* (J), *Macrosteles* (K) y *Hordnia* (L).....32
- Figura 5.** Fluctuación poblacional de los géneros *Circulifer*, *Empoasca*, *Graminella*, *Aceratagallia*, *Dalbulus* y *Agallia* de la familia Cicadellidae registrados en Zacatecas (A) y Aguascalientes (B). Al menos una especie de cada género ha sido reportada como portadora de fitoplasmas.....34
- Figura 6.** Fluctuación poblacional del insecto vector *Circulifer tenellus* en Zacatecas (A) y Aguascalientes (B); el número de individuos registrado está representado con la gráfica de barras. La detección de fitoplasmas se realizó por PCR anidada y se calculó el porcentaje de incidencia del patógeno representada en línea continua.....37
- Figura 7.** Detección de fitoplasmas en plantas de chile (*C. annuum*) tipo mirasol en Zacatecas y Aguascalientes en plantas con síntomas asociados a este patógeno (1). Los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia fueron: amarillamiento foliar (2A), protuberancias en las láminas foliares (2B), clorosis (2C) y enrollamiento de láminas foliares (2D).....39

Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de DNA. Se alinearon las secuencias de *C. tenellus*, *Capsicum annuum*, *Chenopodium album* y *Eruca sativa* con la secuencia de referencia de *Ca. Phytoplasma trifolii* (AY390261).....42

Figura 9. Análisis Clúster de las variables insectos-clima (A) y plantas-clima (B) registradas en Zacatecas durante el periodo diciembre del 2015 a noviembre del 2016.....48

Figura 10. Análisis Clúster de las variables insectos-clima (A) y plantas-clima (B) registradas en Aguascalientes durante el periodo diciembre del 2015 a noviembre del 2016.....50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales estados productores de chile en México, hectáreas sembradas y producción obtenida en el año 2016.....	4
Cuadro 2. Grupos taxonómicos de fitoplasmas.....	7
Cuadro 3. Detección de fitoplasmas en plantas hospederas alternas con síntomas asociados al patógeno.....	30
Cuadro 4. Peso de componentes de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Zacatecas.....	44
Cuadro 5. Valores y vectores propios de la matriz de correlación de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Zacatecas.....	45
Cuadro 6. Peso de componentes de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Aguascalientes.....	46
Cuadro 7. Valores y vectores propios de la matriz de correlación de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Aguascalientes.....	46

RESUMEN

El cultivo de chile para secado (*Capsicum annuum* L.) en el Norte Centro de México es susceptible a enfermedades ocasionadas por fitoplasmas, las cuales al presentarse generan pérdidas entre el 10 y 20% de la producción. En el presente trabajo se determinó la densidad poblacional de cicadélidos y de plantas hospederas alternas que influyen sobre la incidencia de fitoplasmas en el cultivo. Mediante la técnica de línea de Canfield modificada (punto de pie), se determinó la frecuencia de especies vegetales y presencia de síntomas asociados a este patógeno. La captura de vectores fue mediante la técnica de golpe de red. Se extrajo DNA de 236 individuos de *Circulifer tenellus*, 144 plantas de chile y 347 plantas arvenses; todas plantas sintomáticas. Posteriormente se analizaron mediante PCR anidada de la región 16S rRNA. Las especies vegetales que se presentaron con mayor frecuencia fueron *Eruca sativa* (35%), *Reseda luteola* (20%) y *Sisymbrium irio* (18%) en Zacatecas, y *Chenopodium album* (30%), *Capsella bursa-pastoris* (23%) y *R. luteola* (23%) en Aguascalientes, siendo *E. sativa* y *Ch. album* las de mayor prevalencia del patógeno, con un rango de 51 a 131 muestras positivas en dichas especies. Fueron identificados 11 géneros de cicadélidos presentes en los sitios de estudio, entre los que destacan *Aceratagallia*, *Agallia*, *Circulifer*, *Dalbulus*, *Empoasca* y *Graminella*. Tanto en el cultivo, como en el insecto vector *C. tenellus* y plantas hospederas alternas fue identificado el fitoplasma *Candidatus Phytoplasma Trifolii* (16 SrVI).

Palabras clave: Fitoplasmas, PCR, *Capsicum annuum*, hospederas alternas, cicadélidos, *Circulifer tenellus*.

ABSTRACT

The cultivar of chili for drying (*Capsicum annuum* L.) in North Central Mexico is susceptible to diseases caused by phytoplasma, which when presented generate losses between 10 and 20% of production. In the present research, the population density of leafhoppers and alternate host plants that could influence the incidence of phytoplasmas in the crop was determined. Using the modified Canfield line-intercept technique (standing point), the frequency of plant species and the presence of symptoms associated with this pathogen were determined. The capture of vectors was done through the sweep netting technique. DNA were extracted from 236 samples of *Circulifer tenellus*, 144 chili pepper plants and 347 weed plants; all symptomatic plants. Subsequently they were analyzed by nested PCR of the 16S rRNA region. The plant species that occurred most frequently were *Eruca sativa* (35%), *Reseda luteola* (20%) and *Sisymbrium irio* (18%) in Zacatecas, and *Chenopodium album* (30%), *Capsella bursa-pastoris* (23%) and *R. luteola* (23%) in Aguascalientes, with *E. sativa* and *Ch. album* being the most prevalent pathogen, with a range of 51 to 131 positive samples. There were identified 11 genera of leafhoppers present in the localities under study, including *Aceratagallia*, *Agallia*, *Circulifer*, *Dalbulus*, *Empoasca* and *Graminella*. The phytoplasma *Candidatus* Phytoplasma Trifolii (16 SrVI) was identified in the cultivar, as well as in the insect vector *C. tenellus* and alternating host plants.

Keywords: Phytoplasma, PCR, *Capsicum annuum*, alternate hosts, leafhoppers, *Circulifer tenellus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son organismos procarióticos de la clase Mollicute que habitan en los tubos cribosos del floema de las plantas y en el tracto digestivo, hemocele y glándulas salivales de los insectos que fungen como vectores (Bai *et al.* 2006). Estos fitopatógenos son transmitidos a los cultivos por insectos pertenecientes a la familia Cicadellidae (Munyanza *et al.*, 2006; Munyanza *et al.*, 2010 y Sertkaya *et al.*, 2007).

Los síntomas que con frecuencia se asocian a fitoplasmas están relacionados con perturbaciones morfológicas y funcionales tanto en la parte vegetativa como reproductiva de las plantas (Perilla, 2013) ocasionando alteraciones como amarillamiento precoz del follaje, enanismo generalizado, malformaciones de tipo “escoba de bruja”, malformaciones de tipo “yema grande” y enrollamiento foliar.

El estudio de los fitoplasmas es imprescindible debido al daño que provocan en la producción de diversos cultivos, tal es el caso del cultivo de manzana en el continente europeo, donde se registró que las pérdidas ocasionadas por la presencia de estos fitopatógenos ascendieron a 125 millones de euros durante el 2001 (Strauss, 2009). Otro caso importante de mencionar es el de la malformación del tipo “escoba de bruja” de la lima, asociada con la presencia de *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*, agente responsable de bajas considerables en la producción de cultivos de lima mexicana, con pérdidas que oscilan entre el 10 y el 100%. La enfermedad se observó por primera vez hace más de 30 años en Omán, donde se produjo la pérdida del 98% del cultivo y desde entonces se ha extendido a los Emiratos Árabes Unidos, Irán y la India (Salehi *et al.*, 2007).

Las investigaciones realizadas en los últimos 20 años muestran que el número de hospederos vegetales de dichos organismos aumenta de manera paulatina, lo cual se ha convertido en una situación alarmante debido a que actualmente no existen estrategias que resulten efectivas para el manejo de fitoplasmas (Harrison *et al.*, 1999; Strauss, 2009; Weintraub y Jones, 2010).

En México, se ha registrado la presencia de fitoplasmas en diversos cultivos de importancia económica como son el cultivo de *Carica papaya*, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*, *Zea mays* y *Capsicum annuum* (Cervantes *et al.*, 2008; Lebsky *et al.*, 2007; Poghosyan *et al.*, 2004).

Una de las regiones donde se ha intensificado el estudio de fitoplasmas es el Norte Centro de México, principal región del país dedicada a la producción de chile para secado; el cultivo de *C. annuum* en el Altiplano Mexicano, al igual que en diversas partes del mundo, se encuentra expuesto a diversos fitopatógenos que disminuyen los índices de producción; dentro de los patógenos que ocasionan cuantiosas pérdidas en este cultivo se encuentran los fitoplasmas (Lee *et al.*, 1998; Marzachí *et al.*, 2004 y Velásquez *et al.*, 2008).

A través de investigaciones enfocadas en la detección e identificación de fitoplasmas, se han logrado resultados importantes que han permitido tener un panorama más amplio sobre los géneros de insectos y especies de plantas que pueden estar favoreciendo la diseminación de este patógeno. Ha sido precisamente en el Norte Centro del país donde se ha reportado a *Circulifer tenellus* como potencial vector de fitoplasmas asociados al cultivo de chile, de manera particular en Zacatecas y Aguascalientes (Abraján *et al.*, 2014; Dávila *et al.*, 2014; López *et al.*, 2014 y Velásquez *et al.*, 2013). La importancia del estudio de los insectos vectores radica en la capacidad que tienen para adquirir y transmitir el patógeno, esto se debe al aparato bucal con el que cuentan sobre todo los integrantes de la familia Cicadellidae; el fitoplasma se reproduce dentro del cuerpo del insecto, se almacena en sus glándulas salivales y posteriormente, es inoculado por éste dentro del floema de la nueva planta hospedera (Fletcher *et al.*, 1998).

Es aquí donde se destaca la importancia de la interacción que hay entre el patógeno, el vector y las plantas hospederas, debido a que especies de hospederas alternas que son hospederas tanto del insecto vector como de los patógenos al estar presentes durante la ausencia de cultivos no interrumpe el ciclo, por lo cual es complicado abatir las poblaciones de insectos y patógenos. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue caracterizar el patosistema fitoplasma-chile tipo Mirasol en Zacatecas y Aguascalientes durante el período diciembre del 2015 a noviembre del 2016.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del cultivo de *Capsicum annuum* en México

La familia Solanaceae es considerada el tercer taxa botánico más importante a nivel agronómico; con cerca de 90 géneros y más de 2600 especies, la familia Solanaceae es reconocida mundialmente por su importancia en términos de especies cultivables, es por ello que se invierte un gran esfuerzo en estudiar la biología, ecología y diversidad de hábitats de muchas de sus especies (Carreño *et al.*, 2007). Las especies cultivables se pueden agrupar en cultivos industriales, medicinales, ornamentales y especialmente, en cultivos hortícolas entre los que destacan el jitomate, cebolla, ajo, coliflor, lechuga y chile.

La producción de chile seco en 2007, a escala mundial, se concentró en China (250,000 t), Perú (165,000 t) y México (60,000 t), países que contribuyeron con 82.59% de la producción mundial (FAOSTAT, 2008). El chile es el octavo cultivo con mayor valor generado en la agricultura mexicana, alcanzando alrededor de 13 mil mdp anualmente, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas. El estado de Chihuahua es el principal productor de este fruto; le siguen los estados de Sinaloa y Zacatecas (SAGARPA, 2015). La estadística de producción para el año 2016 indica que en la república mexicana se cultivaron 171, 791 ha con algún tipo de chile, de las cuales en la región Norte Centro se establecieron aproximadamente 120,000 ha que significaron alrededor del 70% de la superficie nacional dedicada a este cultivo (Cuadro 1). En México, la región Norte Centro que comprende los estados de Chihuahua, San Luis Potosí, Sinaloa, Zacatecas y Aguascalientes, se caracteriza por ser una región productora de chile; los principales tipos de chile para secado cultivados en esta región son los conocidos como ancho, mirasol y pasilla.

El manejo del cultivo de chile se extiende prácticamente a lo largo del año; el establecimiento de almácigos tradicionales se lleva a cabo de enero a febrero, el trasplante en el terreno se realiza a mediados de abril (cuando el riesgo por bajas temperaturas es mínimo) y por último, la cosecha se puede realizar en dos fechas, en junio cuando es producción de chile fresco o de septiembre a noviembre si se quiere para producción en seco. La selección y empaque de chile frecuentemente se prolonga hasta principio del año siguiente (Velasquez *et al.*, 2002; Arismendi *et al.*, 2010). Por la superficie cultivada, la mano de obra utilizada, el valor de la

producción y las exportaciones reportadas, el cultivo de chile tiene un impacto importante en la economía de nuestro país.

Cuadro 1. Principales estados productores de chile en México, hectáreas sembradas y producción obtenida en el año 2016 (SIAP, 2016).

Estado	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)
Chihuahua	41,143	943,545
Sinaloa	14,114	512,168
Zacatecas	40,866	395,223
San Luis Potosí	23,058	286,597
Aguascalientes	1,132	16,060

Al igual que diversas especies de plantas que son de interés económico, el cultivo de chile ha presentado susceptibilidad a enfermedades provocadas por hongos, bacterias, nemátodos y virus (Velásquez *et al.*, 2013) las cuales al generarse afectan la calidad y el rendimiento del cultivo, causando siniestros parciales o totales (Avelar, 1989; Guigón y González, 2001; Ruiz, 1994).

En el Altiplano Mexicano, las enfermedades de mayor importancia que afectan el cultivo de chile son: la marchitez (*Phytophthora capsici* L.), la cenicilla (*Erysiphe* spp.), el ahogamiento (*Phythium* spp.), el tizón (*Alternaria solani*) y los amarillamientos (*Ca. Phytoplasma*). Las investigaciones de enfermedades asociadas a fitoplasmas se han intensificado durante la última década; a pesar de que la información sobre la magnitud de estas enfermedades así como las bajas en el rendimiento del cultivo es escasa, existen reportes en donde la incidencia de síntomas asociados a éste patógeno oscilan entre 5.7 y 90% (Arredondo *et al.*, 2013; Lebsky *et al.*, 2011; Velásquez *et al.*, 2014).

Actualmente no existe un agroquímico que controle la presencia de fitoplasmas, por lo tanto el manejo del cultivo y de los vectores es imprescindible para evitar pérdidas significativas. Debido a ello, diversas instituciones han publicado y difundido guías de manejo fitosanitario, en las que las medidas más recomendadas son: reducción de inóculo primario, empleo de semilla sana, eliminación de hospederas vegetales invernales, monitoreo de vectores y aplicación de insecticidas, entre otras (Chew *et al.*, 2015; Velásquez *et al.*, 2014).

2.2 Fitoplasmas

2.2.1 Características generales

Los fitoplasmas son parásitos estrictos del floema de las plantas. En 1967 se realizaron las primeras determinaciones de la presencia de estos patógenos, y fueron nombrados MLO's (de sus siglas en inglés, *mycoplasma-like organisms*), esto debido a que presentaban características morfológicas similares a las de los micoplasmas, que son mollicutes patógenos de animales. Estas determinaciones pudieron efectuarse gracias al desarrollo de técnicas microscópicas que permitieron observar cortes ultrafinos del floema de plantas que presentaban síntomas asociados a “*amarillamientos*” que hasta entonces eran enfermedades adjudicadas a virus (Doi *et al.*, 1967; Lee *et al.*, 2000; Dickinson y Hodgetts, 2012).

Posterior a esto, diversas plantas con anormalidades fenotípicas fueron reportadas con presencia de MLO's. Con el desarrollo de técnicas de microscopía electrónica, los fitoplasmas han podido observarse, y han sido descritos como una ultraestructura en forma redondeada o alargada, rodeada por una membrana celular y colonizando exclusivamente los tubos cribosos del floema (Musetti y Favali, 2004). Los fitoplasmas son organismos similares a bacterias, pero a diferencia de ellas carecen de pared celular, lo cual les confiere pleomorfismo y resistencia natural a antibióticos.

La célula de los fitoplasmas está rodeada por una membrana plasmática trilaminar de aproximadamente 10 nm de grosor, compuesta por 2/3 de proteínas y 1/3 de lípidos, al igual que el resto de las procariotas; su citoplasma contiene ribosomas y una molécula circular de DNA bicatenario (Bertaccini, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2000; McCoy *et al.*, 1989; Nishigawa *et al.*, 2001). De todas las bacterias fitopatógenas que han sido descritas, los fitoplasmas se caracterizan por tener los genomas más pequeños con aproximadamente 600–900 kb y un bajo contenido de G+C (Kube *et al.*, 2012).

2.2.2 Clasificación de los fitoplasmas

Los fitoplasmas se encuentran dentro de la familia Acholeplasmataceae, de la clase Mollicutes. Los organismos de esta clase se relacionan filogenéticamente con las bacterias

gram positivas, específicamente con aquellas que tienen bajo contenido de guanina-citosina (G+C) (Brown y Bradbury, 2008). Se sugiere que estos organismos, a través de la evolución degenerativa, perdieron los genes necesarios para la síntesis de su pared celular (Bertaccini, 2007). Actualmente, la clase Mollicutes incluye bacterias sin pared celular como los micoplasmas, espiroplasmas, acholeplasmas y fitoplasmas (Wei *et al.*, 2007).

A principio de los 90's, fue posible evidenciar que los fitoplasmas conformaban un grupo monofilético amplio y muy diverso dentro de la clase Mollicutes, gracias a la aplicación de técnicas moleculares que permitieron realizar análisis comparativos de secuencias del gen ribosomal 16S rRNA de los aislados de fitoplasmas (que hasta entonces habían sido reportados como MLO's) (Gundersen *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1994; Razin *et al.*, 1998).

La clasificación taxonómica de los fitoplasmas se ha visto limitada debido a la dificultad del establecimiento de cultivos axénicos. El Subcomité de Taxonomía de Mollicutes y el Programa Internacional de Investigación de Micoplasmología Comparada del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, con base en el convenio taxonómico establecido para los microorganismos no cultivables (Murray & Stackebrandt, 1995) propuso un género provisional para clasificar a los fitoplasmas denominado '*Candidatus Phytoplasma*'; 37 especies candidatas han sido descritas formalmente y más de 10 nuevas especies han sido propuestas con base en secuencias del gen 16S rRNA (Duduk y Bertaccini, 2011; Davis *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2014; IRPCM, 2004; Nejat *et al.*, 2013). Las especies candidatas de fitoplasmas se clasifican en grupos con base en análisis de RFLPs. El fragmento F2nR2 del gen 16S rRNA (amplificado por PCR) se analiza mediante RFLP con un conjunto de 17 enzimas de restricción (Lee *et al.*, 2000).

En el Cuadro 2 se muestran los grupos y subgrupos de fitoplasmas, así como las especies candidatas, el tipo de cepa al que están asociados y la distribución geográfica del grupo. Se han detectado y caracterizado fitoplasmas de aproximadamente 33 grupos 16Sr y más de 100 subgrupos. Se considera una nueva especie de fitoplasma, cuando la secuencia del gen 16S rRNA presenta un porcentaje de similitud inferior a 97.5% comparado con las especies candidatas descritas (Firrao *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2000). Además de las diferencias en la similitud genética, los fitoplasmas deben presentar diferencias ecológicas.

Cuadro 2. Grupos taxonómicos de fitoplasmas (Bertaccini *et al.* 2014).

