

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE © 2024. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Identificación de insectos portadores del virus de la mancha
roja de la vid, como vectores potenciales, en viñedos de Baja
California, México**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Cynthia Ford Villalón

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Cynthia Ford Villalón

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Jimena Carrillo Tripp
Co-directora de tesis

Dr. David Schneider
Co-director de tesis

Dra. Fadia Sara Ceccarelli

Dr. Misael Rosales Leija

Dr. José Irving Monjarás Barrera



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Cynthia Ford Villalón** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Identificación de insectos portadores del virus de la mancha roja de la vid, como vectores potenciales, en viñedos de Baja California, México

Resumen aprobado por:

Dra. Jimena Carrillo Tripp
Co-directora de tesis

Dr. David Schneider
Co-director de tesis

El virus de la mancha roja de la vid (GRBV; por sus siglas en inglés; especie *Grabovirus vitis*) es el agente causal de la mancha roja de la vid, una enfermedad que reduce el rendimiento en la producción de vino y provoca grandes pérdidas económicas. Aunque la principal vía de transmisión del GRBV es la propagación vegetativa mediante injertos infectados, existen evidencias de propagación secundaria. Actualmente, se ha demostrado que el periquito tricornudo de la alfalfa (*Spissistilus festinus*) es un vector de importancia epidemiológica para la enfermedad. Algunas investigaciones sugieren que otros hemípteros podrían actuar como vectores potenciales de este virus. Baja California es la región vitivinícola más importante de México y, aunque se ha diagnosticado la presencia de GRBV en esta área, no existen reportes del periquito tricornudo ni de otros vectores confirmados. Este proyecto tiene como objetivo identificar vectores potenciales de GRBV en Ensenada. Para ello, se desarrollaron dos líneas de investigación: la primera se centró en la exploración de campo para la captura de insectos portadores del GRBV, y la segunda en la realización de experimentos preliminares bajo condiciones controladas de laboratorio para evaluar la capacidad de los insectos de transmitir el virus. La detección del GRBV se realizó mediante PCR en tiempo real. Se obtuvo una prevalencia del 6.67% de membrácidos de la especie *Tortistilus wickhami* positivos para el virus. En los ensayos de transmisión el 52.94% de los individuos ingirieron partículas virales, pero no las transmitieron a las vides receptoras. La detección del virus en estos especímenes y su cercanía filogenética con el periquito tricornudo de la alfalfa, un vector confirmado de GRBV, sugiere el potencial de *T. wickhami* como vector de GRBV. Sin embargo, se requieren más estudios para obtener resultados concluyentes. Descifrar el papel de estos membrácidos en la epidemiología de la enfermedad permitirá diseñar estrategias de control integradas y efectivas que minimicen la propagación del virus en los viñedos de Baja California.

Palabras clave: virus de la mancha roja de la vid, vector, transmisión, *Tortistilus wickhami*

Abstract of the thesis presented by **Cynthia Ford Villalón** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science.

Identification of insects carrying grapevine red blotch virus as potential vectors in vineyards in Baja California, Mexico

Abstract approved by:

Dra. Jimena Carrillo Tripp
Thesis co-Director

Dr. David Schneider
Thesis co-Director

The grapevine red blotch virus (GRBV, species *Grablovirus vitis*), is the causal agent of grapevine red blotch disease, a condition that reduces wine production yield and causes significant economic losses. Although the main route of GRBV transmission is vegetative propagation through infected grafts, there is evidence of secondary spread. It has been demonstrated that the alfalfa three-cornered hopper (*Spissistilus festinus*) is an epidemiologically important vector of the disease. Some studies suggest that other hemipterans could potentially act as vectors of this virus. Baja California is the most important wine-producing region in Mexico, and although the presence of GRBV has been diagnosed in vineyards from this area, there are no reports of the alfalfa three-cornered hopper or other confirmed vectors. This project aims to identify potential GRBV vectors in Ensenada. To achieve this, two lines of research were developed: the first focused on field exploration to capture GRBV-carrying insects, and the second on conducting preliminary experiments under controlled laboratory conditions to evaluate the insects' ability to transmit the virus. GRBV detection was performed using real-time PCR. A prevalence of 6.67% of GRBV in *Tortistilus wickhami* membracids was obtained. In transmission assays, 52.94% of the individuals ingested viral particles but did not transmit them to recipient grapevines. The detection of the virus in these specimens and their phylogenetic proximity to the alfalfa three-cornered hopper, a confirmed vector of GRBV, suggests the potential of *T. wickhami* as a GRBV vector. However, further studies are required to obtain conclusive results. Understanding the role of these membracids in the disease's epidemiology will allow the development of integrated and effective control strategies that minimize the spread of the virus in the vineyards of Baja California.

Keywords: grapevine red blotch virus, vector, transmission, *Tortistilus wickhami*

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mis padres y a mi abuela.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca de manutención otorgada para realizar mis estudios de posgrado (CVU: 1247582). La investigación fue financiada parcialmente con fondos de CICESE (proyecto 683210), CONAHCYT (convocatoria FOP02-2021-4 proyecto 316602).

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Posgrado en Ciencias de la Vida, por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de formarme en esta prestigiosa institución.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California y a los productores agrícolas de la entidad por permitirnos visitar los viñedos para el desarrollo de la investigación.