Subgrupo 16Sr	Cepa* ' <i>Candidatus</i> sp.'	Número de Acceso en Genbank
16SrI: Aster yellows (América, Europa, Asia, África)		
I-A	Aster yellows witches' broom (AYWB)	NC_007716
I-A	Tomato big bud (BB)	L33760
I-B	Onion yellows mild strain (OY-M)	NC_005303
I-B	Aster yellows (MAY) ' <i>Ca. P. asteris</i> '	M30790
I-C	Clover phyllody (CPh)	AF222065
I-D	Paulownia witches' broom (PaWB)	AY265206
I-E	Blueberry stunt (BBS3)	AY265213
I-F	Aster yellows apricot-Spain (A-AY)	AY265211
I-I	Strawberry witches' broom (STRAWB1)	U96614
I-K	Strawberry witches' broom (STRAWB2)	U96616
I-L	Aster yellows (AV2192)	AY180957
I-M	Aster yellows (AVUT)	AY265209
I-N	Aster yellows (IoWB)	AY265205
I-O	Soybean purple stem (SPS)	AF268405
I-P	Aster yellows from <i>Populus</i> (PopAY)	AF503568
I-Q	Cherry little leaf (ChLL)	AY034089
I-R	Strawberry phylloid fruit (StrawbPhF)	AY102275
I-S	Mexican potato purple top phytoplasma (COAH10)	FJ914654
I-U	Mexican potato purple top phytoplasma (JAL6)	FJ914650
I-V	Mexican potato purple top phytoplasma (SON18)	FJ914642
I-W	Peach rosette-like disease (PRU0382)	HQ450211
I-Y	"Brote grande" of tomato ' <i>Ca. P. lycopersici</i> '	EF199549
16SrII: Peanut witches' broom (América, África, Europa, Asia, Australia)		
II-A	Peanut witches' broom (PnWB)	L33765
II-B	Lime witches' broom (WBDL) ' <i>Ca. P. aurantifolia</i> '	U15442
II-C	Faba bean phyllody (FBP)	X83432
II-D	Papaya mosaic (PpM) ' <i>Ca. P. australasia</i> '	Y10096
II-E	Pichris echioides phyllody (PEY)	Y16393
II-F	Cotton phyllody (CoP)	EF186827
16SrIII: X-disease (América, Europa, Asia)		
III-A	Peach X-disease (PX11CT1) ' <i>Ca. P. pruni</i> '	JQ044392/JQ044393
III-B	Clover yellow edge (CYE)	AF173558
III-C	Pecan bunch (PB)	GU004371 GU004372
III-D	Goldenrod yellows (GR1)	

III-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228
III-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724
III-G	Walnut witches' broom (WWB)	AF190226/AF190227
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223
III-I	Virginia grapevine yellows (VGYIII)	AF060875
III-J	Chayote witches' broom (ChWBIII)	AF147706
III-K	Strawberry leafy fruit (SLF)	AF274876
III-L	Cassava frog skin disease (CFSD)	EU346761
III-M	Potato purple top (MT117)	FJ226074
III-N	Potato purple top (AKpot6)	GU004365
III-P	Dandelion virescence (DanV)	AF370119/AF370120
III-Q	Black raspberry witches' broom (BRWB7)	AF302841
III-T	Sweet and sour cherry (ChD)	FJ231728
III-U	Cirsium white leaf (CWL)	AF373105/AF373106
III-V	Passion fruit phytoplasma (PassWB-Br4)	GU292082
16SrIV: Coconut lethal yellows (América, África)		
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307
IV-B	Yucatan coconut lethal decline (LDY)	U18753
IV-C	Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	X80117
16SrV: Elm yellows (Europa, América, Asia, África)		
V-A	Elm yellows (EY) ' <i>Ca. P. ulmi</i> '	AY197655
V-B	Jujube witches' broom (JWB-G1) ' <i>Ca. P. ziziphi</i> '	AB052876
V-C	"Flavescence dorée" (FD-C)	X76560
V-D	"Flavescence dorée" (FD-D)	AJ548787
V-E	Rubus stunt (RuS) ' <i>Ca. P. rubi</i> '	AY197648
V-F	Balanite witches' broom (BltWB) ' <i>Ca. P. balanitae</i> '	AB689678
16SrVI: Clover proliferation (Europa, América, Asia)		
VI-A	Clover proliferation (CP) ' <i>Ca. P. trifolii</i> '	AY390261
VI-B	Strawberry multiplier disease (MC)	AF190224
VI-C	Illinois elm yellows (EY-IL1)	AF409069/AF409070
VI-D	Periwinkle little leaf (PLL-Bd)	AF228053
VI-E	<i>Centarurea solstitialis</i> virescence (CSVI)	AY270156
VI-F	Catharanthus phyllody phytoplasma (CPS)	EF186819
VI-H	Portulaca little leaf phytoplasma (PLL-Ind)	EF651786

VI-I	Passionfruit (WB-Br4) ' <i>Ca. P. sudamericanum</i> '	GU292081
16SrVII: Ash yellows (América, Europa)		
VII-A	Ash yellows (AshY) ' <i>Ca. P. fraxini</i> '	AF092209
VII-B	Erigeron witches' broom (ErWB)	AY034608
VII-C	Argentinian alfalfa witches' broom (ArAWB)	AY147038
16SrVIII: Loofah witches' broom (Asia)		
VIII-A	Loofah witches' broom (LufWB)	AF086621
16SrIX: Pigeon pea witches' broom (Europa, Asia, América)		
IX-A	Pigeon pea witches' broom (PPWB)	AF248957
IX-B	Almond witches' broom (AlWB) ' <i>Ca. P. phoenicium</i> '	AF515636
IX-C	Naxos periwinkle virescence (NAXOS)	HQ589191
IX-D	Almond witches' broom (AlWB)	AF515637
IX-E	<i>Juniperus</i> witches' broom	GQ925918
IX-F	Almond and stone fruit witches' broom (N27-2)	HQ407532
IX-G	Almond and stone fruit witches' broom (A1-1)	HQ407514
16SrX: Apple proliferation (Europa, América)		
X-A	Apple proliferation (AP) ' <i>Ca. P. mali</i> '	AJ542541
X-B	European stone fruit yellows (ESFY) ' <i>Ca. P. prunorum</i> '	AJ542544
X-C	Pear decline (PD) ' <i>Ca. P. pyri</i> '	AJ54254
X-D	Spartium witches' broom (SpaWB) ' <i>Ca. P. spartii</i> '	X92869
X-E	Black alder witches' broom (BAWB(BWB))	X76431
16SrXI: Rice yellow dwarf (Europa, Asia, África)		
XI-A	Rice yellow dwarf (RYD) ' <i>Ca. P. oryzae</i> '	AB052873
XI-B	Sugarcane white leaf (SCWL)	X76432
XI-C	Leafhopper-borne (BVK)	X76429
16SrXII: Stolbur (Europa, Asia, América, África, Australia)		
XII-A	Stolbur (STOL11) ' <i>Ca. P. solani</i> '	AF248959
XII-B	Australian grapevine yellows (AUSGY) ' <i>Ca. P. australiense</i> '	L76865
XII-C	Strawberry lethal yellows (StrawLY)	AJ243045
XII-D	Japanese hydrangea phyllody ' <i>Ca. P. japonicum</i> '	AB010425
XII-E	Yellows diseased strawberry (StrawY) ' <i>Ca. P. fragariae</i> '	DQ086423
XII-F	"Bois noir" (BN-Op30)	EU836630
XII-G	"Bois noir" (BN-Fc3)	EU836647
XII-H	Bindweed yellows (BY-S57/11) ' <i>Ca. P. convolvuli</i> '	JN833705
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence (América)		

XIII-A	Mexican periwinkle virescence (MPV)	AF248960
XIII-B	Strawberry green petal (SGP)	U96616
16SrXIV: Bermudagrass white leaf (Europa)		
XIV-A	Bermudagrass white leaf (BGWL) ' <i>Ca. P. cynodontis</i> '	AJ550984
XIV-B	Bermudagrass white leaf Iran	EF444485
16SrXV: Hibiscus witches' broom (América)		
XV-A	Hibiscus witches' broom (HibWB) ' <i>Ca. P. brasiliense</i> '	AF147708
XV-B	Guazuma witches' broom (GWB)	HQ258882
16SrXVI: Sugarcane yellow leaf syndrome (América)		
XVI-A	Sugarcane yellow leaf syndrome ' <i>Ca. P. graminis</i> '	AY725228
16SrXVII: Papaya bunchy top (América)		
XVII-A	Papaya bunchy top ' <i>Ca. P. caricae</i> '	AY725234
16SrXVIII: American potato purple top wilt (América)		
XVIII-A	American potato purple top wilt ' <i>Ca. P. americanum</i> '	DQ174122
16SrXIX: Chestnut witches' broom (Asia)		
XIX-A	Chestnut witches' broom ' <i>Ca. P. castaneae</i> '	AB054986
16SrXX: Rhamnus witches' broom (Europa)		
XX-A	Rhamnus witches' broom ' <i>Ca. P. rhamni</i> '	AJ583009
16SrXXI: Pinus phytoplasmas (Europa)		
XXI-A	Pinus phytoplasma (PinP) ' <i>Ca. P. pini</i> '	AJ310849
16SrXXII: -		
XXII-A	Lethal yellow disease Mozambique (LYDM) ' <i>Ca. P. palmicola</i> '	KF751387
XXII-B	Cape St. Paul wilt disease (CSPW)	Y13912/JQ868442
16SrXXIII: -		
16SrXXIII-A	Buckland valley grapevine yellows	AY083605
16SrXXIV: -		
16SXXIV-A	Sorghum bunchy shoot	AF509322
16SrXXV: -		
16SXXV-A	Weeping tea witches broom	AF521672
16SrXXVI: -		
16SXXVI-A	Sugarcane phytoplasma D3T1	AJ539179
16SrXXVII: -		

16SXXVII-A	Sugarcane phytoplasma D3T2	AY539180
16SrXXVIII: -		
16SXXVIII-A	Derbid phytoplasma	AY744945
16SXXIX: Cassia witches' broom (Asia)		
16SXXIX-A	Cassia witches' broom (CaWB) ' <i>Ca. P. omanense</i> '	EF666051
16SXXX: Salt cedar witches' broom (Asia)		
16SXXX-A	Salt cedar witches' broom ' <i>Ca. P. tamaricis</i> '	FJ432664
16SXXXI: Soybean stunt (América)		
16SXXXI-A	Soybean stunt (SoyST1c1) ' <i>Ca. P. costaricanum</i> '	HQ225630
16SXXXII: Malaysian periwinkle virescence and phyllody (Asia)		
16SXXXII-A	Malaysian p. virescence (MaPV) ' <i>Ca. P. malaysianum</i> '	EU371934
16SXXXII-B	Malayan yellow dwarf phytoplasma (MYD)	EU498727
16SXXXII-C	Malayan oil palm phytoplasma (MOP)	EU498728
16SXXXIII: <i>Allocauarina muelleriana</i> phytoplasma (Australia)		
XXXIII-A	<i>Allocauarina</i> phytoplasma ' <i>Ca. P. allocauarinae</i> '	AY135523

*En inglés, el término “strain” es utilizado para hacer referencia a las distintas poblaciones de fitoplasmas, con base en la relación genética, biológica o epidemiológica. El término “cepa” se utiliza como traducción más cercana, y no corresponde al sentido estricto que es aplicado para “cepa” en microorganismos cultivables.

La diferenciación de fitoplasmas puede realizarse mediante observaciones de especificidad de anticuerpos, de insectos vectores y el rango de hospederos, o bien utilizando las secuencias menos conservadas de los genes *secA*, *secY*, *tuf*, *groEL* y las regiones espaciadoras 16S-23S rRNA. Estas herramientas pueden ser utilizadas para realizar estudios de caracterización, de epidemiología e incluso de identificación (Hodgetts *et al.*, 2008; Bertaccini, 2014; Fránová *et al.*, 2013).

2.2.3 Distribución geográfica de los grupos de fitoplasmas

Los fitoplasmas se presentan en un amplio rango de plantas hospederas, dentro de las que se incluyen especies de importancia económica alrededor del mundo (Lee *et al.*, 2000). Hasta 1989, la presencia de los ya mencionados, había sido reportada en al menos 85 países (McCoy, 1989) lo cual reflejó que existía mayor diversidad de la que se tenía conocimiento; los resultados actuales reflejan que dichos fitopatógenos no están distribuidos uniformemente en todos los continentes (Seemüller *et al.*, 1998; Dickinson y Hodgetts, 2013).

En investigaciones recientes, se ha reportado la presencia de este fitopatógeno en al menos 700 especies y 98 familias de plantas, que incluye tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Hogenhout *et al.*, 2008).

Muchos grupos (16Sr) de fitoplasmas parecen estar restringidos a una región geográfica o a un país específico; por ejemplo, el grupo de los amarillamientos del áster (VII-A), el grupo de la proliferación del trébol (VI-A) y la mayoría del grupo III, están en el hemisferio occidental; los fitoplasmas del grupo de la escoba de bruja del cacahuete (II-A) y el grupo del amarillamiento-enanismo del arroz (XI-A) están restringidos a la región del sureste de Asia; todos los pertenecientes al grupo X y el subgrupo del Stolbur (XII-A) están limitados al continente europeo (Lee y Davis, 1992). Además, se ha reportado la presencia de algunos grupos en un país específico, como es el caso del grupo de la escoba de bruja de la luffa (VIII-A), el grupo de la escoba de bruja de los hibiscos (XV-A) y el grupo de la escoba de bruja del espino cerval (XX-A) los cuales se encuentran en Taiwán, Brasil y Alemania, respectivamente.

El aislamiento geográfico de algunos fitoplasmas está correlacionado con la distribución de sus hospederos y los insectos vectores; por ejemplo, el fitoplasma del enanismo del maíz (“bushy stunt phytoplasma) coincide con el área de distribución de los insectos vectores *Dalbulus maidis* y *Dalbulus elimatus* (Davis y Sinclair, 1998).

La introducción de germoplasmas exóticos, sea maleza, cultivos o insectos, puede cambiar los ecosistemas de cada continente, al grado de que algunos fitoplasmas comiencen a dispersarse por el mundo; también se puede causar el aislamiento de fitoplasmas en nuevos nichos ecológicos y la evolución independiente a las cepas paternas (Lee *et al.*, 2000).

Mediante un estudio realizado en Latinoamérica (Pérez *et al.*, 2016), se reportó que los países en los que se presentaban con mayor frecuencia enfermedades asociadas a fitoplasmas eran Cuba, Brasil, Argentina, México y Bolivia. Un fenómeno importante que se observó fue la distribución de ciertos grupos de fitoplasmas en el hemisferio norte o sur. Por ejemplo, especies candidatas del grupo 16SrII se detectaron en Argentina y Chile (países localizados en el hemisferio sur); de igual forma, el grupo 16SrVII también se encontró restringido a países del sur como Brasil, Chile y Argentina (Torres *et al.*, 2004). Con los resultados obtenidos por Pérez y colaboradores, es posible inferir la manera en la que se distribuyen los

fitoplasmas, y se refleja la estrecha asociación que existe entre el fitopatógeno, sus hospederas y sus insectos vectores. Estos últimos, son de suma importancia, ya que las especies que participan como vectores presentan hábitos alimenticios distintos que influyen en la diseminación de los patógenos y permiten que las especies candidatas de fitoplasmas se encuentren en: a) un reducido número de especies vegetales (cuando los vectores son monófagos) o b) en un amplio rango de especies vegetales (cuando los vectores son polífagos). Por ejemplo, la presencia de algunos cicadélidos como especies del género *Dalbulus* se ha detectado en todos los países de Latinoamérica; contrastantemente, la especie *Amplicephalus curtulus*, sólo se ha detectado en Chile y Colombia (Arismendi *et al.*, 2014; Nault, 1980, 1983).

El 16% de las especies candidatas de fitoplasmas que se han descrito, han sido reportadas en América Latina y se encuentran asociadas a ciertas especies vegetales; por ejemplo en Cuba, la presencia del fitoplasma ‘*Ca. Phytoplasma caricae*’ (asociada con *Caricae papaya*); ‘*Ca. Phytoplasma graminis*’ (asociada con *Saccharum officinarum*, *Cynodon dactylon*, *Conyza Canadensis* y *Sorghum halepense*); y ‘*Ca. Phytoplasma brasiliense*’ (asociado con plantas del género *Hibiscus*). En Brasil, ‘*Ca. Phytoplasma sudamericanum*’, (asociado a *Passiflora edulis*); en Bolivia ‘*Ca. Phytoplasma lycopersici*’ (asociado a *Medicago sativa* y a algunas plantas silvestres como *Morrenia variegata* y *Serjania perulacea*) (Arocha *et al.*, 2007). Por otra parte, en Costa Rica, la presencia del fitoplasma ‘*Ca. Phytoplasma costaricanum*’ se asocia con *Glycine max*, *C. annuum* y especies del género *Passiflora* (Lee *et al.*, 2011).

Cabe destacar que, a diferencia de otras especies de fitoplasmas, las que se han encontrado recientemente en América Latina no han sido reportadas en ningún otro continente (Davis *et al.*, 2012; Montano *et al.*, 2001).

2.2.4 Sintomatología asociada a fitoplasmas

Los fitoplasmas son parásitos intracelulares estrictos/obligados del floema; en el tejido del floema alberga un rico contenido de glucosa y fructosa, lo cual le provee un suplemento energético a los fitoplasmas (Bai, 2004). Ante la presencia de este patógeno, la planta huésped sufre un desbalance fisiológico que se ve reflejado en un desorden del balance hormonal y en la alteración del contenido del floema.

Algunos ejemplos de estas anomalías son el bloqueo de transporte de auxinas, la reducción de ácido indolacético, el incremento de precursores hormonales, la presencia de inhibidores de síntesis de hormonas o alteraciones en el transporte y translocación de hormonas (Chang, 1998; Lee *et al.*, 2000).

Dicho desbalance-desorden se ve expresado a través de síntomas como resultado de la presencia de los fitoplasmas que varía según la etapa de la enfermedad o el avance de la infección. Se ha documentado que en presencia de fitoplasmas ocurre una deposición de callosa en el floema, seguida de una necrosis y colapso de los tejidos conductores o los poros celulares; la expresión de síntomas dependerá además, de la especie vegetal y de su nivel de resistencia (Arismendi *et al.*, 2010; Chang, 1998; Christensen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2000).

Otros factores que influyen en los cambios morfológicos de la estructura y órganos de la planta son: la etapa fenológica de la planta hospedera, cepa de fitoplasma, etapa de la enfermedad y las condiciones ambientales (Lee *et al.*, 2000).

En la Figura 1, es posible observar algunos de los síntomas que se asocian con fitoplasmas; las anomalías fenotípicas presentadas con mayor frecuencia son: enanismo generalizado de la planta, enrollamiento de láminas foliares, enrojecimiento precoz o amarillamiento, malformaciones de tipo “escoba de bruja”, malformaciones de tipo “yema grande”, filodia (transformación de estructuras florales en hojas), clorosis y necrosis (Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008). Los síntomas del amarillamiento causado por fitoplasmas pueden ser el resultado de perturbaciones en la carga de azúcar del floema, la acumulación de almidón y el bloqueo del floema (Martinelli *et al.*, 2013; Wulff *et al.*, 2014). Por su parte, las malformaciones tipo “escoba de bruja” pueden ser atribuidas a cambios hormonales (citocininas y auxinas).

2.2.5 Técnicas moleculares para la detección e identificación de fitoplasmas

En el estudio de organismos como el caso de los fitoplasmas, la detección sensible y precisa tanto en hospederos vegetales como en insectos es uno de los aspectos importantes en el conocimiento de estos patógenos, lo que es indispensable para el manejo y/o control de enfermedades. De acuerdo al avance en el desarrollo de técnicas moleculares, los métodos

utilizados para la identificación o al menos la diferenciación de fitoplasmas ha variado a lo largo del tiempo, hecho que ha favorecido el estudio de enfermedades causadas por estos fitopatógenos en nuevos hospederos (Perilla, 2013). En las primeras investigaciones asociadas a fitoplasmas, éstos eran diferenciados con base en caracteres morfológicos, rango de hospederos, especificidad de vectores y síntomas que generaban en las plantas (Seemüller *et al.*, 1998).

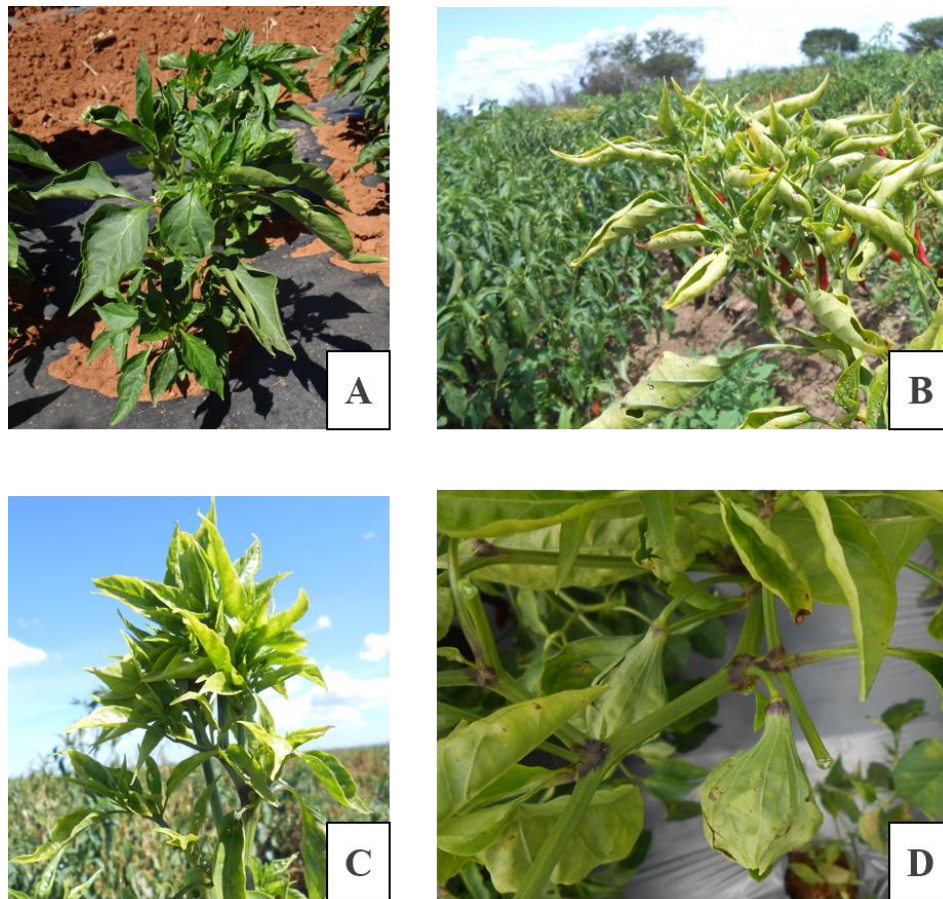


Figura 1. Síntomas que con frecuencia se asocian a fitoplasmas, dentro de los cuales destacan enanismo generalizado de la planta (A), amarillamiento y enrollamiento de las láminas foliares (B), malformaciones de tipo “escoba de bruja” (C) y malformaciones de tipo “yema grande” (D).

Actualmente, los avances en las técnicas de biología molecular se convirtieron en una herramienta efectiva para diagnosticar e identificar fitoplasmas. Las técnicas más utilizadas para realizar el diagnóstico son a) extracción de DNA y b) PCR anidada o cuantitativa, a través de la cual es amplificado un fragmento del gen 16S rRNA.

Para identificar las diferentes cepas de fitoplasmas, se deben realizar una serie de procedimientos que consisten en: extracción de DNA, amplificación del fragmento de interés mediante PCR anidada, secuenciación, análisis de la secuencia e identificación del patógeno (Makarova *et al.*, 2012; Paltrinieri *et al.*, 2015). Para realizar la clasificación taxonómica de fitoplasmas, existe también una herramienta llamada iPhyClassifier que se encuentra disponible en internet; iPhyClassifier utiliza la información disponible en GenBank, lo cual permite que se realice la comparación de perfiles de RFLP de las secuencias de las especies candidatas reconocidas a la fecha, y con ello se determina el grupo y subgrupo al que pertenecen las secuencias bajo estudio (Zhao *et al.*, 2009).

Así como la PCR, existen otras técnicas de amplificación de DNA que permiten realizar un diagnóstico confiable de patógenos, tal es el caso de la amplificación isotérmica mediada por loop (LAMP), esta técnica brinda resultados en menor tiempo comparada con la técnica de PCR anidada (aplicada comúnmente para el diagnóstico de fitoplasmas). En la última década, esta técnica se ha convertido en una herramienta de diagnóstico sumamente eficiente por dos razones, la primera el bajo costo que representa y la segunda el tiempo en el que puede ser desarrollada (Fukuta *et al.*, 2003; Hodgetts *et al.*, 2011; Kogovsek *et al.*, 2015). El protocolo de la técnica LAMP puede ser completado en menos de una hora con un equipo común como el termoblock o utilizando equipo más sofisticado como instrumentos de amplificación isotérmica (Optigene, GenieII) y plataformas de PCR cuantitativa.

2.3 Transmisión de fitoplasmas

Más de 1000 enfermedades en plantas son causadas por fitoplasmas que son transmitidos por insectos de la familia Cicadellidae y, en menor medida, por otras familias de hemípteros (Mitchel, 2004; Weintraub y Beanland, 2006).

La adquisición y transmisión de fitoplasmas a través de los insectos vectores de la familia Cicadellidae ocurre de la siguiente manera: todo inicia con una planta enferma (enfermedad causada por la presencia de fitoplasmas), el insecto se alimenta de ella introduciendo su aparato bucal en los tejidos del floema y ocurre lo que se conoce como período de adquisición por alimentación (PAA) el cual puede extenderse desde unos cuantos minutos a algunas horas; mientras más extenso sea este período, mayor es la probabilidad de adquisición del patógeno. Una vez que el insecto adquiere los fitoplasmas ocurre el período de latencia (PL). Los fitoplasmas que fueron ingeridos con la savia de la planta se mueven a través del canal alimenticio del estilete y el tracto intestinal e invaden células epiteliales y musculares del esófago, así como el estomodeo, el mesentrón, el proctodeo, la cámara de filtración y los tubos de Malpighi (Hogenhout *et al.*, 2008). De manera similar a los espiroplasmas (Özbek *et al.*, 2003), los fitoplasmas probablemente cruzan la lámina basal para entrar en la hemolinfa desde donde pueden pasar a las glándulas salivales; luego se multiplican en células secretoras de las glándulas salivales y se transportan junto con la saliva al conducto salival. La duración del período de latencia es variable, pero en promedio es llevado a cabo en 10 días. Al finalizar dicho período, el insecto queda “*Potencialmente infectivo*” por el resto de su vida. Una vez que los patógenos han migrado hacia las glándulas salivales de su vector, son transmitidos hacia el floema de la nueva planta hospedera a través de la saliva. Este proceso se conoce como período de inoculación por alimentación, PIA.

El proceso completo de transmisión puede tomar de 2 a 4 semanas, esto depende de la concentración de fitoplasmas presentes en la fuente alimenticia y la duración del periodo de adquisición en la planta afectada (Bosco *et al.*, 2007; Bressan *et al.*, 2006; Marzachí *et al.*, 2004). Los fitoplasmas pueden alcanzar altas concentraciones al multiplicarse, sin embargo, en las fases muy tempranas de la adquisición-inoculación, las concentraciones en el insecto, pueden ser tan bajas, que incluso las herramientas sensibles de diagnóstico pueden fallar en la detección del patógeno (Bosco y Tedeschi, 2013).

Diversas bacterias fitopatógenas se caracterizan por utilizar sistemas de secreción de tipo III y IV para bombear efectores y factores de patogenicidad en las células huésped. Aunque los fitoplasmas carecen de estos sistemas de secreción, poseen sistemas de secreción dependientes de Sec.

Los fitoplasmas codifican la translocasa SecA, que es parte del sistema de secreción tipo II de las bacterias. Este sistema de secreción permite la “entrega-salida” de proteínas que poseen un péptido señal característico en el extremo N-terminal, a través de la membrana bacteriana hacia el citoplasma de las células vegetales o del insecto vector. Las proteínas secretadas alteran la estructura y funcionalidad de los hospederos, por lo tanto, actúan como efectores (Hogenhout *et al.*, 2009). Un solo genoma de fitoplasma puede codificar más de 50 proteínas secretadas (SAP’s), sin embargo, solo se conoce la función de algunas SAP’s durante la colonización del hospedero (Bai *et al.*, 2009). Varios de estos genes recientemente se han expresado en plantas transgénicas y se ha demostrado que actúan como efectores, interfiriendo con la homeostasis de las hormonas en las plantas hospederas para dar lugar a síntomas comunes de fitoplasma tales como virescencia, malformación de tipo “escoba de bruja” y enanismos (Bai *et al.*, 2009; Lough y Lucas, 2006; MacLean *et al.*, 2011). Un segundo grupo de proteínas derivadas del sistema de secreción Sec son las proteínas inmunodominantes de la membrana (IMP’s), que permanecen ancladas en la membrana externa de los fitoplasmas. Las IMP’s son únicas para fitoplasmas, y se categorizan en tres subgrupos dependiendo de si el extremo C-terminal de la proteína se expone extracelularmente (Amp, IdpA, or Imp; Kakizawa *et al.*, 2006). Estas proteínas impiden la unión de los fitoplasmas en el intestino del vector (Rashidi *et al.*, 2015).

3. HIPÓTESIS

La densidad y diversidad de cicadélidos, de hospederas alternas y la presencia de fitoplasma en el cultivo de chile a lo largo del tiempo, depende de las condiciones ambientales y de las técnicas en el manejo del cultivo.

4. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Caracterizar el patosistema fitoplasma-chile tipo mirasol en Zacatecas y Aguascalientes, México.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar la fluctuación poblacional de cicadélidos y la frecuencia de las plantas hospederas alternas.
- 2) Determinar los géneros de cicadélidos presentes en los sitios de estudio.
- 3) Detectar la presencia de fitoplasmas en el patosistema.
- 4) Identificar el grupo taxonómico de los fitoplasmas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Localidad

Los sitios de estudio se ubicaron en Villa de Cos, Zacatecas y en San Francisco de los Romo, Aguascalientes. Las parcelas que se seleccionaron fueron de aproximadamente 2 Has. cada una, y en ambas se cultivó chile tipo Mirasol. Dichas localidades forman parte de la franja productora de chile para secado a nivel nacional, sin embargo presentan características climatológicas y estrategias de manejo de cultivo distintas.

Villa de Cos, Zacatecas

El sitio de estudio se ubicó a los 23° 6'17.48" latitud norte y a los 102°17'19.04" longitud oeste del meridiano de Greenwich, y a una altitud de 1984 msnm. La precipitación media anual del 2015, año previo al año de muestreo de esta investigación, fue de 677 mm, presentando una temperatura promedio de 16.3 °C y un porcentaje de humedad relativa promedio de 63.34%.

El establecimiento del cultivo se realizó durante la tercera semana de abril del 2016; las estrategias de manejo de cultivo fueron poco tecnificadas, puesto que a lo largo del ciclo de cultivo se llevaron a cabo dos aplicaciones de herbicida (mayo, junio) y una de insecticida (mayo). Para el año 2016, la precipitación media anual fue de 408 mm, presentando una temperatura promedio de 16.3 °C y un porcentaje de humedad relativa promedio de 54.54%.

San Francisco de los Romo, Aguascalientes

El sitio de estudio se ubicó a los 22° 5'53.60" latitud norte y a los 102°16'16.11" longitud oeste y a una altitud de 1897 msnm. La precipitación media anual del 2015, fue de 597 mm, presentando una temperatura promedio de 16.3°C y un porcentaje de humedad relativa promedio de 59.48%.

El establecimiento del cultivo se realizó durante la segunda semana de marzo del 2016; en este sitio las estrategias de manejo del cultivo fueron tecnificadas, aplicando de manera periódica herbicida (abril, mayo, julio), así como también de insecticida (marzo, abril, mayo), el manejo incluyó además un control de maleza tradicional (deshierbe). Para el año 2016, la precipitación media anual fue de 448 mm, presentando una temperatura promedio de 17.13 °C y un porcentaje de humedad relativa promedio de 52.56%.

5.2 Colecta de hospederas vegetales alternas

El registro y colecta de plantas hospederas alternas se realizó durante el invierno e inicio de la primavera. Las fechas de muestreo se establecieron en función del establecimiento del cultivo de chile, colectando en diciembre de 2015 y los meses siguientes de enero, marzo, mayo y julio del 2016. Todas las plantas colectadas presentaban síntomas asociados a fitoplasmosis (amarillamiento foliar, enanismo generalizado, enrollamiento de las láminas foliares, exceso de botones florales, enrojecimiento precoz de las hojas o protuberancias en las láminas foliares). Las estructuras vegetales colectadas de cada planta fueron las láminas foliares, seleccionando aquellas jóvenes y en buenas condiciones. Las muestras fueron mantenidas en una hielera a una temperatura promedio de 4°C (durante el tiempo de traslado de campo al laboratorio) para su posterior procesamiento.

La frecuencia de especies y de síntomas fue determinada utilizando la técnica de Línea de Canfield modificada, conocida también como “punto de pie” (Bonham, 2013); en cada sitio fueron realizadas 6 líneas de registro de 40m cada una; cada observación fue registrada en una hoja de campo donde se especificó la especie de planta observada y si presentaba síntomas de fitoplasmosis.

5.3 Colecta de insectos vectores

Los insectos se colectaron mensualmente desde diciembre del 2015 a noviembre del 2016. Los insectos fueron colectados utilizando la técnica de golpe de red con 6 líneas de muestreo por sitio (de 100 redadas cada una), en donde las líneas fueron distribuidas de manera aleatoria. Cada muestra por línea se colocó dentro de una bolsa de plástico de 50x60cm. Posteriormente, los individuos de la familia Cicadellide fueron seleccionados, identificados y cuantificados. Utilizando las claves taxonómicas de Dietrich (2005) se identificó particularmente la especie *Circulifer tenellus*, considerada vector potencial de fitoplasmas.

5.4 Detección e identificación de fitoplasmas

5.4.1 Extracción de DNA

Para la extracción del DNA de las plantas, se utilizó el protocolo reportado por Dellaporta y colaboradores (1983). En insectos se utilizó el protocolo propuesto por Ceñis, (1993). La calidad y pureza del DNA fue evaluada por espectrofotometría a 260/280nm utilizando un Nanodrop 2000C de Thermo Scientific. La calidad del DNA fue determinada a través de geles de agarosa al 1% .

5.4.2 PCR

La detección de fitoplasma se realizó mediante PCR anidado, amplificando una región del gen ribosomal 16S RNA utilizando los pares de primers universales **P1** (5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3') y **Tint** (5'-TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C-3') para la primer amplificación (Smart *et al.*, 1996) y los primers **R16F2n** (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') y **R16R2** (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3') para la segunda amplificación (Gundersen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998). El primer PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 μ l utilizando concentraciones finales de 1 unidad de Taq polimerasa Promega, 0.2mM de dNTP's, 5X de buffer para PCR, 1.5 mM de MgCl₂ , 0.5 μ M de cada primer y 1 μ l de DNA blanco. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 de Applied Biosystems con las condiciones de amplificación de 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos seguida de una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para la segunda amplificación, se utilizaron las mismas condiciones, pero incorporando 1 μ l del producto de PCR anterior. Las condiciones de amplificación para el segundo PCR fueron similares, modificando la temperatura de alineación a 55°C de acuerdo a lo reportado por Lee *et al.* (1998). Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.4.3 Clonación

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit y se clonaron en el vector pGEM-T Easy Vector System (Promega) utilizando células quimiocompetentes *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células transformadas fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina (100 µg/ ml), X-Gal (20 µg/ ml) e IPTG (200 µg/ ml). Para verificar la inserción del fragmento, se realizó una miniprep para la extracción de DNA mediante la técnica de lisis alcalina descrita por Birnboim y Doly (1979), seguida de una digestión utilizando EcoRI. El fragmento liberado (1250 pb) fue visualizado en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Por último, los plásmidos extraídos de las clonas positivas se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

5.4.4. Análisis de secuencia

El programa iPhyClassifier (<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) es una herramienta interactiva que permite realizar una rápida identificación y clasificación de diversas cepas de fitoplasmas comparando las secuencias del gen 16S rRNA. A través de la comparación de perfiles de RFLP *in silico* es posible determinar a qué grupo y subgrupo pertenece la secuencia de la “cepa problema” introducida por el usuario (Zhao *et al.*, 2009). La secuencia obtenida fue digerida *in silico* con 17 enzimas de restricción (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* y *TaqI*), el análisis de los fragmentos obtenidos fue visualizado en un gel de electroforesis virtual a 3%, información que permitió comparar cada grupo y subgrupo de acuerdo a la secuencias del gen 16S (Lee *et al.*, 1998).

5.5 Análisis estadístico

Con el propósito de identificar las variables climáticas (unidades calor, radiación global, humedad relativa, temperatura máxima y mínima, precipitación total, velocidad del viento

máxima y evapotranspiración potencial y de referencia) responsables de la variación en el patosistema fitoplasma-chile, se realizó un Análisis de Componentes Principales mediante la matriz de coeficientes de correlación (Wold *et al.*, 1987) seguido de un análisis de conglomerados jerárquicos (Clúster), utilizando los paquetes estadísticos Minitab 17.2.1 y R-Project respectivamente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Frecuencia de plantas hospederas alternas y detección de fitoplasmas

Los cultivos de chile en la región Norte Centro de México se encuentran expuestos a la actividad alimentaria de diversos insectos, por lo que son propensos a adquirir patógenos tales como hongos, virus y fitoplasmas; dentro de los insectos encontrados con mayor frecuencia en cultivo de chile se encuentran los miembros de la familia Cicadellidae, específicamente se ha registrado la presencia de *C. tenellus*, insecto que, en investigaciones previas se ha reportado como el principal vector de virus y fitoplasmas (Munyaneza *et al.*, 2007; Munyaneza *et al.*, 2010; Sertkaya *et al.*, 2007 y Velásquez *et al.*, 2012).

En una investigación realizada por el INIFAP, Campo Experimental Zacatecas, se llevó a cabo un muestreo intensivo durante cuatro años en diversos lotes de chile con la finalidad de conocer las poblaciones de cicadélidos. Durante este período sólo fueron colectados adultos de esta familia; por lo que la ausencia de ninfas y huevos sugiere que el cultivo sólo sirve como hospedero de alimentación (Mena *et al.*, 2014). Es por este motivo que se destaca la importancia de conocer la cobertura de las plantas arvenses así como la diversidad de las mismas, debido a que dichas plantas al estar presentes previo a, durante y posterior al establecimiento del cultivo favorecen el ciclo del insecto vector, por lo cual se complica el control del patógeno.

En Zacatecas la cobertura vegetal y la frecuencia de hospederas alternas en la región productora de chile incluyó un total de seis especies: *Eruca sativa* (253 individuos), *Reseda luteola* (150), *Sisymbrium irio* (130), *Salsola tragus* (85), *Amaranthus palmeri* (80) y *Malva parviflora* (34); el 83% de las especies registradas se encuentra presente de manera simultánea y constante en los meses de enero, marzo y mayo. Destaca la presencia de *E. sativa* en las cinco fechas de muestreo, siendo la especie más frecuente con 253 individuos registrados. Las especies registradas en segundo y tercer lugar de frecuencia fueron *R. luteola* y *S. irio* (Figura 2A).

Por otro lado, en Aguascalientes fueron registradas seis especies arvenses características del sitio: *Chenopodium album* (145 individuos), *Capsella bursa-pastoris* (115), *Reseda luteola* (111), *Malva parviflora* (110), *Lepidium virginicum* (8) y *Raphanus raphanistrum* (1); la

frecuencia de cada una se presenta en la Figura 2B. El 67% de las especies registradas apareció de manera simultánea y constante en los meses de enero y marzo. *C. album* fue la especie que se presentó durante las cinco fechas de muestreo y se determinó como la de mayor número de individuos registrados (145 individuos). Las especies registradas en segundo y tercer lugar de frecuencia fueron *C. bursa-pastoris* y *R. luteola*.