A mis co-directores de tesis, la Dra. Jimena Carrillo Tripp y el Dr. David Schneider, por guiarme en este bonito viaje de aprendizaje. Les agradezco por transmitirme su pasión por la ciencia, su dedicación y entrega. Aprecio profundamente su paciencia, el conocimiento que me compartieron y las herramientas valiosas que me enseñaron para mi futura vida profesional. En lo personal, les agradezco su comprensión y siempre motivarme a echarle ganas.

A mi comité sinodal, la Dra. Sara Ceccarelli, el Dr. José Irving Monjarás Barrera y el Dr. Misael Rosales Leija, por su retroalimentación, orientación y apoyo en este proyecto.

A los estudiantes de la UABC: Kyara Acosta, Jessica Apola Aguilar López, Sandra Iveth Ibáñez López, Brenda Berenice Salas Escudero y Robert Santos Navarro por su gran apoyo y entusiasmo en el desarrollo de esta investigación.

Al Laboratorio de Fitopatología y al Laboratorio de Genómica Funcional de Organismos Marinos, por permitirme utilizar sus equipos para la realización de la PCR en tiempo real.

A mis compañeros del Laboratorio de Virología Agrícola: Idalia, Karen, Marco y Dailyn por su apoyo y motivación. Por compartirme parte de su tiempo y por sus valiosas recomendaciones. Especialmente, agradezco a Dailyn por brindarme su amistad y hacerme sentir siempre como en casa.

A mis amigas: Claudia, por ser mi familia, y un soporte importante, por vivir este proceso juntas en tiempo real y brindarme su apoyo en innumerables ocasiones. A Solange, Yohana y Jéssica, por estar siempre para mí a pesar de la distancia y darme fortaleza.

A mi familia, por su constante apoyo y presencia en mi vida. A mis padres, por ser mi lugar seguro, por su amor incondicional y ser mi principal motor en todo lo que hago. A mi abuelita Gladis, gracias por siempre creer en mí, por sentirte tan orgullosa y feliz con cada logro.

Tabla de contenido

| | Página |
|--|----------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | x |
| Lista de tablas | xii |
| Capítulo 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 1 |
| 1.1.1 La planta de vid | 1 |
| 1.1.1.1 Importancia del cultivo de la vid en México | 1 |
| 1.1.1.2 Patógenos y enfermedades de la vid | 2 |
| 1.1.1.3 Virus y virosis de la vid | 2 |
| 1.1.2 Virus de la mancha roja de la vid | 3 |
| 1.1.2.1 Taxonomía y genoma | 3 |
| 1.1.2.2 Distribución e impacto económico..... | 4 |
| 1.1.2.3 Síntomas de la enfermedad de la mancha roja de la vid | 5 |
| 1.1.2.4 Modo de propagación | 6 |
| 1.1.3 Insectos vectores de virus de plantas | 6 |
| 1.1.3.1 Interacción vector-virus-hospedero en la transmisión viral | 8 |
| 1.1.3.2 Modos de transmisión de virus por insectos vectores..... | 8 |
| 1.1.3.3 Insectos vectores de geminivirus | 10 |
| 1.1.3.4 Candidatos a vectores de GRBV | 10 |
| 1.2 Justificación | 11 |
| 1.3 Hipótesis..... | 12 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| 1.4 | Objetivos | 12 |
| 1.4.1 | Objetivo general | 12 |
| 1.4.2 | Objetivos específicos | 12 |
| Capítulo 2. | Metodología..... | 13 |
| 2.1 | Diseño experimental | 13 |
| 2.1.1 | Selección de los sitios de estudio | 13 |
| 2.1.2 | Selección de hemípteros de interés | 13 |
| 2.2 | Muestreo de insectos y vides | 14 |
| 2.3 | Procesamiento de los insectos | 14 |
| 2.4 | Clasificación morfológica de los hemípteros de interés | 15 |
| 2.5 | Identificación molecular de los insectos | 16 |
| 2.6 | Detección molecular de GRBV | 16 |
| 2.6.1 | Extracción de ácidos nucleicos de hemípteros y tejido vegetal | 17 |
| 2.6.2 | Diagnóstico de GRBV por PCR en tiempo real..... | 18 |
| 2.7 | Ensayos de transmisión..... | 19 |
| 2.7.1 | Obtención y mantenimiento de vides sanas e infectadas con GRBV..... | 19 |
| 2.7.2 | Obtención y mantenimiento de membrácidos | 19 |
| 2.7.3 | Normalización de condiciones experimentales para ensayos de transmisión | 19 |
| 2.7.4 | Ensayos de transmisión finales | 20 |
| Capítulo 3. | Resultados | 22 |
| 3.1 | Prospección de potenciales vectores de GRBV | 22 |
| 3.1.1 | Identificación morfológica..... | 23 |
| 3.1.2 | Detección molecular de GRBV..... | 25 |
| 3.1.2.1 | Diagnóstico de GRBV en vid | 25 |
| 3.1.2.2 | Diagnóstico de GRBV en insecto | 25 |
| 3.2 | Ensayos de transmisión..... | 27 |
| 3.3 | Identificación molecular de los insectos | 29 |

Capítulo 4. Discusión..... 32

4.1 Prospección de potenciales vectores de GRBV 32

4.2 Ensayos de transmisión 33

Capítulo 5. Conclusiones 37

Literatura citada 39

Anexos 44

Lista de figuras

| Figura | Página |
|---|---------|
| 1. A: representación esquemática del genoma de virus del género <i>Grablovirus</i> . B: Ejemplo de partículas de geminivirus observadas por microscopía electrónica. | 4 |
| 2. Sintomatología de la enfermedad de la mancha roja de la vid. A, C, G, I, K: Variedad desconocida. B, F, O y S: Variedad Nebbiolo. D, M y N: Variedad Zinfandel. E: Variedad Thompson. J y Q: Variedad Sauvignon Blanc. H: Uva de mesa. L: Variedad Petit Verdot. P: Variedad Cabernet Franc. R: Variedad Malbec. P: Variedad Cabernet Franc. R: variedad Malbec (Palacios-Gutiérrez, 2019). | ... 5 |
| 3. Familias taxonómicas de los insectos vectores más comunes de virus de plantas y modo de transmisión viral al que están asociados. | 7 |
| 4. Representación esquemática de los sitios de localización del virus en insectos vectores. | 9 |
| 5. Insectos representativos de familias de hemípteros con integrantes vectores de geminivirus. | 10 |
| 6. Rasgos morfológicos de membrácidos de la tribu Ceresini observados al estereoscopio para la identificación taxonómica. A) Vista lateral del abdomen y genitalia masculina. B) Vista anterior de la cabeza y cuernos pronotales. C) Patrón de las nervaduras de una de las alas anteriores. D) Vista dorsal y E) Vista lateral, donde se observa la elevación vertical del pronoto por encima de la cabeza con crestas laterales que se unen sobre el tórax. F) Filas de setas cuculadas en la tibia de la pata metatorácica. | 15 |
| 7. Diseño experimental de ensayo de transmisión final. Tiempos de adquisición (AAP) e inoculación (IAP). | 21 |
| 8. Distribución de los 23 sitios seleccionados para el estudio de prospección de hemípteros portadores de GRBV en el Valle de Guadalupe, Baja California, México. Se indican los sitios con y sin previo diagnóstico molecular de GRBV en vides, así como la presencia de insectos de las familias Cicadellidae y Membracidae. | 22 |
| 9. Fotografías tomadas bajo un microscopio estereoscópico a magnificación 5X de chicharritas de la vid occidental (<i>Erythroneura elegantula</i>) colectados en los sitios A y B. | 23 |
| 10. Fotografías mostrando el punto de disección de la genitalia de membrácidos para la identificación morfológica de la especie. El resto del cuerpo se destinó a la detección molecular de GRBV. | 24 |
| 11. Hembra de la especie <i>Spissistilus nigricans</i> colectada en una planta nativa cercana a las vides cultivadas del sitio C. A) Vista dorsal, que muestra el patrón de nervaduras del ala anterior derecha. B) Vista lateral, que muestra el cuerpo completo del individuo. C) Vista ventral de la genitalia y pata metatorácica. E) Vista ventral del insecto completo. D) Vista frontal de la cabeza, el pronoto y el ala anterior derecha. | 24 |
| 12. Curvas de amplificación. Membrácidos portadores de GRBV en la prospección. | 25 |

13. Fotografías representativas del diseño de las jaulas para los ensayos de transmisión con membrácidos: A, B, C, E: tribu Ceresini. D, F: tribu Hypsoprini. 27
14. Amplificación de un fragmento del gen COI (710 pb) observado en gel de agarosa al 1%. 29
15. Ejemplo de membrácidos de la tribu Ceresini de la especie *Tortistilus wickhami* que resultaron positivos a GRBV durante el desarrollo de este trabajo..... 30
16. Membrácidos de la tribu Hypsoprini de la especie identificada como *Phlya californiensis*. 31
17. Árbol filogenético proporcionado por la base de datos BOLD. La imagen muestra la ubicación de la secuencia de consulta (subrayada en rojo), correspondiente al membrácido 5 del ensayo de transmisión (5T), que pertenece a la especie *Tortistilus wickhami*. Este ejemplar es representativo de todos los membrácidos de la tribu Ceresini trabajados en este proyecto. Las secuencias de BOLD están marcadas en negro, mientras que las que se señalan en azul son secuencias de GenBank que no están representadas en BOLD. Estas pueden estar menos actualizadas en términos de precisión de la secuencia e identificación taxonómica. 44

Lista de tablas

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1. Membrácidos colectados en sitios de prospección. Identificación taxonómica y diagnóstico molecular..... | 26 |
| 2. Diagnóstico molecular de membrácidos y vides receptoras del ensayo de transmisión | 28 |

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 La planta de vid

Las vides forman parte de la familia Vitaceae, que incluye 12 géneros y más de 700 especies, cuya mayoría son plantas trepadoras (Meng et al., 2017). Algunos de los géneros comprendidos en esta familia son: *Ampelocissus*, *Ampelopsis*, *Cayratia*, *Cissus*, *Clematicissus*, *Parthenocissus*, *Tetrastigma* y *Vitis* (Galet, 2000). Este último, está bien representado en todo el mundo con aproximadamente 60 especies, todas con capacidad de hibridarse y muchas de ellas son nativas de Norteamérica, México y el Caribe (Olmo, 1976). No obstante, *Vitis vinifera* es la que tiene mayor distribución mundial (Meng et al., 2017).