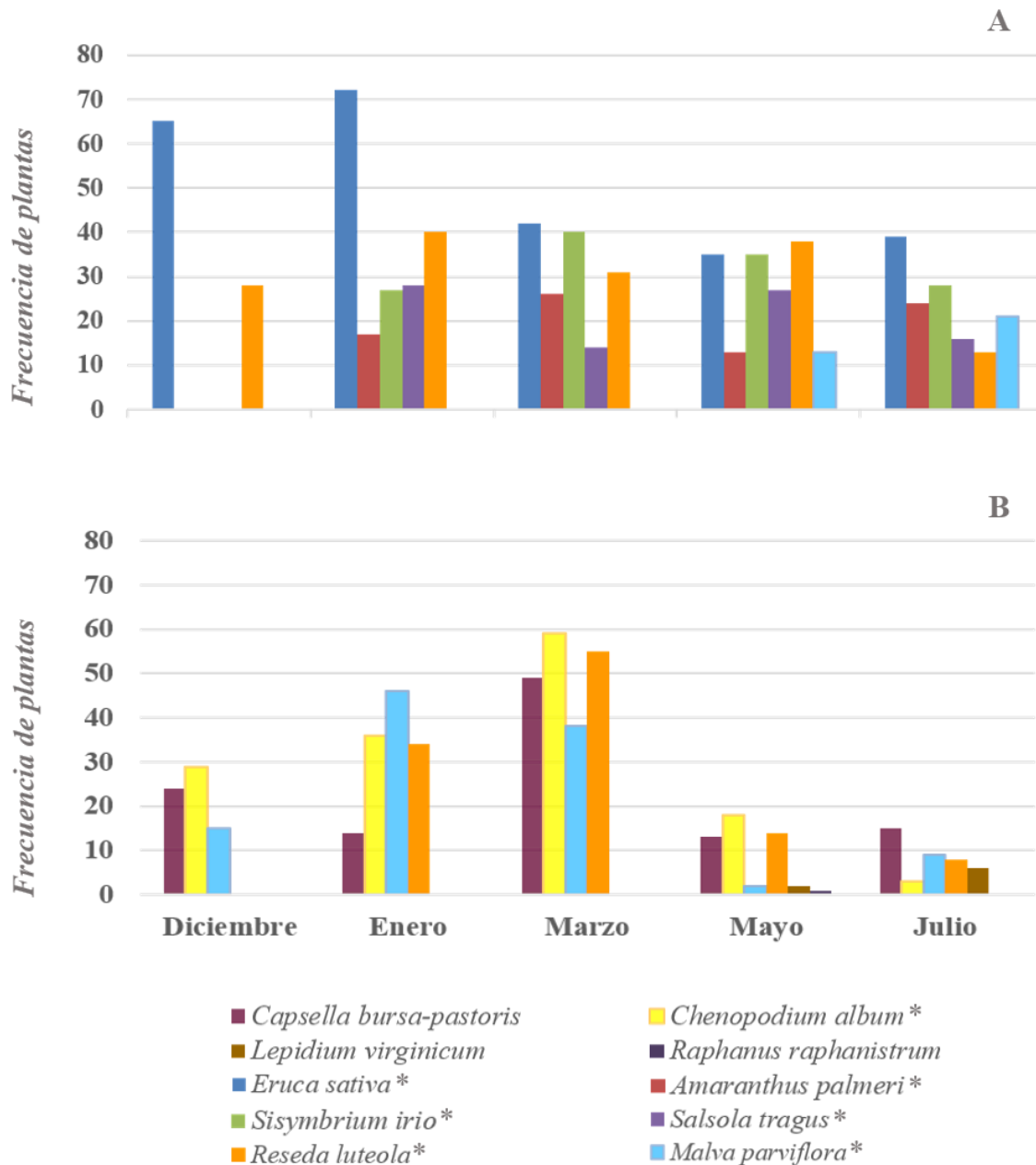


Figura 2. Frecuencia de plantas hospederas alternas registradas en Zacatecas (A) y Aguascalientes (B). Las especies que están señaladas con un asterisco (*) son especies que en investigaciones previas se han reportado como reservorios de fitoplasmas.

Cabe mencionar que con excepción de *R. luteola* y *M. parviflora* todas las especies fueron diferentes entre Zacatecas y Aguascalientes. Las especies *E. sativa*, *S. irio*, *R. luteola*, *C. album*, *A. palmeri*, *S. tragus* y *M. parviflora* han sido previamente reportadas como hospederas de fitoplasmas en diversas partes del mundo (Azadvar *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2006; Munyaneza *et al.*, 2006).

En un agroecosistema, la maleza (considerada planta hospedera alterna) debe ser valorada por ser productores primarios dentro de los sistemas agrícolas y favorecer otros niveles tróficos sobre el suelo (Marshall *et al.*, 2003). Son fuente de alimento de diversos animales y favorecen la propagación de hongos y bacterias benéficas. Representan un refugio y sitios reproductivos para diversos organismos (Ball *et al.*, 2015; Duffus, 1971). Sin embargo, no todos los organismos favorecidos son benéficos; en un patosistema, las plantas hospederas alternas representan un reservorio de fitopatógenos y refugio de insectos que fungen como vectores de dichos patógenos. En 2008, en Reino Unido, fue determinado que la diversidad de la maleza en las zonas de cultivo había cambiado durante el siglo pasado, con algunas especies disminuyendo en densidad, incluso desapareciendo su registro. Algunos de estos cambios se interpretaron como el resultado de una mejor eficiencia agrícola, empleando prácticas como rotación de cultivos y el uso de combinaciones de herbicidas de mayor espectro (Andreasen y Stryhn, 2008). La aplicación de estas técnicas favorece a las plantas cultivadas porque es eliminada la competencia, sin embargo, tienen un papel dentro de los agroecosistemas en el “apoyo” a la biodiversidad en general. Una comprensión de la competitividad de la maleza y la importancia de ellas para los insectos y las aves, puede permitir la identificación de las especies más importantes. Esto puede ser el primer paso para equilibrar las necesidades de control de maleza con los requisitos de biodiversidad y métodos de producción más sostenibles (Marshall *et al.*, 2003; Stoate *et al.*, 2002).

En el caso particular del patosistema fitoplasma-chile, las especies que tienen mayor relación con él son *E. sativa*, *R. luteola* y *S. irio* (Aguirre *et al.*, 2014; Garzón *et al.*, 2002; Velásquez *et al.*, 2012); en cada ciclo de cultivo estas plantas, junto con otras especies registradas en menor proporción (*S. tragus*, *M. parviflora*) se han manifestado de manera constante, hecho por el que podría inferirse que existe una relación entre dichas hospederas y las plantas de Chile.

La información sobre la preferencia que tiene el vector de fitoplasmas *C. tenellus* de un hospedero alternativo sobre otro, aún no se encuentra documentada. No obstante es posible suponer que la preferencia sobre un hospedero vegetal alternativo podría estar influenciado por: a) El ciclo de vida (duración) de las hospederas alternas, que se refleja en poblaciones constantes a lo largo del ciclo de cultivo; b) las características estructurales de las plantas, por ejemplo menor grosor de la “epidermis” lo que representa un menor gasto de energía del insecto al llevar a cabo su alimentación y c) la capacidad que tienen las poblaciones de una especie dada para tolerar estrés ambiental, ya que son plantas que perpetúan durante largos períodos de tiempo, lo que facilita a los insectos utilizarlas como fuente de alimento y/o sitios reproductivos.

Es probable que el éxito que tienen los fitoplasmas para propagarse en un número considerable de especies vegetales, este relacionado con la producción de proteínas efectoras y su capacidad para modificar la permeabilidad de las células durante el proceso de infección, (Hogehout y Loria, 2008; Kakizawa *et al.*, 2004). Así como la capacidad que tienen para invadir y acumularse en diferentes células y tejidos de los insectos (Bai, 2004). La comprensión de la función molecular de los efectores es esencial para tener una visión mecanicista de los procesos subyacentes a la colonización de la planta y del vector por parte de los fitoplasmas (Orlovskis y Hogehout, 2016).

En el caso particular del Altiplano Mexicano las especies que se han reportado con presencia de fitoplasmas y que coinciden con las del presente estudio son especies del género *Reseda*, así como las especies *S. irio*, *C. album* y *E. sativa* (Aguirre *et al.*, 2014 y Mercado *et al.*, 2013). La importancia de identificar a hospederos vegetales alternos de fitoplasmas se relaciona con el importante papel que juegan como hábitat de diversas especies de insectos vectores, entre los que destacan *C. tenellus*, *Empoasca fabae* y *Dalbulus maidis* (Munyanza *et al.*, 2010), con el fin de proponer estrategias de control de “malezas” o planes de manejo adecuados. *R. luteola*, *E. sativa*, *S. irio* y algunas especies del género *Erodium*, son plantas que con frecuencia se presentan alledañas a las zonas de cultivo de Chile en época de invierno; se caracterizan por albergar poblaciones de *C. tenellus* proporcionándoles fuente de alimento y sitios de reproducción.

En verano, se han reportado como hospederas de éste insecto algunas especies de los géneros *Atriplex* y *Chenopodium* (Hernández, 2015 y Mena *et al.*, 2014).

Detección de fitoplasmas.

En este estudio, se realizó la detección de fitoplasmas en un total de 238 y 109 plantas hospederas alternas colectadas en Zacatecas y Aguascalientes, respectivamente. Las fechas de muestreo se establecieron durante el periodo diciembre del 2015 a agosto del 2016 y las muestras fueron tomadas únicamente de plantas que presentaban síntomas asociados a fitoplasmas. Los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia fueron: enanismo generalizado y amarillamiento foliar, enanismo y ausencia de botones florales, malformación del tipo “escoba de bruja” y enrollamiento de láminas foliares (Figura 3).

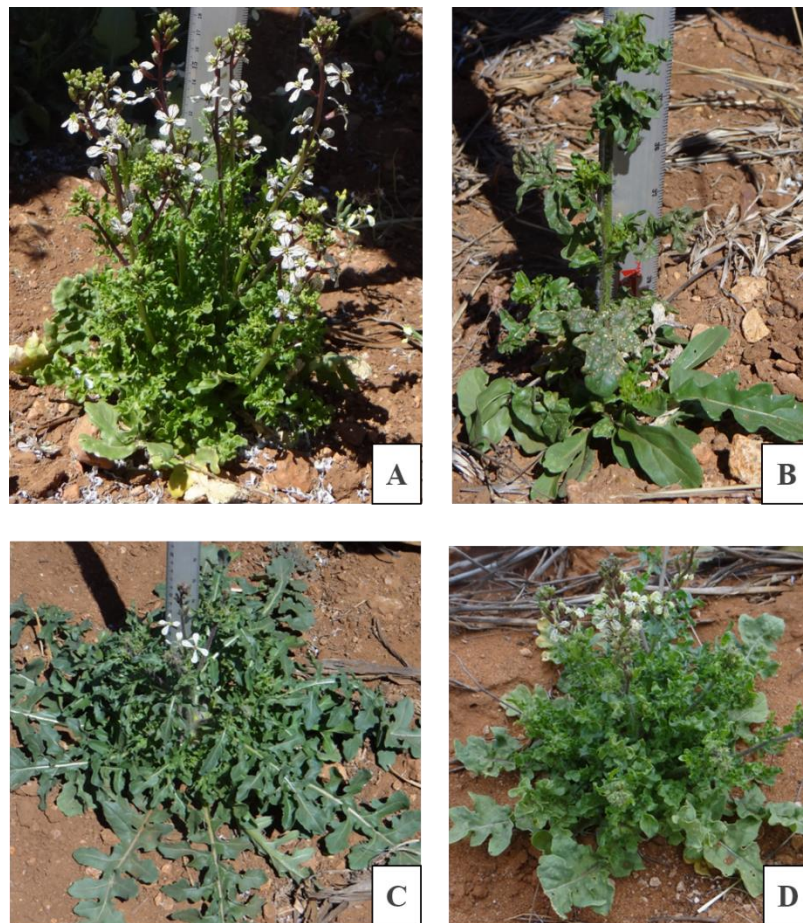


Figura 3. Síntomas que se presentaron con mayor frecuencia en plantas hospederas alternas; la especie tomada como ejemplo es *Eruca sativa*. Los síntomas fueron: enanismo generalizado y amarillamiento foliar (A), enanismo y ausencia de botones florales (B), malformación del tipo “escoba de bruja” (C) y enrollamiento de láminas foliares (D).

La caracterización de síntomas puede contribuir a posteriores trabajos para facilitar colectas dirigidas y lograr la detección e identificación de fitoplasma en las especies identificadas en

este trabajo. Síntomas similares habían sido previamente reportados en *E. sativa*, *C. album* y *R. luteola* (Velásquez *et al.*, 2012). El porcentaje de detección del patógeno en hospederos alternos fue similar entre los dos sitios de colecta, con valores de 31% en Zacatecas y 26% en Aguascalientes. Las especies que se presentaron con mayor frecuencia de síntomas y mayor porcentaje de detección positiva fueron *E. sativa* y *C. album*, respectivamente (Cuadro 3). Tanto *E. sativa*, como *C. album* son especies donde diferentes cepas de fitoplasmas han sido reportadas (Azadvar 2011; Safarova *et al.*, 2011 y Vargas, 2005).

Cuadro 3. Detección de fitoplasmas* en plantas hospederas alternas con síntomas asociados al patógeno.		
Especie	Analizadas	Positivas
Zacatecas		
<i>Eruca sativa</i>	131	31
<i>Reseda luteola</i>	40	21
<i>Amaranthus palmeri</i>	27	8
<i>Sisymbrium irio</i>	20	6
<i>Salsola tragus</i>	14	5
<i>Malva parviflora</i>	6	1
Aguascalientes		
<i>Chenopodium album</i>	51	13
<i>Reseda luteola</i>	32	5
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	14	6
<i>Malva parviflora</i>	11	3
<i>Raphanus raphanistrum</i>	1	0

*Detección realizada mediante PCR anidado.

Los meses con mayor incidencia de fitoplasmas fueron mayo y marzo, presentando porcentajes de detección de 43% y 41% en Zacatecas y de 20% y 46% en Aguascalientes, respectivamente. La detección de fitoplasmas en especies como *E. sativa*, *S. irio*, *R. luteola* y *C. album* en diferentes meses es un indicador de que pueden estar fungiendo como reservorios potenciales en el Altiplano Mexicano (Aguirre *et al.*, 2014; Almeyda 2002; Mercado *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2007; Velásquez *et al.*, 2012).

En algunos casos plantas asintomáticas (testigos) fueron positivas en la detección por PCR, esto podría deberse a la sensibilidad de método de detección, que permite identificar al patógeno, en etapas incipientes del desarrollo de la enfermedad. Otra explicación podría implicar una contención del patógeno a través de un mecanismo de resistencia (Weintraub y Jones, 2010), donde la etapa fenológica de la planta juega un papel importante en la manifestación de síntomas (Gundresen *et al.*, 1996; Sugio y Hogenhout, 2012).

Dado que los efectores pueden alterar la expresión fenotípica de sus hospederos, en las plantas esto implica una reprogramación del desarrollo y morfología que promueve la supervivencia y la aptitud del patógeno (Le Fevre *et al.*, 2015, Dawkins, 2016). Por ejemplo, los fitoplasmas inducen en sus plantas hospederas una anomalía en las estructuras florales, convirtiéndolas entonces en una flor similar a una hoja (filodia), presumiblemente esta modificación es realizada para atraer insectos vectores de los que dependen los fitoplasmas para su transmisión y propagación. Tal es el caso de la proteína efectora SAP54, que promueve la degradación de los factores de transcripción MADS-box, involucrados en la regulación del desarrollo floral, por lo que se infiere que, a través de esta ruta los fitoplasmas inducen la filodia para promover la atracción de los insectos vectores, responsables de su propagación (MacLean *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no se cuenta con información concreta sobre los cambios morfológicos presentados en la planta, sigue siendo discutible si estas modificaciones son directamente beneficiosas para los patógenos o son productos secundarios de la infección (Gould y Lewontin, 1979).

6.2 Diversidad de cicadélidos y fluctuación poblacional de los géneros portadores de fitoplasmas

Los géneros identificados presentes en los sitios de estudio fueron: *Aceratagallia*, *Agallia*, *Cuerna*, *Empoasca*, *Circulifer*, *Draeculacephala*, *Texananus*, *Dalbulus*, *Graminella*, *Macrosteles* y *Hordnia* (Figura 4). El registro de individuos de estos géneros coincide con los reportados por Velásquez y colaboradores (2017) en un estudio realizado en localidades de Aguascalientes, Coahuila y Zacatecas.

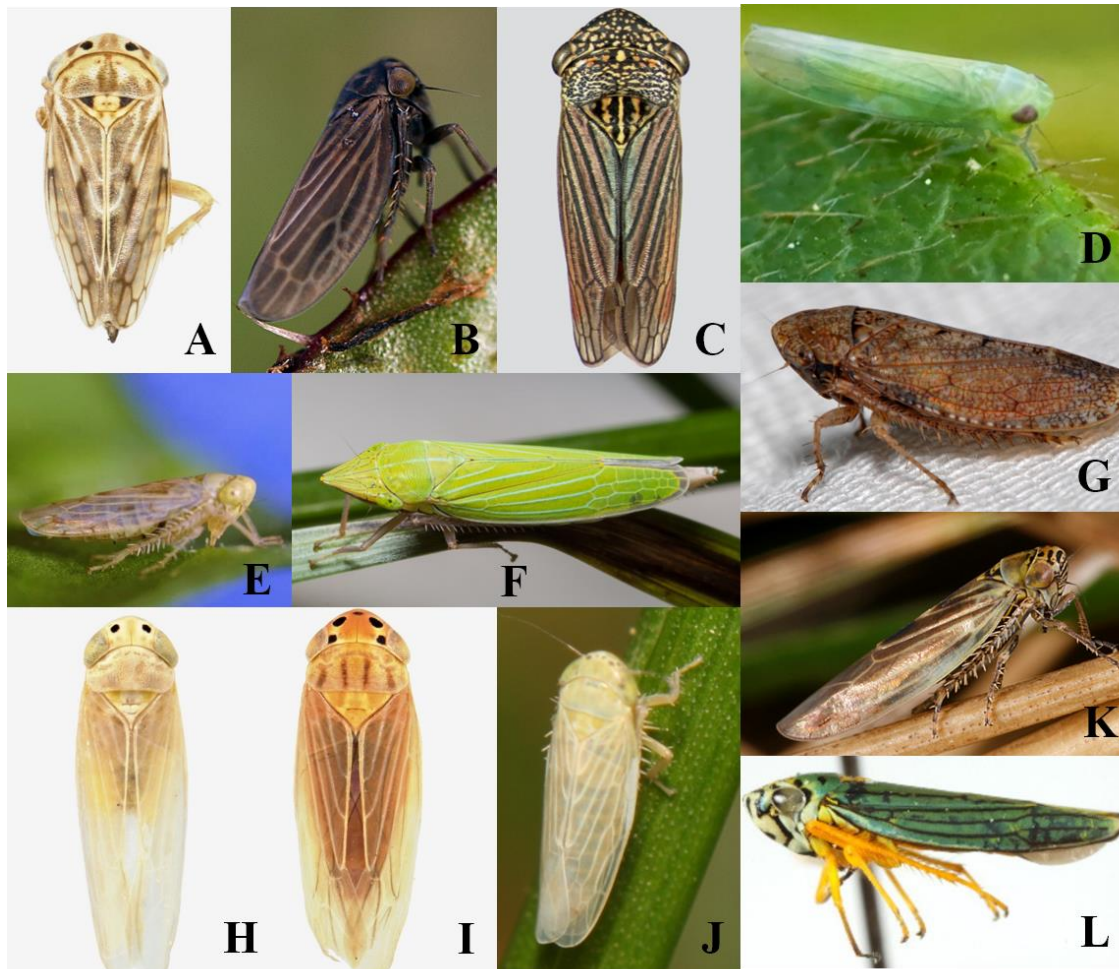


Figura 4. Especies representativas de los géneros de cicadélidos registrados en Zacatecas y Aguascalientes. Los géneros identificados son *Aceratagallia* (A), *Agallia* (B), *Cuerna* (C), *Empoasca* (D), *Circulifer* (E), *Draeculacephala* (F), *Texananus* (G), *Dalbulus* (H, I), *Graminella* (J), *Macrosteles* (K) y *Hordnia* (L).