Los orígenes del cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.), datan del año 5000 al 6000 a.C. en las regiones de Transcaucasia (Reynolds, 2017). El surgimiento de esta práctica probablemente se relaciona con la propagación vegetativa, la selección de variedades y el establecimiento de viñedos con variedades hermafroditas uniformes (McGovern et al., 2003; Meng et al., 2017). Desde la antigüedad hasta el presente, la vid representa uno de los cultivos de mayor importancia por su aprovechamiento en la producción de vino y el consumo de uvas, pasas, zumo, vinagre, aceites de semillas y otros productos (Meng et al., 2017).

1.1.1.1 Importancia del cultivo de la vid en México

México cuenta con condiciones climáticas y características de suelo muy favorables que han permitido la viticultura como un agronegocio en crecimiento (Díaz Lara et al., 2023). El país supera las 37,000 hectáreas de viñedos, con una producción anual de 400,000 toneladas, y el valor de sus vinos asciende un 13% anual (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2024). Tanto el gobierno como los productores están altamente interesados en aumentar la capacidad de exportación (Díaz Lara et al., 2023a). Además, la industria vitivinícola en México representa la cuarta fuente de empleo en el sector agrícola, siendo el sustento de 500,000 jornaleros en los catorce estados productores de más de 40 variedades de vid. Entre las regiones

destacadas en la elaboración de vino se encuentran Sonora, Zacatecas y Baja California, con el Valle de Guadalupe que es un área eminentemente vitícola (Díaz Lara et al., 2023a).

1.1.1.2 Patógenos y enfermedades de la vid

Como toda planta, la vid está expuesta a una amplia variedad de patógenos, incluyendo bacterias, hongos y organismos similares a hongos, nematodos y virus. La salud de los cultivos y calidad de los frutos están constantemente comprometidas porque los microorganismos patógenos provocan enfermedades en períodos de pre y poscosecha (Armijo et al., 2016). Estos agentes se clasifican en tres tipos. Los biótropos, se alimentan de tejido vivo mediante estructuras que invaden a las células hospederas y aprovechan los productos del metabolismo. Los necrótrofos, secretan enzimas líticas y fitotoxinas que causan la muerte celular y un tejido necrótico del cual se alimentan. Por último, los hemibiótropos incluyen dos fases de infección, primero una biótrofa, seguida de una necrótica que provoca la muerte del hospedero en la etapa final del ciclo infeccioso (Armijo et al., 2016). Entre las enfermedades más importantes de la vid se encuentran el moho gris, el mildú polvoriento y el mildú veloso, causados por *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator* y *Plasmopara viticola*, respectivamente. Además, *Agrobacterium vitis* provoca la agalla de la copa de la vid, mientras que *Xylella fastidiosa* causa la enfermedad de Pierce (Armijo et al., 2016). Los virus se clasifican como biótropos (Armijo et al., 2016), y merecen una atención especial debido a su efecto devastador y al impacto económico que pueden causar (Meng et al., 2017).

1.1.1.3 Virus y virosis de la vid

La vid es el cultivo leñoso susceptible al mayor número de agentes virales conocidos (más de 90) (Kahl et al., 2021; Díaz Lara et al., 2023b). Dichos microorganismos se transmiten a través de material vegetativo, y algunos de ellos por vectores como insectos, ácaros y nematodos (Díaz Lara et al., 2023a). La gran mayoría de estos patógenos son responsables de las 30 enfermedades víricas reconocidas por Martelli (2014) en su investigación. En este sentido, el autor describe una amplia variedad de síntomas, como malformaciones de hojas y ramas, decoloraciones foliares, estrías en el cilindro leñoso, entre otros. Los virus de la vid se agrupan en cuatro complejos principales según las enfermedades que provocan : i) los que son responsables de la degeneración o declive infeccioso, tal es el caso del virus de la hoja de abanico de la vid (GFLV; por sus siglas en inglés); ii) los que causan la enfermedad del enrollamiento de la hoja, como son los virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid (GLRaVs; por sus siglas en inglés); iii) los

que están relacionados con el complejo de la madera rugosa, por ejemplo el virus asociado al agrietamiento del tallo de la vid rupestris (GRSPaV; por sus siglas en inglés) y iv) los asociados a la enfermedad de Fleck o Marbruna, como el virus Fleck de la vid (GFkV; por sus siglas en inglés) (Sudarshana et al., 2015; Rumbaugh et al., 2021). Además, se han reportado virus emergentes que, de manera individual, pueden ocasionar enfermedades de alto impacto, como el virus de la mancha roja de la vid (GRBV; por sus siglas en inglés). En México, primero se informó sobre la presencia de nueve virus de la vid: el GFLV, el GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, los virus de la vid A y B (GVA y GVB; por sus siglas en inglés), el GRSPaV, el GFkV y el GRBV (García Reséndiz y Carrillo Tripp, 2022). Adicionalmente, mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS; por sus siglas en inglés), se identificó el virus asociado al mosaico de asteroides de la vid (GAMaV; por sus siglas en inglés), el reovirus de la vid Cabernet Sauvignon (GCSV; por sus siglas en inglés), el virus del Pinot gris de la vid (GPGV; por sus siglas en inglés), el virus del globo rojo de la vid (GRGV; por sus siglas en inglés), el virus 1 de la Syrah de la vid (GSyV-1; por sus siglas en inglés), el virus del plumaje de las venas de la vid rupestris (GRVFV; por sus siglas en inglés) y el GLRaV-4. De este último y de GFkV se descubrieron variantes divergentes. Además, se encontró un nuevo virus similar a los enamovirus (Díaz Lara et al., 2023b).

1.1.2 Virus de la mancha roja de la vid

El GRBV es el agente causal de la enfermedad de la mancha roja de la vid (Weligodage et al., 2023). Se identificó por primera vez en el 2011 en la variedad Cabernet Sauvignon en la Estación Experimental de Oakville, California, EE. UU. (Meng et al., 2017; Weligodage et al., 2023). Desde su descubrimiento, GRBV ha mostrado una rápida propagación, alcanzando proporciones epidémicas en el noroeste del Pacífico y causando un gran impacto económico (Weligodage et al., 2023). Las especies del género *Vitis* son los únicos hospederos conocidos del GRBV (Flasco et al., 2023a). El primer reporte de GRBV en México se detectó mediante PCR en punto final a partir de muestras de plantas con síntomas de mancha roja colectadas en Ensenada, Baja California, en 2016 y 2017. El fragmento amplificado tuvo una alta identidad de secuencia de nucleótidos (98 %) con el aislado de GRBV-BCRB5 de Canadá (Gasparin Bulbarela et al., 2019).

1.1.2.1 Taxonomía y genoma

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV; por sus siglas en inglés), el GRBV cuya especie

es *Grablovirus vitis*, pertenece a la familia *Geminiviridae*. Los virus de esta familia pertenecen a la clase II según la clasificación de Baltimore (Bhattacharjee y Hallan, 2022). El GRBV tiene un genoma monopartito, compuesto por ADN circular monocatenario, encapsidado en una partícula viral geminada (Figura 1). El genoma presenta seis marcos abiertos de lectura (ORFs): tres en sentido del virión (V1, V2, y V3) y tres en sentido complementario (C1, C2 y C3) (Fiallo Olivé et al., 2021). Sin embargo, Weligodage et al. (2023) mencionan que recientemente se identificaron dos ORF de menor tamaño: V0 y V02, ubicados río arriba del V2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación viral, y están asociadas a los ORFs en dirección complementaria. La proteína Rep A está codificada por C1, mientras que la proteína Rep proviene de una transcripción empalmada de C2 y C3 (Fiallo Olivé et al., 2021). Por otro lado, los ORFs en sentido del virión codifican a las proteínas estructurales; donde V1 da lugar a la proteína de la cápside (CP), y se predice que V0, V2 y V3 a proteínas de movimiento (Fiallo Olivé et al., 2021). Los análisis de la diversidad genética de los aislamientos de GRBV revelaron dos clados filogenéticos (1 y 2) con una divergencia de secuencia de nucleótidos de hasta 8.5% (Krenz et al., 2014). Ambos están involucrados en la etiología de la enfermedad de la mancha roja de la vid, aunque su significado biológico, si lo hay, sigue siendo desconocido (Flasco et al., 2023a).

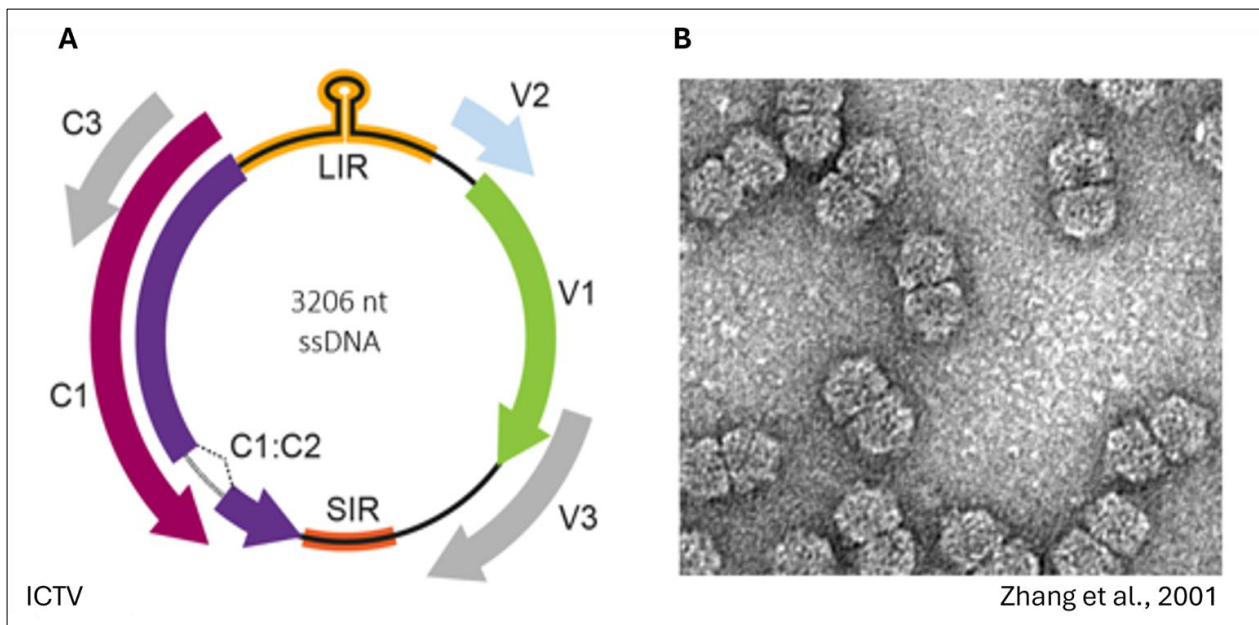


Figura 1. A: representación esquemática del genoma de virus del género *Grablovirus*. B: Ejemplo de partículas de geminivirus observadas por microscopía electrónica.