En los últimos 10 años la importancia de algunas especies pertenecientes a estos géneros se ha incrementado debido al papel que desempeñan como vectores de virus y fitoplasmas en la región Norte Centro de México; algunos de los géneros en los que se ha señalado la presencia de fitoplasmas son *Aceratagallia* spp., *Dalbulus* spp., *Empoasca* spp., y *Graminella* spp., todos recolectados en Zacatecas y Chihuahua (Abraján *et al.*, 2014; Dávila *et al.*, 2014; López-Romo *et al.*, 2014 y Mercado *et al.*, 2013).

En la Figura 5 se presenta la fluctuación poblacional de los géneros *Circulifer*, *Empoasca*, *Graminella*, *Aceratagallia*, *Dalbulus* y *Agallia*, estos géneros fueron los registrados con mayor frecuencia, y todos han sido reportados previamente como portadores y vectores de

fitoplasmas (Arocha *et al.*, 2005; Dávila *et al.*, 2014). Tanto en Zacatecas, como en Aguascalientes, las poblaciones más altas de los vectores se registraron en mayo. Es importante mencionar que en el sitio de Zacatecas hubo nevadas en los meses de enero y marzo, lo que probablemente influyó en los niveles de poblaciones de cicadélidos.

De la especie *C. tenellus* fueron identificados 144 individuos en Zacatecas y 92 en Aguascalientes. La mayor incidencia se presentó en noviembre para Zacatecas y en abril para Aguascalientes. La colecta de individuos de éste género, sobretudo en hospederas alternas, había sido mencionada por Velásquez *et al.*, (2012). Estos resultados confirman la importancia de las “malezas” como refugio de *C. tenellus* y la necesidad de llevar a cabo un mejor manejo en el cultivo para evitar la propagación de los fitoplasmas (Velásquez *et al.*, 2017).

Los individuos del género *Empoasca* colectados en Zacatecas y Aguascalientes fueron 400 y 425, respectivamente, siendo éste el género con mayor representación en ambas localidades. El mes en el que se presentó la mayor presencia de estos insectos fue mayo para ambas localidades. Miembros de este género han sido reportados como vectores de fitoplasmas, tal es el caso de *E. papayae*, que se asocia con enfermedades provocadas por fitoplasmas en cultivos de caña de azúcar y papaya, en Cuba (Arocha *et al.*, 2005) y *E. decipiens* como vector del fitoplasma “*Ca. Phytoplasma asteris*” (subgrupo 16SrI-B) (Acosta *et al.*, 2017). Sin embargo, en la región Norte Centro de México, existe información escasa referente a especies de este género como vectores de fitoplasmas (Dávila *et al.*, 2014).

Individuos del género *Graminella* fueron identificados en ambas localidades (75 en Zacatecas y 90 en Aguascalientes); la mayor presencia de estos insectos se presentó en el mes de mayo en ambos sitios. Especies del género *Graminella*, específicamente de *G. nigrifrons* han sido reportados como portadores y vectores de fitoplasmas; por ejemplo en una investigación realizada en Canadá, *G. nigrifrons* resultó ser vector potencial de fitoplasmas del grupo 16Sr I-A (*Ca. Phytoplasma asteris*) y del grupo 16Sr VII-A (*Ca. Phytoplasma fraxini*) (Arocha *et al.*, 2011). En 2014, se detectó la presencia de fitoplasmas en 5/30 individuos capturados en Zacatecas (Dávila *et al.*, 2014), sin embargo, hasta hoy día, no se ha reportado que *Graminella* sea vector de dicho patógeno en el Altiplano Mexicano.

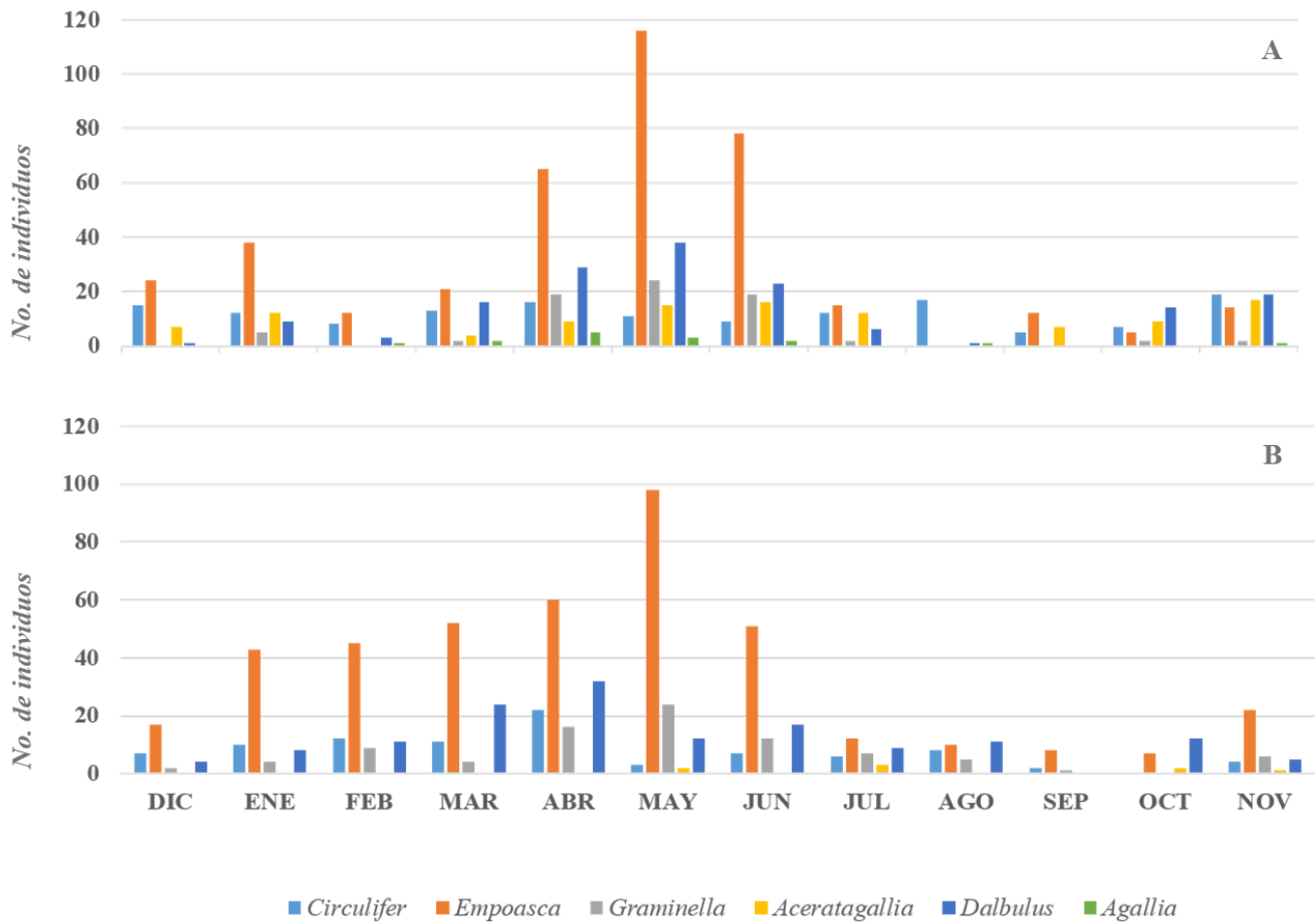


Figura 5. Fluctuación poblacional de los géneros *Circulifer*, *Empoasca*, *Graminella*, *Aceratagallia*, *Dalbulus* y *Agallia* de la familia Cicadellidae registrados en Zacatecas (A) y Aguascalientes (B). Al menos una especie de cada género ha sido reportada como portadora de fitoplasmas.

El género *Aceratagallia* estuvo representado por un total de 108 individuos en Zacatecas, y solamente 8 en Aguascalientes con mayor presencia en noviembre y julio, en Zacatecas y Aguascalientes, respectivamente. En un estudio realizado en Texas, se comprobó que *A. abrupta* es un vector potencial de fitoplasmas, donde se le asoció con enfermedades de amarillamiento del áster (Lee *et al.*, 2003). Por otra parte, en Washington y Oregon, se detectó la presencia de fitoplasmas del grupo 16Sr VI (*Clover proliferation*) en individuos de este género (Crosslin *et al.*, 2005). En la región del Altiplano Mexicano, especies del género *Aceratagallia* colectados en Chihuahua y Zacatecas resultaron positivos a la presencia

de fitoplasmas, sin embargo, no se ha identificado el grupo taxonómico al que pertenecen (Mercado *et al.*, 2013).

Dalbulus fue un género representado de manera similar en Zacatecas y en Aguascalientes (159 y 145 respectivamente), con mayor representación durante el mes de mayo en Zacatecas y el mes de abril en Aguascalientes. La especie *D. maidis*, es una de las más importantes debido a su capacidad de transmisión del fitoplasma responsable de la enfermedad MBS (de sus siglas en inglés, *maize bushy stunt*), esta enfermedad ha ocasionado cuantiosas pérdidas en diversos países del continente americano (Junqueira *et al.*, 2004). Múltiples ensayos de transmisión han sido realizados con la finalidad de conocer el complejo sistema y la especificidad que existe entre el insecto *D. maidis*, el fitoplasma responsable de la MBS y su hospedero vegetal (maíz) (Oliveira *et al.*, 2011). La información referente a *Dalbulus* como vector de fitoplasmas en la región Norte Centro del país es escasa, se cuentan con pocos registros de detección del patógeno, como es el caso del estudio realizado por Dávila y colaboradores en 2014, donde sólo 1/14 individuos resultó positivo a la presencia de fitoplasmas.

Por último, el género *Agallia* estuvo representado por 15 individuos colectados en Zacatecas. La presencia de fitoplasmas en especies del género *Agallia* ha sido reportada en diversas partes del mundo; por ejemplo en Brasil, se identificó un fitoplasma del grupo 16Sr III en *A. albidula*, y fue comprobado que este era uno de los insectos responsables de transmitir dicho fitoplasma a plantas de brócoli (Eckstein *et al.*, 2014). En Norte América se realizó un estudio de la distribución espacial de una enfermedad provocada por fitoplasmas en uvas de vino, y se asoció con esta enfermedad a *A. constricta* (Beanland *et al.*, 2006). En el Altiplano Mexicano no existe información referente a detección de fitoplasmas en especies de este género.

En la interacción fitoplasma-vector, existe una alta especificidad entre la región geográfica y el cultivo infectado (Velásquez *et al.*, 2014), son consideradas interacciones complejas y variables dado la secuencia de eventos necesarios para que un insecto adquiriera y posteriormente sea capaz de transmitir el fitoplasma a las plantas, lo que sugiere un alto grado de especificidad entre las especies de insectos y los fitoplasmas que transmiten (Christensen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1998 y Weintraub *et al.*, 2006).

Sin embargo, numerosos fitoplasmas, como las cepas *Aster yellows* (AY) y *Western X-disease* (WX) en Norteamérica, son transmitidos por varias especies de insectos. Tan variable es la transmisión de fitoplasmas, que es importante mencionar el caso de Eslovenia, en donde los psílidos del género *Cacopsylla* presentan una clara asociación con la transmisión de fitoplasmas causantes de varias enfermedades como la proliferación de la manzana (*Candidatus Phytoplasma mali*), decaimiento del peral (*Ca. Phytoplasma pyri*) y los amarillamientos de los frutales de hueso (*Ca. Phytoplasma prunorum*) (Mehle *et al.*, 2011). Mientras que en la enfermedad conocida como amarillamiento de la vid, ocasionada por *Ca. Phytoplasma vitis*, el vector responsable de la transmisión del patógeno es únicamente el cicadélido *Scaphoideus titanus* (Marzorati *et al.*, 2006). Para *Ca. Phytoplasma vitis* los tipos de hospederos (plantas e insectos vectores) son variables y dependen de la cepa de fitoplasma (Music y Skoric, 2013). Algunos fitoplasmas pueden ser transmitidos por un vector polífago para una amplia gama de plantas huésped. Tal es el caso de los fitoplasmas del amarillamiento del aster (grupos 16SrI-A), los cuales son transmitidos por el cicadélido *Macrostelus fascifrons* y otros vectores polípagos a 191 especies de plantas pertenecientes a 42 familias (McCoy *et al.*, 1989). Por lo tanto, la gama de especies vegetales que pueden ser infectadas por un fitoplasma, está determinada en gran medida, por el número de especies de insectos vectores que son capaces de transmitir el fitoplasma y por los comportamientos de alimentación de estos vectores (monófagos, oligófagos y polípagos) (Bosco y Tedeschi, 2013).

6.3 Detección de fitoplasmas en el vector *C. tenellus*

La chicharrita del betabel (*C. tenellus*) es el vector de virus y fitoplasmas de mayor importancia en la región Norte Centro del país, su presencia en la “maleza” invernal destaca la importancia de aplicar medidas de combate que la eliminen previo al establecimiento de cultivos en primavera, como es el caso del Chile. La capacidad con la que cuenta la especie *C. tenellus* en la transmisión de variantes del virus de la punta rizada del betabel así como de fitoplasmas en regiones de Norteamérica y México ha sido ampliamente reportada (Creamer *et al.*, 2003 y Velásquez *et al.* 2008).

En este trabajo fueron analizados para la detección de fitoplasma 236 individuos de *C. tenellus*, colectados en Zacatecas (144) y en Aguascalientes (92). Las muestras positivas representaron un 25% y 15% respectivamente. Los meses en los que hubo mayor incidencia de fitoplasma fueron: junio, con un 67% de detección y agosto, con un 38%, para Zacatecas y Aguascalientes respectivamente (Figura 6AyB).

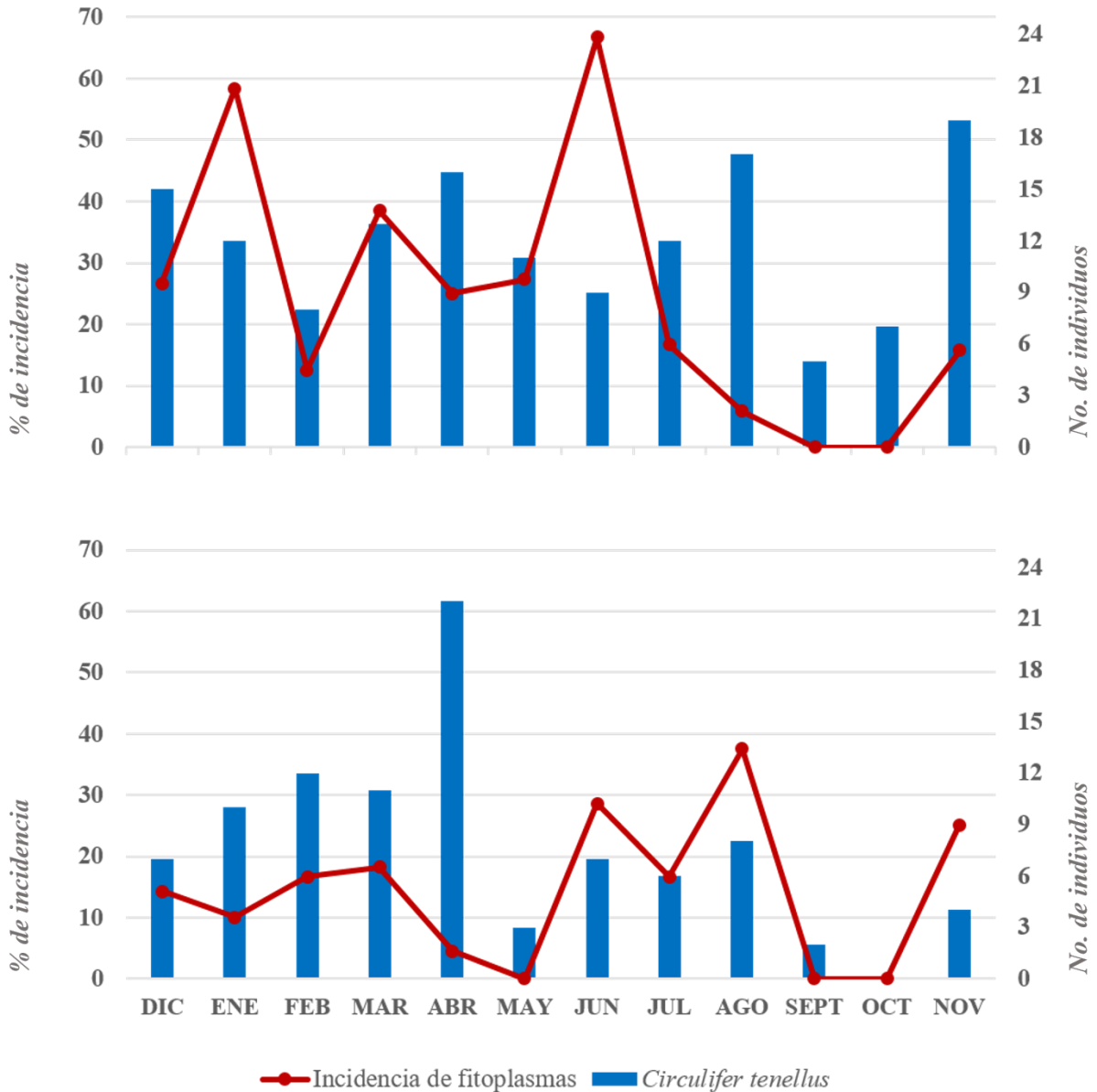


Figura 6. Fluctuación poblacional del insecto vector *Circulifer tenellus* en Zacatecas (A) y Aguascalientes (B); el número de individuos registrado está representado con la gráfica de barras. La detección de fitoplasmas se realizó por PCR anidada y se calculó el porcentaje de incidencia del patógeno representada en línea continua.

Estos individuos se colectaron en presencia de hospederas alternas que se encontraron aledañas a las plantaciones de chile, con lo cual se demuestra que son reservorios de fitoplasmas y que también sirven como sitios de refugio del insecto vector, lo cual coincide con lo propuesto por Velásquez *et al.*, (2012) y Mena *et al.*, (2014). Swisher *et al.* (2017) realizaron la detección de fitoplasmas en *C. tenellus* colectados en regiones cercanas a los sitios de colecta visitados en este estudio. En sus resultados reportaron un 44% de detección en individuos adultos (23/52), por lo que, existe motivo para incrementar las investigaciones asociadas a *C. tenellus* y considerarlo un vector potencial de fitoplasmas en esta región.

Durante el invierno, los fitoplasmas permanecen en el cuerpo de sus vectores, así como en las plantas perennes, ambos organismos fungen como reservorios, y son el origen de propagación en la primavera siguiente. Es de reconocerse la habilidad con la que cuentan los fitoplasmas para invadir sistémicamente y colonizar de manera exitosa dos hospederos tan diferentes, y reproducirse intracelularmente en ambos. Esto es, resultado de un proceso evolutivo de los mecanismos que le permiten a este patógeno modificar y controlar los procesos celulares tanto en plantas como en insectos (Reveles *et al.*, 2015). El desarrollo de investigaciones relacionadas con la detección oportuna de potenciales vectores de virus y fitoplasmas durante la temporada invernal es una importante herramienta que permite desarrollar mejores esquemas de monitoreo de cicadélidos que ayuden a prevenir infestaciones tempranas en cultivos hortícolas de importancia regional como es el caso del chile, la papa, y el jitomate (Mena *et al.*, 2014).