1.1.2.2 Distribución e impacto económico

El GRBV se ha extendido por América del Norte, México, Argentina, Italia, India, Corea del Sur y Australia (Flasco et al., 2023a). Esta amplia dispersión sugiere que la comercialización de material vegetal infectado

es la vía principal de transmisión de GRBV (Wilson et al., 2022). La propagación viral ha provocado grandes pérdidas económicas en la viticultura. Esto se debe a que el GRBV reduce el rendimiento de los cultivos, afectando la resistencia de las yemas, la fotosíntesis y la conductancia estomática. Además, interfiere en la translocación de azúcares de las hojas a las uvas y altera la biosíntesis de los flavonoides, entre otros efectos negativos en la fisiología de la vid (Rumbaugh et al., 2021). Todo esto genera una disminución en la producción y, por ende, afecta las exportaciones y la comercialización. Por ejemplo, en EE. UU se estima que la enfermedad produce pérdidas económicas que van desde \$2,200 a \$68,548 USD por hectárea a lo largo de la vida productiva de un viñedo (Flasco et al., 2023a).

1.1.2.3 Síntomas de la enfermedad de la mancha roja de la vid

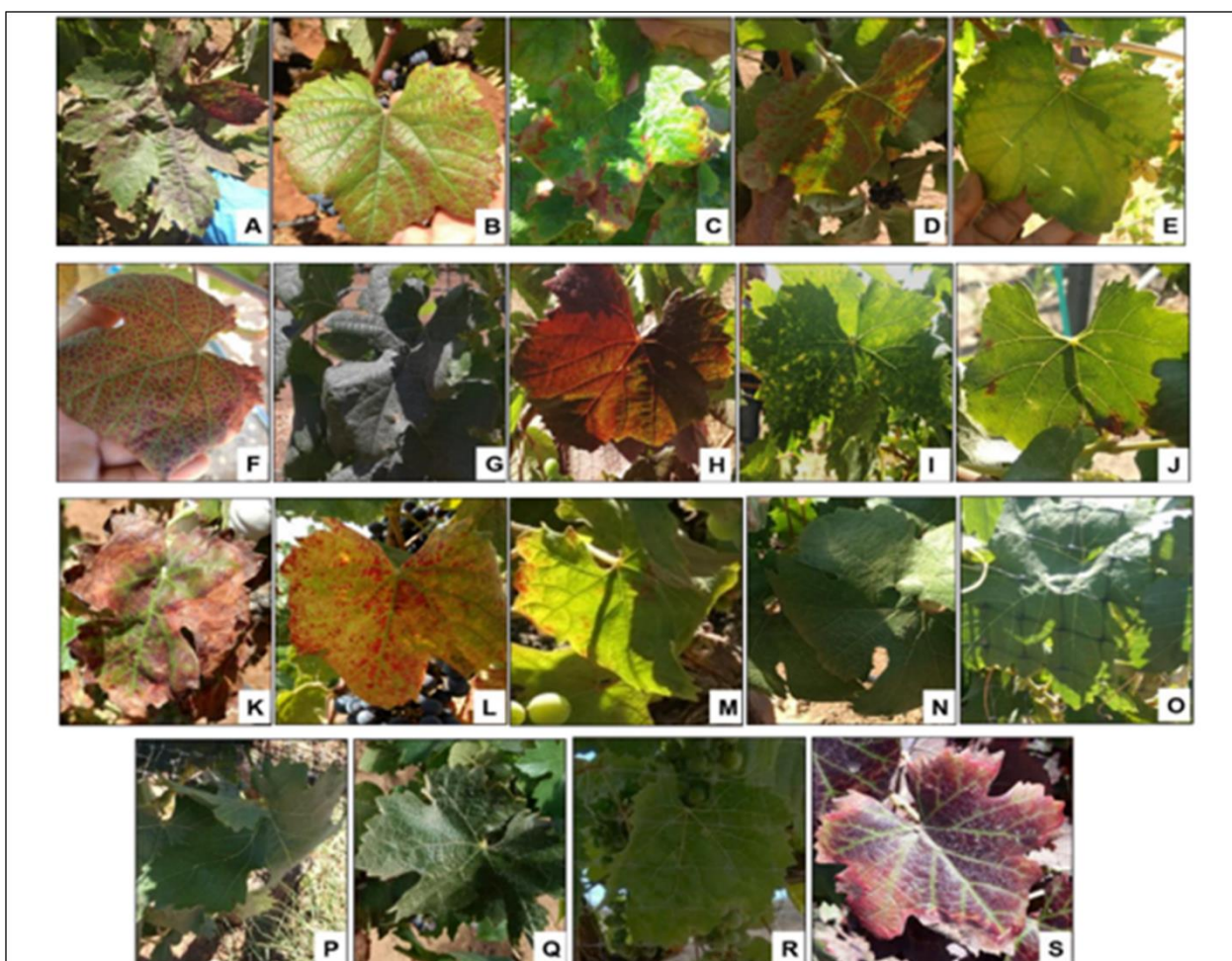


Figura 2. Sintomatología de la enfermedad de la mancha roja de la vid. A, C, G, I, K: Variedad desconocida. B, F, O y S: Variedad Nebbiolo. D, M y N: Variedad Zinfandel. E: Variedad Thompson. J y Q: Variedad Sauvignon Blanc. H: Uva de mesa. L: Variedad Petit Verdot. P: Variedad Cabernet Franc. R: Variedad Malbec. P: Variedad Cabernet Franc. R: variedad Malbec (Palacios-Gutiérrez, 2019).

En la Figura 2 se observan los síntomas característicos de la enfermedad. En las variedades de frutos tintos aparecen manchas foliares de color rojo, y las nervaduras también adquieren dicha tonalidad. Esto ocurre principalmente en las hojas basales hacia el final de la temporada de crecimiento. En contraste, los cultivares de bayas blancas presentan síntomas menos evidentes, como áreas cloróticas y/o necróticas irregulares en las láminas de las hojas. Todos estos síntomas son similares a los causados por los GLRaVs, lo que dificulta el diagnóstico visual (Beltran Beache et al., 2021). Además, es frecuente la coinfección de la vid con varios virus (Burger et al., 2017; Sawyer et al., 2023).

Desde el punto de vista molecular, el GRBV afecta los metabolitos primarios y secundarios, en particular los compuestos fenólicos y aromáticos. Las hojas de las vides infectadas muestran niveles elevados de azúcar, fenoles, aminoácidos específicos y un incremento en la actividad enzimática relacionada con la defensa de la planta, además de una reducción en la fijación de carbono. No obstante, el mayor impacto se observa en la composición de la uva, perjudicando la calidad del vino. El GRBV reduce el tamaño de la baya y retrasa la maduración del fruto al disminuir la acumulación de azúcar y antocianinas, posiblemente debido al deterioro de los mecanismos de translocación (Rumbaugh et al., 2021).