6.4 Detección de fitoplasmas en cultivo de chile tipo mirasol

En la Figura 7A, se muestran los resultados de la detección de fitoplasma en plantas de chile en ambas localidades. En Zacatecas, el porcentaje de detección fue del 19% del total de las plantas analizadas (15/79), respecto a solo el 9% presente en Aguascalientes (6/65). La diferencia en el porcentaje de detección puede estar asociado con la abundancia de especies arvenses, que representan un reservorio del patógeno, permitiéndole así dispersarse desde ahí hasta el cultivo de chile a través de los insectos vectores (e.g. *C. tenellus*). Las estrategias en el manejo del cultivo (e.g. el número de aplicaciones de plaguicidas) también pueden contribuir a explicar las diferencias observadas en la detección de fitoplasmas en chile.

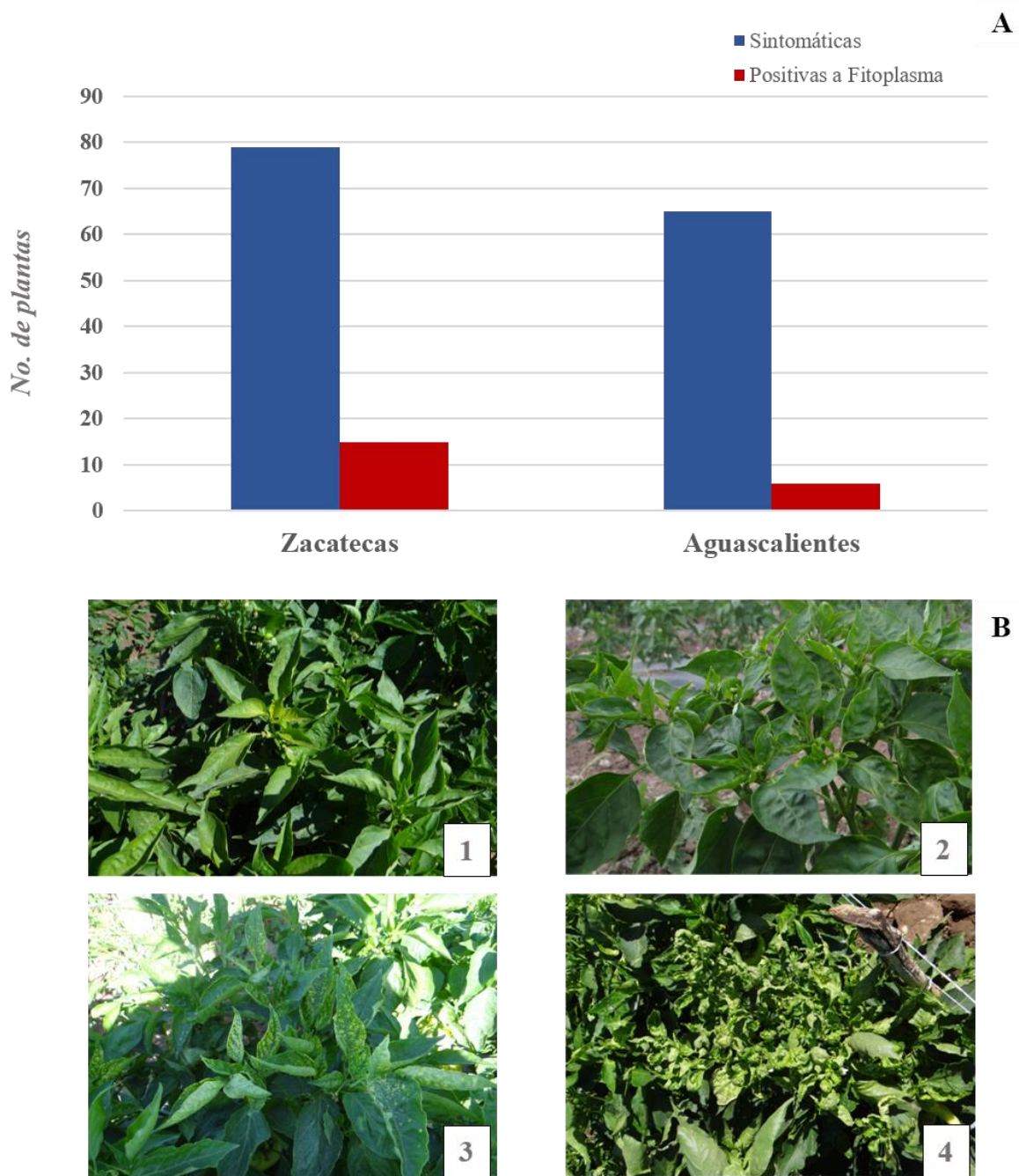


Figura 7. Detección de fitoplasmas en plantas de chile (*C. annuum*) tipo mirasol en Zacatecas y Aguascalientes en plantas con síntomas asociados a este patógeno (1). Los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia fueron: amarillamiento foliar (2A), protuberancias en las láminas foliares (2B), clorosis (2C) y enrollamiento de láminas foliares (2D).

En la localidad de Zacatecas, se llevaron a cabo dos aplicaciones de herbicida a mediados de los meses de mayo y junio; y de insecticida en el mes de mayo, fecha tardía con respecto al paquete tecnológico del cultivo (Medina *et al.*, 2016), lo cual representó un manejo poco tecnificado y con estrategia deficiente. Por su parte, en Aguascalientes, el cultivo se estableció a finales de marzo, y fue a principios de abril, mayo y julio que se realizaron las aplicaciones de herbicida, y de insecticida en los meses de marzo (previo al establecimiento del cultivo), abril y mayo. Estas diferencias también podrían explicar por qué en Zacatecas se encontró un número mayor de *C. tenellus* (Figura 6A).

Los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia en las plantas de chile fueron similares en ambas localidades e incluyen: amarillamiento foliar, protuberancias en las láminas foliares, clorosis y enrollamiento de láminas foliares (Figura 7B). En un estudio realizado en India (principal productor de chile a nivel mundial), fue reportada la presencia de *Ca. Phytoplasma asteris* afectando cultivos de *C. annuum*. Los síntomas que se registraron en plantas positivas a la detección del patógeno fueron: hojas pequeñas, pecíolos y entrenudos acortados, aglomeración de las hojas y retraso del crecimiento de la planta (Khan y Raj, 2006). En Australia, plantas de chile con síntomas de clorosis, hojas pequeñas y filodia, fueron asociadas con el agente causal *Ca. Phytoplasma lycopersici* (16Sr I-Y) (Tran-Nguyen *et al.*, 2003). Para México, existen reportes de diferentes enfermedades en el cultivo de chile que se asocian a fitoplasmas; tal es el caso de los “amarillamientos” reportados en Baja California Sur, donde las plantas presentaron síntomas como hojas cloróticas y deformes, hojas rizadas y entrenudos acortados (Lebsky y Poghosyan, 2007). Santos *et al.*, (2008) asociaron la presencia de síntomas como escoba de bruja y hoja pequeña, en plantas de chile y tomate, cultivadas en Guanajuato y Sinaloa con *Ca. Phytoplasma asteris*. Los síntomas identificados en este trabajo, se asemejan a los reportados por Swisher *et al.*, (2017), en parcelas comerciales de chile en los estados de Durango y Zacatecas, donde las plantas presentaban síntomas como: hojas pequeñas, clorosis, hojas curvadas, retraso del crecimiento de la planta y “brote grande”.

En el caso particular del chile, la probabilidad de que el cultivo adquiriera el patógeno es alta en los meses de febrero, marzo y principios de abril, ya que es cuando la planta se encuentra

más susceptible: en las etapas fenológicas de transplante, establecimiento y crecimiento vegetativo (Velásquez *et al.*, 2013).

6.4 Identificación del grupo taxonómico de los fitoplasmas.

Los productos del PCR anidado obtenidos a partir de muestras fueron clonados y secuenciados. Las secuencias obtenidas a partir de las muestras de *Circulifer tenellus* y *Eruca sativa* (colectadas en Zacatecas) y *Capsicum annuum* y *Chenopodium album* (colectadas en Aguascalientes) fueron comparadas con la base de datos del NCBI y mostraron un alto porcentaje de identidad con la cepa de referencia de *Candidatus Phytoplasma trifolii* (AY390261, número de acceso en GenBank) (Figura 8). Resultados similares se obtuvieron al comparar las secuencias en el iPhyClassifier, donde la clasificación de los fitoplasmas a nivel de grupo y subgrupo se realizó mediante el análisis de las secuencias obtenidas mediante RFLP's *in silico*, mostrando una alta similitud (0.98) con miembros del grupo 16SrVI, subgrupo A (AY390261).

Los primeros reportes sobre la presencia de *Ca. Phytoplasma trifolii* que afectan cultivos de chile y tomate provienen de España y Líbano, en donde se observaron síntomas como proliferación de los tallos y amarillamientos (en chile) y láminas foliares amarillentas o purpúreas, virescencia y proliferación de los tallos (en tomate) (Castro y Romero, 2002; Choueiri *et al.*, 2007). Posteriormente, dicha cepa fue identificada en los estados de Nuevo México y Arizona, en Estados Unidos de América (Randall *et al.*, 2009). Por lo anterior, la presencia de *Ca. Phytoplasma trifolii* en la región productora de chile de México era de esperarse, ya que los estados ubicados en esta zona geográfica se encuentran dentro de la franja del desierto Chihuahuense y en donde además, existían reportes de *C. tenellus* como insecto vector de fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrVI (Mauricio *et al.*, 2015; Munyaneza *et al.*, 2007). La sintomatología observada en Nuevo México fue principalmente enanismo y amarillamiento foliar, mientras que en Arizona solo “yema grande”. En Zacatecas, el primer reporte de *Ca. Phytoplasma trifolii* infectando plantas de chile fue publicado en 2015; las plantas colectadas presentaban síntomas como “yema grande”, amarillamiento y enrollamiento foliar (Mauricio *et al.*, 2015), similares a la sintomatología observada durante este trabajo. Recientemente, en India se publicó el primer reporte de *Ca.*

Phytoplasma trifolii causando la sintomatología de “escoba de bruja” en cultivos de chile (Rao *et al.*, 2017).



Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de DNA. Se alinearon las secuencias de *C. tenellus*, *Capsicum annuum*, *Chenopodium album* y *Eruca sativa* con la secuencia de referencia de *Ca. Phytoplasma trifolii* (AY390261).

En los estudios realizados por Swisher y colaboradores (2017), se analizaron secuencias de DNA que correspondían a *C. annuum* y *C. tenellus*, para determinar a qué grupo de fitoplasmas pertenecían. El resultado indicó que el fitoplasma encontrado en dichos hospederos era miembro del grupo 16Sr VI, subgrupo A, variante beet leafhopper-transmitted virescence agent (BLTVA). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por estos investigadores hasta el nivel de subgrupo. La información sobre las variantes de los subgrupos encontradas en los hospederos ha sido poco estudiada sobre todo en la región Norte Centro de México.

La detección e identificación del agente causal de las enfermedades asociadas con fitoplasmas en el cultivo de chile Mirasol, en Zacatecas y Aguascalientes, facilitan el estudio de la epidemiología de la enfermedad y amplía el conocimiento sobre la diversidad genética de los fitoplasmas presentes en México.

6.5 Influencia de las variables agroclimáticas sobre poblaciones de hospederos de fitoplasmas.

Análisis de componentes principales.

El clima juega un papel preponderante en la adaptación, distribución y productividad de los seres vivos, ya que es uno de los componentes ambientales más determinantes para el desarrollo de los organismos. La información de las variables climáticas y el pronóstico del comportamiento de las mismas, se convierten en parte fundamental para la toma de decisiones en la agricultura moderna debido a que ésta requiere información meteorológica actualizada y precisa para orientar los procesos de producción (Medina *et al.*, 2008).

La interacción de los hospederos de fitoplasmas con los diversos factores abióticos, representan sistemas complejos que deben ser estudiados a profundidad, con la finalidad de conocer el comportamiento de las poblaciones de dichas especies. La disposición presentada en el espacio, la fluctuación poblacional a lo largo del tiempo y la relación con las variables agroclimáticas, son algunos de los atributos que se utilizan como herramientas que permiten establecer medidas estratégicas para la elaboración de programas de control y manejo (Sharov, 1996; Vecco *et al.*, 2015).

Con la finalidad de conocer la influencia de las variables climáticas sobre las poblaciones de hospederos de fitoplasmas (plantas e insectos vectores), se desarrolló un análisis de componentes principales (ACP) con la información registrada en Zacatecas y Aguascalientes. Los resultados alcanzados evidenciaron el número de componentes con el que era posible explicar los porcentajes de variación total con una alta correlación. Para el caso de Zacatecas, fue posible explicar el 65% de la variación con los primeros tres componentes principales (CP1, CP2 y CP3). La tabla de pesos de los componentes, permitió identificar las variables de mayor importancia en cada uno de ellos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Peso de componentes de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Zacatecas.

VARIABLE	PC1	PC2	PC3
VECTORES			
<i>Dalbulus</i> spp.	0.214	0.251	-0.219
<i>Empoasca</i> spp.	0.178	0.225	-0.425
<i>Graminella</i> spp.	0.216	0.124	-0.221
<i>Aceratagallia</i> spp.	0.055	0.011	-0.270
HOSPEDERAS			
<i>Eruca sativa</i>	-0.186	0.057	-0.291
<i>Reseda luteola</i>	-0.018	0.293	-0.303
<i>Salsola tragus</i>	0.100	0.086	-0.151
<i>Sisymbrium irio</i>	0.137	0.145	0.243
<i>Malva parviflora</i>	0.209	-0.259	-0.018
<i>Amaranthus palmeri</i>	0.087	0.053	0.359
CLIMA			
Unidades Calor	0.335	-0.094	-0.103
Radiación Global	0.335	0.086	0.066
Humedad Relativa	-0.070	-0.469	-0.067
Temperatura máxima	0.311	-0.122	-0.087
Temperatura mínima	0.308	-0.181	0.016
Precipitación total	0.194	-0.358	0.094
Velocidad del viento máxima	-0.236	0.059	0.031
Evapotranspiración Potencial	-0.112	-0.419	-0.251
Evapotranspiración de Referencia	0.337	0.071	0.075

En el Cuadro 5, se presentan los valores y vectores propios de la matriz de correlación de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Zacatecas, dichos valores permiten verificar la aportación a la explicación de la varianza observada.

Cuadro 5. Valores y vectores propios de la matriz de correlación de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Zacatecas.

Valor propio	8.2467	4.0166	2.1072	1.6852	1.5500	0.8540	0.7322	0.6503
Proporción	0.393	0.191	0.100	0.080	0.074	0.041	0.035	0.031
Acumulada	0.393	0.584	0.684	0.765	0.838	0.879	0.914	0.945
Valor propio	0.3892	0.2983	0.1660	0.1615	0.0768	0.0661	0.0000	0.0000
Proporción	0.019	0.014	0.008	0.008	0.004	0.003	0.000	0.000
Acumulada	0.963	0.978	0.986	0.993	0.997	1.000	1.000	1.000
Valor propio	0.0000	0.0000	-0.0000	-0.0000	-0.0000			
Proporción	0.000	0.000	-0.000	-0.000	-0.000			
Acumulada	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			

CP1 explica el 39.3% de la variabilidad total y asigna el mayor peso a las variables: Evapotranspiración de referencia (ET_o), Unidades Calor (UC) y Temperatura (T). Este CP fue denominado “Temperatura”, ya que todas las variables de mayor peso agrupadas en él están asociadas con dicho factor. Además, el factor temperatura está estrechamente relacionado con el ciclo biológico de los organismos (insectos-plantas). CP2 explica el 19% de la variabilidad total, y asigna el mayor peso a las variables: Humedad relativa (HR-correlación negativa), Precipitación total (P-correlación negativa) y Evapotranspiración potencial (ET_p-correlación negativa). A éste CP se le denominó “Humedad”; si bien los pesos máximos fueron determinados en las variables mencionadas, todas ellas presentaron una correlación negativa, por lo que en términos de manejo deberá establecerse un plan de control de hospederos cuando exista un porcentaje bajo de humedad y precipitación. El CP3 explica el 10% de la variabilidad total, y asigna el mayor peso a las variables: Vectores *Empoasca* spp. (correlación negativa), velocidad del viento máxima (V_{Vmáx.}) y hospedera vegetal *Amaranthus palmeri*. Para este caso, el componente fue denominado “Hospederos”; los individuos del género *Empoasca* presentaron una correlación negativa, por lo que se infiere que las poblaciones de estos insectos se ven limitadas ante la presencia de viento y de poblaciones del hospedero vegetal *A. palmeri*. Esto puede deberse a una poca preferencia hacia esta especie vegetal.

Para el caso de Aguascalientes, fue posible explicar el 66% de la variación con los primeros tres componentes principales (CP1, CP2 y CP3). La tabla de pesos de los componentes, permitió identificar las variables de mayor importancia en cada uno de ellos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Peso de componentes de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Aguascalientes.

VARIABLE	PC1	PC2	PC3
VECTORES			
<i>Dalbulus</i> spp.	0.080	-0.137	-0.082
<i>Empoasca</i> spp.	0.156	-0.262	0.068
<i>Circulifer</i> spp.	-0.082	-0.106	0.273
<i>Graminella</i> spp.	0.184	-0.069	0.128
<i>Aceratagallia</i> spp.	0.142	0.128	0.291
HOSPEDERAS			
<i>Reseda luteola</i>	-0.039	-0.274	-0.350
<i>Malva parviflora</i>	-0.215	-0.091	-0.197
<i>Chenopodium album</i>	-0.187	-0.128	0.397
<i>Lepidium virginicum</i>	0.162	0.127	0.163
<i>Raphanus raphanistrum</i>	0.081	-0.079	0.567
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	-0.097	0.129	0.260
CLIMA			
Unidades Calor	0.339	0.118	-0.047
Radiación Global	0.301	-0.182	-0.108
Humedad Relativa	-0.091	0.417	-0.065
Temperatura máxima	0.336	0.116	0.029
Temperatura mínima	0.317	0.198	0.022
Precipitación total	0.191	0.319	-0.143
Velocidad del viento máxima	0.154	-0.350	-0.074
Evapotranspiración Potencial	-0.026	0.366	-0.169
Evapotranspiración de Referencia	0.347	-0.122	-0.031

En el Cuadro 7, se presentan los valores y vectores propios de la matriz de correlación de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Aguascalientes, dichos valores permiten verificar la aportación a la explicación de la varianza observada.

Cuadro 7. Valores y vectores propios de la matriz de correlación de las variables vectores-hospederas-clima registradas en Aguascalientes.

Valor propio	7.4833	4.9839	2.1010	1.8457	1.6061	1.2026	0.7607	0.5516
Proporción	0.340	0.227	0.095	0.084	0.073	0.055	0.035	0.025
Acumulada	0.340	0.567	0.662	0.746	0.819	0.874	0.908	0.933
Valor propio	0.4154	0.3696	0.2311	0.1818	0.1494	0.0642	0.0534	0.0000
Proporción	0.019	0.017	0.011	0.008	0.007	0.003	0.002	0.000
Acumulada	0.952	0.969	0.980	0.988	0.995	0.998	1.000	1.000
Valor propio	0.0000	0.0000	0.0000	-0.0000	-0.0000	-0.0000		
Proporción	0.000	0.000	0.000	-0.000	-0.000	-0.000		
Acumulada	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		

CP1 explica el 34% de la variabilidad total y asigna el mayor peso a las variables: ETo, UC y T. Al igual que en Zacatecas, CP1 fue denominado “Temperatura” por estar conformado por las mismas variables, reconociendo la importancia de la temperatura sobre el desarrollo de las poblaciones de hospederos de fitoplasmas. CP2 explica el 22% de la variabilidad total y asigna el mayor peso a las variables: HR, Etp y VVmáx. (correlación negativa). Este componente fue denominado “Humedad”, y se infiere que ante la presencia de variables asociadas a ese factor, la actividad de los vectores disminuye de manera considerable. Otro factor que también influye de manera negativa en la actividad de los insectos es la velocidad del viento, a mayor velocidad del viento menor cantidad de insectos activos. El CP3 explica el 9% de la variabilidad total y asigna el mayor peso a las variables: *Chenopodium album*, *Reseda luteola* (correlación negativa) y *Aceratagallia* spp. El componente fue denominado “Hospederos”; su interpretación indica que las poblaciones de *R. luteola* disminuyen ante la presencia de *C. album* quién a su vez favorece la presencia de individuos del género *Aceratagallia*. Conocer el comportamiento de diversas especies de vectores y asociarla con la presencia de las especies vegetales (preferencia de hospederos) es una herramienta que puede ser utilizada para la elaboración de planes de manejo.

Análisis de conglomerados jerárquicos

Con base en los resultados obtenidos en el ACP, se realizó el análisis de conglomerados jerárquicos (*Clúster*). Esta herramienta logró agrupar las variables de acuerdo a la similitud entre cada una de ellas, y fue bajo este criterio que los grupos fueron conformados de la manera más homogénea posible.

En la figura 9, se muestran los resultados del análisis de conglomerados jerárquicos para los factores insectos-clima y plantas-clima de las variables registradas en Zacatecas. La asociación entre las especies de los géneros de cicadélidos y los factores agroclimáticos permite diferenciar dos clúster; el primer clúster a su vez está representado por dos grupos; siendo el primero temperatura, radiación, unidades calor, precipitación y viento y el segundo los géneros *Circulifer* y *Aceratagallia*. El segundo clúster está representado también por dos grupos; uno donde se encuentran las variables humedad relativa y evapotranspiración y otro con los insectos de los géneros *Graminella*, *Empoasca* y *Dalbulus* (Figura 9A).

La asociación entre las especies vegetales (hospederas alternas) y los factores agroclimáticos se muestra en la Figura 9B. En el dendograma es posible diferenciar dos clúster; el primero representado a su vez por dos grupos; uno con las variables temperatura, radiación, unidades calor y *E. sativa*; y otro con las variables viento, precipitación, *S. tragus* y *M. parviflora*. El segundo clúster está representado por dos grupos; uno donde se encuentran las especies *A. palmeri* y *S. irio* y otro donde se agrupan la especie *R. luteola* y las variables humedad y evapotranspiración.

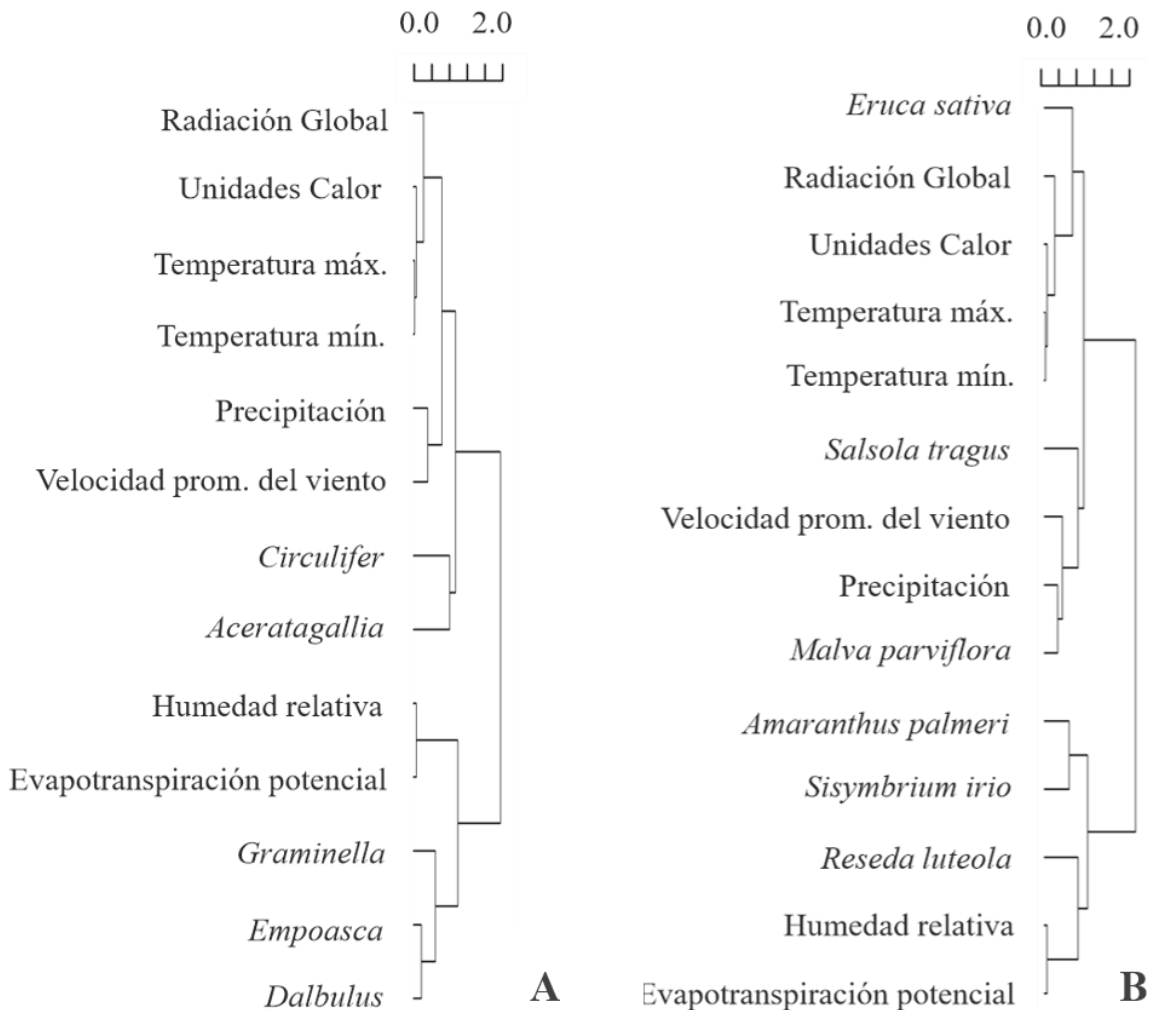


Figura 9. Análisis Clúster de las variables insectos-clima (A) y plantas-clima (B) registradas en Zacatecas durante el periodo diciembre del 2015 a noviembre del 2016.

Con la agrupación de las unidades registradas en Zacatecas, es posible inferir que la presencia de poblaciones de los géneros *Circulifer* y *Aceratagallia* y de las especies vegetales *E. sativa*, *S. tragus* y *M. parviflora* depende de expresiones de calor, lluvia y viento. Por su parte, *Graminella*, *Empoasca* y *Dalbulus* y las especies vegetales *A. palmeri*, *S. irio* y *R. luteola* dependen más de condiciones de humedad relativa.

Los resultados del análisis de conglomerados jerárquicos para los factores insectos-clima y plantas-clima de las variables registradas en Aguascalientes revelan una asociación entre las especies de los géneros de cicadélidos y los factores agroclimáticos donde es posible diferenciar dos clústers. El primer clúster representado por un solo grupo conformado por las variables temperatura, unidades calor y el género *Aceratagallia*; el segundo clúster representado por dos grupos; uno que agrupa las variables viento, radiación, evapotranspiración y los géneros *Circulifer* y *Dalbulus*; y otro representado por las variables precipitación, humedad relativa, evapotranspiración potencial y los géneros *Empoasca* y *Graminella* (Figura 10A).

La Figura 10B explica la asociación entre las especies vegetales y los factores agroclimáticos en Aguascalientes. En el dendograma es posible diferenciar dos clúster; el primero representado por dos grupos; uno que agrupa las variables temperatura, unidades calor y *C. album*; y otro que agrupa las variables *C. bursa-pastoris*, *M. parviflora* y *R. luteola*. El segundo clúster está representado por dos grupos; uno donde se encuentran las variables viento, radiación y evapotranspiración y otro donde se agrupan las variables precipitación, humedad, evapotranspiración potencial y las especies *L. virginicum* y *R. raphanistrum*. Con la agrupación de las unidades registradas en Aguascalientes, es posible inferir que la presencia de poblaciones del género *Aceratagallia* y de las especies vegetales *C. album*, *C. bursa-pastoris*, *M. parviflora* y *R. luteola* dependen de expresiones de calor. Por su parte, *Circulifer* y *Dalbulus* son géneros que se ven favorecidos por la presencia de viento, radiación y evapotranspiración de referencia. Mientras que los géneros *Empoasca* y *Graminella* así como las especies vegetales *L. virginicum* y *R. raphanistrum* dependen más de condiciones de humedad relativa.

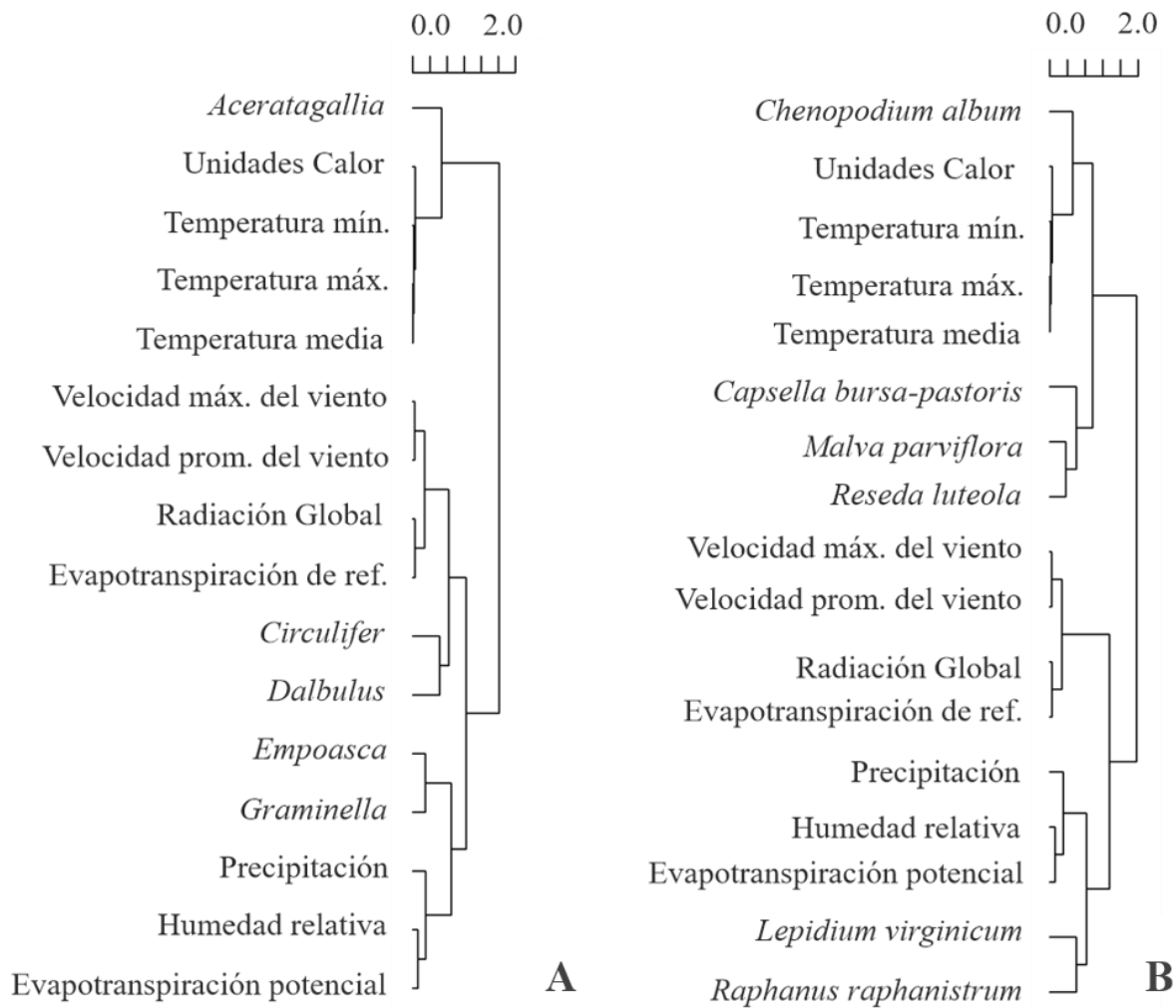


Figura 10. Análisis Clúster de las variables insectos-clima (A) y plantas-clima (B) registradas en Aguascalientes durante el periodo diciembre del 2015 a noviembre del 2016.

8. CONCLUSIONES

- 1) Se identificaron 11 géneros de la familia Cicadellidae, destacando los géneros *Circulifer*, *Empoasca*, *Graminella*, *Aceratagallia*, *Dalbulus* y *Agallia*, donde se incluyen especies vectores de virus y fitoplasma.
- 2) Seis especies de plantas hospederas fueron identificadas en ambas localidades, siendo *Eruca sativa*, *Reseda luteola* y *Sisymbrium irio* las especies más frecuentes en Zacatecas y *Chenopodium album*, *Capsella bursa-pastoris* y *Reseda luteola* en Aguascalientes.
- 3) Se detectó la presencia de fitoplasma en los tres componentes del patosistema. En Zacatecas los porcentajes de detección fueron: 19% en el cultivo de chile, 25% en el insecto vector *Circulifer tenellus* y 31% en las plantas hospederas alternas, mientras que en Aguascalientes, los porcentajes fueron 9%, 15% y 26%, respectivamente.
- 4) La especie arvense con mayor detección de fitoplasma fue *Eruca sativa* en Zacatecas y *Chenopodium album* en Aguascalientes.
- 5) El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida a partir de muestras de *Circulifer tenellus* y *Eruca sativa* (colectadas en Zacatecas) y *Capsicum annuum* y *Chenopodium album* (colectadas en Aguascalientes) clasificó el fitoplasma de interés, con miembros del grupo 16SrVI, subgrupo A, *Candidatus Phytoplasma Trifolii* (AY390261).

9. LITERATURA CITADA

- Abrajan-del Rio, X., Reveles-Torres, L. R., Velásquez-Valle, R., Reveles-Hernández, M., & Cid-Rios, J. Á. (2014). Presencia de fitoplasmas en el cicadélido *Circulifer tenellus* en el estado de Zacatecas, México. *Agrofaz*, 14(3).
- Acosta, K. I., Zamora, L., Piñol, B., Quiñones, M. L., Ramos, P. L., Luis, M., . . . Arocha, Y. (2017). *Empoasca papayae* Oman, 1937 (Hemiptera: Cicadellidae) the simultaneous vector of phytoplasmas and rickettsia associated with “*Bunchy Top Symptom*” in Cuba. Paper presented at the *Annual Review of Biology*.
- Aguirre-Márquez, G., Reveles-Torres, L. R., Velásquez-Valle, R., & Amador-Ramírez, M. D. Presencia de fitoplasmas en maleza de Aguascalientes y Zacatecas. *Agrofaz*.
- Almeyda, L., Sánchez, S., Rubio, C., Ramos, V., & Rocha, M. (2002). Detección molecular de fitoplasma en insectos y malezas asociados al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*). Paper presented at the Memoria del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resumen.
- Andersen, M. T., & Liefting, L. W. (2013). Phytoplasma plasmid DNA extraction. *Methods Mol Biol*, 938, 371-379. doi: 10.1007/978-1-62703-089-2_31.
- Andreasen, C., & Stryhn, H. (2008). Increasing weed flora in Danish arable fields and its importance for biodiversity. *Weed research*, 48(1), 1-9.
- Aredondo-Pérez, A., Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., 2013. Presencia de fitoplasmas asociados al síntoma de “yema grande” en chile para secado en Zacatecas, México. *Agrofaz* 13, 61-69.
- Arismendi, N., Andrade, N., Riegel, R., & Carrillo, R. (2010). Presence of a phytoplasma associated with witches' broom disease in *Ugni molinae* Turcz and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR, and DNA sequencing. *Chil J Agric Res*, 70, 26-33.
- Arismendi, N. L., Riegel, R., & Carrillo, R. (2014). In vivo transmission of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' by *Amplipcephalus curtulus* (Hemiptera: Cicadellidae) and its effect on ryegrass (*Lolium multiflorum* cv. *tama*). *J Econ Entomol*, 107(1), 83-91.
- Arocha, Y., Lopez, M., Pinol, B., Fernandez, M., Picornell, B., Almeida, R., . . . Jones, P. (2005). ‘Candidatus Phytoplasma graminis’ and ‘Candidatus Phytoplasma caricae’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in

- Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6), 2451-2463.
- Arocha, Y., Antesana, O., Montellano, E., Franco, P., Plata, G., & Jones, P. (2007). 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil' disease in Bolivia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 8), 1704-1710. doi: 10.1099/ijs.0.64851-0.
- Avelar, M., & Marban, M. (1989). Intentos de control de la marchitez del chile ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de Valsequillo, Puebla. Paper presented at the Memorias XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Montecillo, Edo. de México, México. Resumen.
- Azadvar, M., Baranwal, V. K., & Yadava, D. (2011). Transmission and detection of toria [*Brassica rapa* L. subsp. *dichotoma* (Roxb.)] phyllody phytoplasma and identification of a potential vector. *Journal of General Plant Pathology*, 77(3), 194.
- Bai, x. (2004). Insect transmitted plant pathogenic mollicutes, *Spiroplasma kunkelii* and *aster yellows witches'-broom phytoplasma*: from structural genomics to functional genomics. (Ph.D. Graduate School of USA), The Ohio State University.
- Bai, X., Correa, V. R., Toruno, T. Y., Ammar el, D., Kamoun, S., & Hogenhout, S. A. (2009). AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol Plant Microbe Interact*, 22(1), 18-30. doi: 10.1094/MPMI-22-1-0018.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., . . . Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol*, 188(10), 3682-3696. doi: 10.1128/JB.188.10.3682-3696.2006.
- Ball, B., Bingham, I., Rees, R., Watson, C., & Litterick, A. (2005). The role of crop rotations in determining soil structure and crop growth conditions. *Canadian Journal of Soil Science*, 85(5), 557-577.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12, 673-689.

- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5(12), 1763.
- Bonham, C. D. (2013). *Measurements for terrestrial vegetation*: John Wiley & Sons.
- Bosco, D., Galetto, L., Leoncini, P., Saracco, P., Raccah, B., & Marzachi, C. (2007). Interrelationships between "*Candidatus* Phytoplasma asteris" and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). *J Econ Entomol*, 100(5), 1504-1511.
- Bosco, D., & Tedeschi, R. (2013). Insect vector transmission assays Phytoplasma (pp. 73-85): *Springer*.
- Bressan, A., Clair, D., Semetey, O., & Boudon-Padieu, E. (2006). Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of *flavescence doree* phytoplasma. *Phytopathology*, 96(7), 790-796. doi: 10.1094/PHYTO-96-0790.
- Brown, D., & Bradbury, J. (2008). International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2987-2990.
- Carreño, N., Vargas, Á., Bernal, A. J., & Restrepo, S. (2007). Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 25(2).
- Castro, S., & Romero, J. (2002). The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *Journal of Phytopathology*, 150(1), 25-29.
- Ceñis, J. L., Perez, P., y Fereres, A. (1993). Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America*, 86(5), 545-550.
- Chang, C. J. (1998). Pathogenicity of Aster Yellows Phytoplasma and *Spiroplasma citri* on Periwinkle. *Phytopathology*, 88(12), 1347-1350. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.12.1347.