1.1.2.4 Modo de propagación

El GRBV es un patógeno sistémico, limitado por el floema. Está demostrado que su principal modo de transmisión es la propagación vegetativa a través de injertos infectados (Díaz Lara et al., 2023a). Sin embargo, desde las primeras etapas de su estudio ha habido indicios de propagación secundaria en el interior de los viñedos mediante algún vector (Wilson et al., 2022). Esta idea se apoya en el hecho de que varios autores han documentado infecciones por GRBV tanto en vides cultivadas (Cieniewicz et al., 2018), como en vides silvestres ubicadas cerca de regiones ribereñas (Cieniewicz et al., 2017). Esto sugirió la posible existencia de un insecto vector que se desplazara entre ambos hábitats (Wilson et al., 2022). Por esta razón, se han realizado varios estudios en busca del insecto vector de GRBV, ya que su identificación es crucial para un control más eficaz de la enfermedad (Díaz Lara et al., 2023a).

1.1.3 Insectos vectores de virus de plantas

Dado que las plantas carecen de capacidad para desplazarse, los virus que las infectan requieren de vectores móviles que los transmitan a otras plantas hospederas donde replicarse. En ese caso, los insectos

son los vectores más importantes de los fitovirus, actuando como portadores y, en algunas ocasiones, como hospederos del virus (Kolliopoulou et al., 2020). Entre los 32 órdenes de Insecta, se ha encontrado que siete de ellos incluyen vectores de virus vegetales (Kolliopoulou et al., 2020). Sin embargo, solo a tres órdenes pertenecen las seis familias más comunes de insectos que transmiten virus de plantas: Chrysomelidae (Coleoptera), Aphididae (Hemiptera), Aleyrodidae (Hemiptera), Cicadellidae (Hemiptera), Thripidae (Thysanoptera) y Delphacidae (Hemiptera) (Catto et al., 2022) (Figura 3). La mayoría de estos insectos pertenecen a Hemiptera y se caracterizan por tener piezas bucales perforantes y chupadoras, convirtiéndose en los vectores más comunes y eficientes, ya que pueden inyectar virus en tejidos vegetales específicos. Además, este es el grupo de vectores más relevante porque provocan un daño mínimo mientras se alimentan, lo que permite dejar células vivas en las que el virus puede replicarse durante el proceso de sondeo (Kolliopoulou et al., 2020). Por el contrario, se ha informado que Thysanoptera causa un daño celular extenso durante las pruebas de ingestión, y esto dificulta la replicación viral (Stafford et al., 2012). La anatomía de las piezas bucales de los hemípteros desempeña un papel importante en la transmisión de virus de una planta a otra. La perforación de la epidermis, cubierta por una cutícula impermeable, facilita la transmisión intracelular del virus y ayuda a mantener la integridad de la célula vegetal (Ferreles y Raccah, 2015).