- Chew, M., Vega, P., Palomo, R., & Jiménez, D. (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). INIFAP-Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental, La Laguna. México, DF. Folleto Técnico(153), 2.
- Choueiri, E., Salar, P., Jreijiri, F., El Zammar, S., Massaad, R., Abdul-Nour, H., . . . Foissac, X. (2007). Occurrence and distribution of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon. *European Journal of Plant Pathology*, 118(4), 411-416.
- Christensen, N. M., Nyskjold, H., & Nicolaisen, M. (2013). Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. *Methods Mol Biol*, 938, 245-252. doi: 10.1007/978-1-62703-089-2_21.
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526-535.
- Creamer, R., Carpenter, J., & Rascon, J. (2003). Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico chile. *Southwestern Entomologist*.
- Dávila-Berúmen, F., Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., & Mauricio-Castillo, J. A. (2014). Detección de fitoplasmas en poblaciones de *Dalbulus*, *Empoasca*, *Graminella* y *Aceratagallia* presentes en el estado de Zacatecas. *Agrofaz*, 14(3).
- Davis, R., & Sinclair, W. (1998). Phytoplasma Identity and Disease Etiology. *Phytopathology*, 88, 1372-1376.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Jomantiene, R., Lee, I. M., Wei, W., & Kitajima, E. W. (2012). 'Candidatus Phytoplasma sudamericanum', a novel taxon, and strain *PassWB-Br4*, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(Pt 4), 984-989. doi: 10.1099/ijs.0.033423-0.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Lee, I. M., Jomantiene, R., & Douglas, S. M. (2013). 'Candidatus Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 2), 766-776. doi: 10.1099/ijs.0.041202-0.

- Dawkins, R. (2016). *The extended phenotype: The long reach of the gene*: Oxford University Press.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, *1*(4), 19-21.
- Dickinson, M., & Hodgetts, J. (2012). *Phytoplasma: Methods and Protocols*: Humana Press.
- Dickinson, M., & Hodgetts, J. (2013). PCR analysis of phytoplasmas based on the secA gene. *Phytoplasma: Methods and Protocols*, 205-215.
- Dietrich, C. (2005). Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist*, *88*(4), 502-517.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., & Asuyama, H. (1967). Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, *33*(1967), 259-266.
- Duduk, B., & Bertaccini, A. (2011). Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough. *Phytopathogenic Mollicutes*, *1*(1), 3-13.
- Duffus, J. E. (1971). Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annu Rev Phytopathol*, *9*(1), 319-340.
- Firrao, G., Gibb, K., & Streten, C. (2005). Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus* Phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology*, 249-263.
- Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U., & Ye, F. (1998). The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology*, *88*(12), 1351-1358.
- Fránová, J., Ludvíková, H., Paprštejn, F., & Bertaccini, A. (2013). Genetic diversity of Czech '*Candidatus* Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology*, *136*(4), 675-688.
- Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M., & Ishimoto, Y. (2003). Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch Virol*, *148*(9), 1713-1720.

- Galetto, L., Siampour, M., & Marzachi, C. (2013). Preparation of phytoplasma membrane recombinant proteins. *Methods Mol Biol*, 938, 351-369. doi: 10.1007/978-1-62703-089-2_30.
- Garzón Tiznado, J. A., Acosta García, G., Torres Pacheco, I., González Chavira, M., Rivera Bustamante, R. F., Maya Hernández, V., & Guevara González, R. G. (2002). Presencia de los geminivirus, huasteco del chile (PHV), texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T), y chino del tomate (VCdT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1).
- Gould, S. J., & Lewontin, R. C. (1979). The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 205(1161), 581-598.
- Guigón López, C., & González González, P. A. (2001). Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum*, L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1).
- Gundersen, D., & Lee, I. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35(3), 144-151.
- Gundersen, D., Lee, M., Davis, R., & Kingsbury, D. (1994). Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5244-5254.
- Gundersen, D. E., Lee, I. M., Schaff, D. A., Harrison, N. A., Chang, C. J., Davis, R. E., & Kingsbury, D. T. (1996). Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol*, 46(1), 64-75.
- Gundersen, D., Lee, M., Davis, R., & Kingsbury, D. (1994). Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5244-5254.

- Harrison, N., Cordova, I., Richardson, P., & Dibonito, R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing Current advances in coconut biotechnology (pp. 183-196): *Springer*.
- Harrison, N. A., Davis, R. E., Oropeza, C., Helmick, E. E., Narvaez, M., Eden-Green, S., . . . Dickinson, M. (2014). ‘*Candidatus Phytoplasma palmicola*’, associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(6), 1890-1899.
- Hernández, E.G. (2015). Maleza de invierno como hospederas de virus, fitoplasmas y sus vectores relacionados al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Zacatecas “Francisco García Salinas”. Zacatecas, México.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N., & Dickinson, M. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘*Candidatus Phytoplasma*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(8), 1826-1837.
- Hodgetts, J., Tomlinson, J., Boonham, N., González-Martín, I., Nikolić, P., Swarbrick, P., . . . Dickinson, M. (2011). Development of rapid in-field loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement).
- Hogenhout, S. A., & Loria, R. (2008). Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 449-456.
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular plant pathology*, 9(4), 403-423.
- IRPCM (2004). ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1243–1255.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(2), 115-122. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>.

- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., . . . Namba, S. (2004). Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(1), 135-142.
- Khan, M., & Raj, S. (2006). First report of molecular detection of an Aster yellows phytoplasma ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') isolate infecting chilli (*Capsicum annuum*) in India. *Plant Pathology*, 55(6), 822-822.
- Kakizawa, S., Oshima, K., & Namba, S. (2006). Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol*, 14(6), 254-256.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., . . . Namba, S. (2004). Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(1), 135-142.
- Kogovšek, P., Hodgetts, J., Hall, J., Prezelj, N., Nikolić, P., Mehle, N., . . . Boonham, N. (2015). LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of *flavescence dorée* phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 64(2), 286-296.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., & Seemuller, E. (2012). Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *ScientificWorldJournal*, 2012, 185942. doi: 10.1100/2012/185942.
- Le Fevre, R., Evangelisti, E., Rey, T., & Schornack, S. (2015). Modulation of host cell biology by plant pathogenic microbes. *Annual review of cell and developmental biology*, 31, 201-229.
- Lebsky, V., Hernandez-Gonzalez, J., Arguello-Astorga, G., Cardenas-Conejo, Y., Poghosyan, A., Bertaccini, A., & Maini, S. (2011). Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement).
- Lebsky, V., & Poghosyan, A. (2007). Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, Mexico: a brief overview. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 131.

- Lee, I.M., & Davis, R. (1992). Mycoplasmas which infect plants and insects. *American society for microbiology, washington, dc(usa)*. 379-390.
- Lee, I.M., Davis, R. E., & Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 221-255.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D. E., & Bertaccini, A. (1998). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88(12), 1359-1366.
- Lee, I. M., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Villalobos, W., & Moreira, L. (2011). 'Candidatus Phytoplasma costaricanum' a novel phytoplasma associated with an emerging disease in soybean (*Glycine max*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(Pt 12), 2822-2826. doi: 10.1099/ij.s.0.029041-0.
- Lee, I.-M., Martini, M., Bottner, K., Dane, R., Black, M., & Troxclair, N. (2003). Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, 93(11), 1368-1377.
- Lee, M., Gundersen, D., Davis, R., & Bartoszy, I. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1153–1169.
- López-Romo, G., Reveles-Torres, L. R., Velásquez-Valle, R., Salas-Muñoz, S., & Mauricio-Castillo, J. A. (2014). Transmisión de fitoplasmas por el vector *Circulifer tenellus* en diferentes hospederos vegetales. *Agrofaz*, 14(3).
- Lough, T. J., & Lucas, W. J. (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 203-232.
- López-Romo, G., Reveles-Torres, L. R., Velásquez-Valle, R., Salas-Muñoz, S., & Mauricio-Castillo, J. A. (2014). Transmisión de fitoplasmas por el vector *Circulifer tenellus* en diferentes hospederos. *Agrofaz*, 14(3).
- MacLean, A. M., Orlovskis, Z., Kowitwanich, K., Zdziarska, A. M., Angenent, G. C., Immink, R. G., & Hogenhout, S. A. (2014). Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS biology*, 12(4), e1001835.

- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., . . . Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol*, 157(2), 831-841.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A., & Nicolaisen, M. (2012). DNA barcoding for identification of 'Candidatus Phytoplasmas' using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS One*, 7(12), e52092. doi: 10.1371/journal.pone.0052092.
- Mardi, M., Khayam Nekouei, S.M., Karimi Farsad, L., Ehya, F., Shabani, M., Shafiee, M., Tabatabaei, M., Safarnejad, M.R., Jouzani, G.S. and Salekdeh, G.H. (2011). *Witches' Broom* Disease of Mexican Lime Trees: Disaster to Be Addressed before It Will Be Too Late. *Bulletin of Insectology*, 64, S205-S206.
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Uratsu, S. L., Phu, M. L., Albrecht, U., Zhao, W., . . . Dandekar, A. M. (2013). Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *PLoS One*, 8(9), e74256.
- Marshall, E., Brown, V., Boatman, N., Lutman, P., Squire, G., & Ward, L. (2003). The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. *Weed research*, 43(2), 77-89.
- Marzachi, C., Milne, R., Bosco, D., & Pandalai, S. (2004). Phytoplasma-plant-vector relationships. *Recent research developments in plant pathology*, Vol. 3, 211-241.
- Marzorati, M., Alma, A., Sacchi, L., Pajoro, M., Palermo, S., Brusetti, L., . . . Clementi, E. (2006). A novel Bacteroidetes symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of *flavescence dorée* in *Vitis vinifera*. *Appl Environ Microbiol*, 72(2), 1467-1475.
- McCoy, R., Caudwell, A., Chang, C., Chen, T.-A., & Chiykowski, L. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In J. Tully (Ed.), *The Mycoplasmas* (pp. 545–560). New York: Academic.
- Medina-García, G., Zegbe-Domínguez, J.A., Reveles-Hernández, M., Mena-Covarrubias, J., Reveles-Torres, L.R., Echavarría-Chairez, F.G., (2016). Tecnología para la

- producción de cultivos en el área de influencia del Campo Experimental Zacatecas. INIFAP-SAGARPA, Zacatecas. México.
- Mehle, N., Rupar, M., Seljak, G., Ravnikar, M., & Dermastia, M. (2011). Molecular diversity of 'flavescence dorée' phytoplasma strains in Slovenia. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement).
- Mena-Covarrubias, J. (2014). Insectos vectores de virus y fitoplasmas en el cultivo de chile en México. *Virus y fitoplasmas de chile: una perspectiva regional*, 129.
- Mercado-Arteaga, N. V., Velásquez-Valle, R., & Reveles-Torres, L. R. (2013). Presencia de fitoplasmas en adultos de *Aceratagallia* spp. y plantas de *Chenopodium* spp. en Zacatecas y Chihuahua, México. *Agrofaz*, 13(3).
- Mitchell, P. L. (2004). Heteroptera as vectors of plant pathogens. *Neotropical entomology*, 33(5), 519-545.
- Montano, H. G., Davis, R. E., Dally, E. L., Hogenhout, S., Pimentel, J. P., & Brioso, P. S. (2001). '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 3), 1109-1118.
- Munyanza, J., Crosslin, J., & Upton, J. (2006). Beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. *Journal of Economic Entomology*, 99(2), 268-272.
- Munyanza, J. E., Crosslin, J. M., & Lee, I. (2007). Phytoplasma diseases and insect vectors in potatoes of the Pacific Northwest of the United States. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 181.
- Munyanza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. (2010). Association of "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" with the psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1060-1070.
- Musetti, R., di Toppi, L. S., Ermacora, P., & Favali, M. A. (2004). Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, 94(2), 203-208. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.2.203.

- Musić, M. Š., & Škorić, D. (2013). Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for Differentiating Phytoplasma Strains. *Phytoplasma: Methods and Protocols*, 217-222.
- Nations, F. a. A. O. o. t. U. (2008).
- Nault, L. (1980). Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*, 70(7), 659-662.
- Nault, L., DeLong, D., Triplehorn, B., Styer, W., & Doebley, J. (1983). More on the association of Dalbulus (Homoptera: Cicadellidae) with Mexican *Tripsacum* (Poaceae), including the description of two new species of leafhoppers. *Annals of the Entomological Society of America*, 76(2), 305-309.
- Nejat, N., Vadamalai, G., Davis, R. E., Harrison, N. A., Sijam, K., Dickinson, M., . . . Zhao, Y. (2013). 'Candidatus Phytoplasma malaysianum', a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 2), 540-548. doi: 10.1099/ijs.0.041467-0.
- Nishigawa, H., Miyata, S.-i., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., Kuboyama, T., . . . Namba, S. (2001). In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*, 147, 507-513.
- Orlovskis, Z., & Hogenhout, S. A. (2016). A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. *Frontiers in plant science*, 7.
- Özbek, E., Miller, S. A., Meulia, T., & Hogenhout, S. A. (2003). Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *J Invertebr Pathol*, 82, 167-175.
- Paltrinieri, S., Contaldo, N., Nicolaisen, M., & Bertaccini, A. (2015). Phytoplasma strain collections: the Q-Bank database and the Q-collect project. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1s), S33-S34.
- Patui, S., Bertolini, A., Clincon, L., Ermacora, P., Braidot, E., Vianello, A., & Zancani, M. (2012). Involvement of plasma membrane peroxidases and oxylipin pathway in the

- recovery from phytoplasma disease in apple (*Malus domestica*). *Physiol Plant*. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01708.x.
- Pérez-López, E., Luna-Rodríguez, M., Olivier, C. Y., & Dumonceaux, T. J. (2016). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 492-513.
- Perilla Henao, L. M. (2013). Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de Bogotá DC. Universidad Nacional de Colombia.
- Poghosyan, A., Lebsky, V., Arce-Montoya, M., & Landa, L. (2004). Possible phytoplasma disease in papaya (*Carica papaya* L.) from Baja California Sur: diagnosis by scanning electron microscopy. *Journal of Phytopathology*, 152(6), 376-380.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W., & Davis, R. E. (2013). 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijms.0.044750-0
- Randall, J., Bosland, P., & Hanson, S. (2009). Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of chile peppers. *Plant Disease*, 93(9), 968-968.
- Rao, G. P., Thorat, V., Manimekalai, R., Tiwari, A. K., & Yadav, A. (2017). A century progress of research on phytoplasma diseases in India. *Phytopathogenic Mollicutes*, 7(1), 1-38.
- Rashidi, M., Galetto, L., Bosco, D., Bulgarelli, A., Vallino, M., Veratti, F., & Marzachi, C. (2015). Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. *BMC microbiology*, 15(1), 193.
- Razin, S. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology*, 62, 1094–1156.
- Reveles-Torres L.R., Velásquez-Valle, R., y Mauricio-Castillo, J.A. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. Folleto Técnico Núm 56. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 41 páginas.

- Ruiz, N.R. 1994. Efecto del color de acolchado y cintas reflejantes sobre insectos vectores de virus y el desarrollo fenológico del chile serrano (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 90 p.
- Safarova, D., Valova, P., Flidr, P., & Navratil, M. (2011). Molecular identification of 16SrIII and 16SrXII phytoplasma groups in *Chenopodium album* in Czech Republic. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement).
- Santos-Cervantes, M. E., Chávez-Medina, J. A., Méndez-Lozano, J., & Leyva-López, N. E. (2008). Detection and Molecular Characterization of Two Little Leaf Phytoplasma Strains Associated with Pepper and Tomato Diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, 92(7), 1007-1011. doi: 10.1094/pdis-92-7-1007.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., & Göschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Plant Pathology*, 80(1), 3-26.
- Seemuller, E., schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., (1994). Phylogenetic Classification of Phytopathogenic Mollicutes by Sequence Analysis of 16s Ribosomal DNA. *Sistematic Bacteriology*, 44, 440-446.
- Sertkaya, G., Martini, M., Musetti, R., & Osler, R. (2007). Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 141.
- Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N., Herzon, I., Van Doorn, A., . . . Ramwell, C. (2009). Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe—a review. *Journal of environmental management*, 91(1), 22-46.
- Strauss, E. (2009). Phytoplasma research begins to bloom. *Science*, 325(5939), 388-390.
- Sugio, A., & Hogenhout, S. A. (2012). The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Curr Opin Microbiol*, 15(3), 247-254. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.002.
- Swisher, K., Munyaneza, J., Velásquez-Valle, R., & Mena-Covarrubias, J. (2017). First Report of Beet Leafhopper Transmitted Virescence Agent Phytoplasma in *Capsicum annuum* and *Circulifer tenellus* in Mexico. *Plant Disease*, PDIS-12-16-1723-PDN.

- Tao, Y., Man, J., & Wu, Y. (2012). Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China. *Arch Virol*, 157(7), 1261-1267. doi: 10.1007/s00705-012-1294-y.
- Torres, L., Galdeano, E., Docampo, D., & Conci, L. (2004). Characterization of an aster yellows phytoplasma associated with catharanthus little leaf in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, 209-214.
- Tran-Nguyen, L. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., & Gibb, K. S. (2008). Comparative genome analysis of “*Candidatus Phytoplasma australiense*”(subgroup tuf-Australia I; rp-A) and “*Ca. Phytoplasma asteris*” strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3979-3991.
- Tran-Nguyen, L. T., & Schneider, B. (2013). Cesium chloride-bisbenzimidazole gradients for separation of phytoplasma and plant DNA. *Methods Mol Biol*, 938, 381-393. doi: 10.1007/978-1-62703-089-2_32.
- Vargas-Caamal, I. I., García-Martínez, O., Flores-Olivas, A., Herrera-Pérez, P., Villarreal-Quintanilla, J. Á., & Padrón-Corral, E. (2007). Fluctuación poblacional de cicadélidos positivos a fitoplasma asociado a ‘Punta Morada’ en maleza alemana a cultivo de papa en Arteaga, Coah., México. *UNIDAD LAGUNA*, 4(1), 31.
- Torres, L., Galdeano, E., Docampo, D., & Conci, L. (2004). Characterization of an aster yellows phytoplasma associated with catharanthus little leaf in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, 209-214.
- Vargas, C. (2005). Especies y fluctuación poblacional de cicadélidos y psílidos positivos a fitoplasmas en el cultivo de la papa y maleza alemana en Arteaga Coahuila. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila.
- Velásquez-Valle, R., & Amador-Ramírez, M. D. (2014). Epidemiología de virus y fitoplasmas de Chile para secado. *Virus y fitoplasmas de Chile: una perspectiva regional*. 179.

- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., Mauricio-Castillo, J. A., Mena-Covarrubias, J., Amador-Ramírez, M. D., Salas-Muñoz, S., . . . Chapa-Oliver, Á. M. (2008). Virus y fitoplasmas de Chile: una perspectiva regional.
- Velásquez Valle, R., Aguilar, M., Covarrubias, M. M. M., Valle, J. R. V., Aguilar, M. M. M., & Covarrubias, J. M. (2002). Guía para identificar y manejar las principales enfermedades parasitarias del Chile en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto técnico.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., Amador-Ramírez, M. D., Medina-Aguilar, M. M., & Medina-García, G. (2012). Presencia de *Circulifer tenellus* Baker y *Beet mild curly top virus* en maleza durante el invierno en el Centro Norte de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(4), 813-819.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., & Mena-Covarrubias, J. (2017). Géneros de Chicharritas Presentes durante el invierno en regiones de Aguascalientes, Coahuila, y Zacatecas, México. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 249-259.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R., Chew-Madinaveitia, Y.I. y Mauricio-Castillo, J.A. (2013). Virus y fitoplasmas asociados con el cultivo de Chile para secado en el Norte Centro de México. Folleto Técnico. Núm 49. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 54 páginas.
- Wei, W., Lee, I., Davis, R. E., Suo, X., & Zhao, Y. (2007). Virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences identifies new subgroups in the clover proliferation phytoplasma group. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 349.
- Weintraub, P. G., & Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 91-111.
- Weintraub, P. G., & Jones, P. (2010). Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors: CABI.
- Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 2(1-3), 37-52.
- Wulff, N. A., Zhang, S., Setubal, J. C., Almeida, N. F., Martins, E. C., Harakava, R., . . . Bové, J. M. (2014). The complete genome sequence of ‘*Candidatus Liberibacter*

americanus', associated with citrus huanglongbing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 163-176.

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I. M., Shao, J., Suo, X., & Davis, R. E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 10), 2582-2593. doi: 10.1099/ijs.0.010249-0.