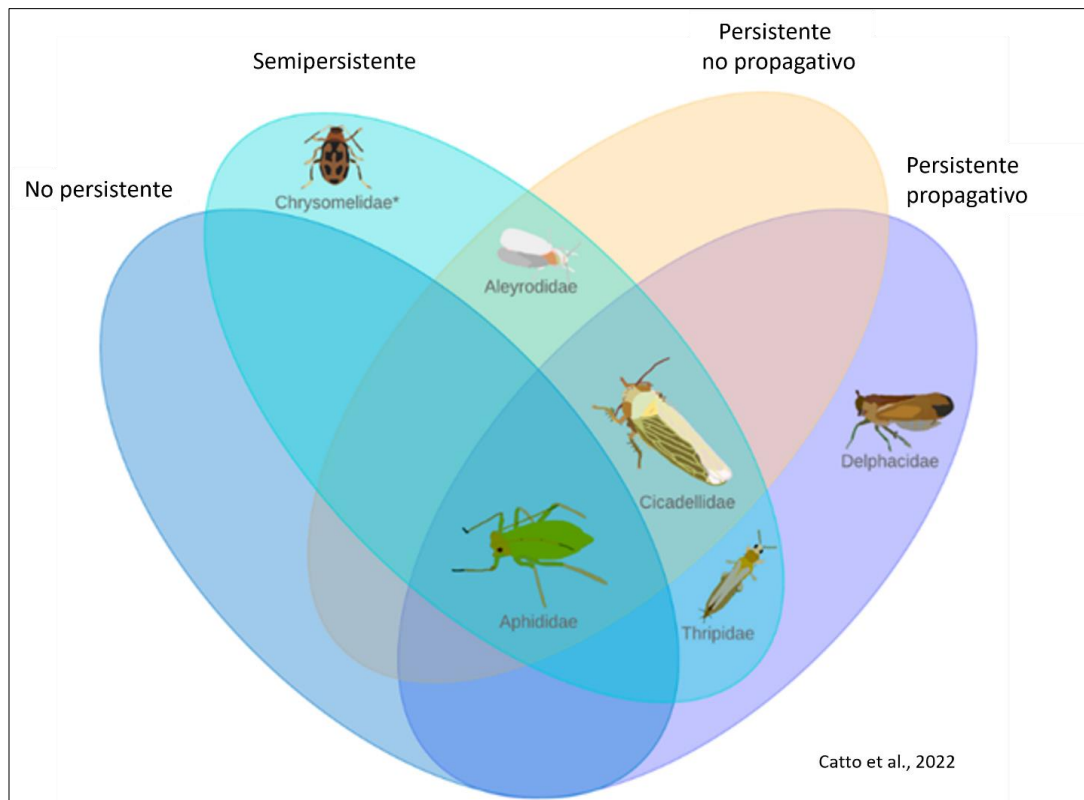


Figura 3. Familias taxonómicas de los insectos vectores más comunes de virus de plantas y modo de transmisión viral al que están asociados.

1.1.3.1 Interacción vector-virus-hospedero en la transmisión viral

Existe evidencia de que los patógenos de plantas y los insectos han coevolucionado a través de asociaciones cercanas, en las que las interacciones son inevitables (Kolliopoulou et al., 2020). Los cambios inducidos por los virus en las plantas hospederas también benefician al insecto vector, por lo que estas interacciones pueden considerarse mutualistas. Las preferencias de los vectores por las plantas infectadas han evolucionado con el tiempo, lo que facilita la propagación del virus a nuevos hospederos (Kolliopoulou et al., 2020; Lee et al., 2022; Ray y Casteel, 2022). Se ha demostrado que los pulgones verdes del duraznero no virulíferos (*Myzus persicae*) prefieren plantas hospedantes infectadas con el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV; por sus siglas en inglés), mientras que los virulíferos prefieren plantas no infectadas. Por lo tanto, el PLRV influye en su insecto vector para maximizar la transmisión a plantas sanas (Rajabaskar et al., 2014). Por otro lado, el virus del enanismo del arroz (RDV; por sus siglas en inglés) induce en las plantas hospederas la emisión de los volátiles E- β -cariofileno (EBC) y 2-heptanol, los cuales modifican el comportamiento olfativo de su vector *Nephotettix virescens*, favoreciendo la adquisición y transmisión viral. El EBC atrae a los insectos no virulíferos hacia plantas de arroz infectadas, y promueve la adquisición del virus por estos vectores. Mientras tanto, el 2-heptanol repele a los *N. virescens* virulíferos, de modo que estos prefieren las plantas de arroz libres de RDV, lo que facilita la propagación del virus (Chang et al., 2023).

1.1.3.2 Modos de transmisión de virus por insectos vectores

La manera en que un virus es transmitido a una planta a través de un insecto vector depende de las rutas de transmisión (Figura 4), las cuales se asocian al tiempo de permanencia de la partícula viral dentro del insecto y varían dependiendo de la naturaleza del virus (Dietzgen et al., 2016). De ahí que estos patógenos se pueden clasificar en:

No persistentes: presentan tiempos cortos de adquisición e inoculación, que duran solo unos segundos y no tienen período de latencia (sección A de la Figura 4). Son adquiridos de las células epidérmicas de las plantas infectadas y retenidos en la punta del estilete del insecto (Catto et al., 2022).

Semipersistentes: están limitados al floema de las plantas infectadas. Se adhieren a un sitio de unión en el intestino anterior del vector (sección B de la Figura 4), con la ayuda de la proteína de la cápside y requieren más tiempo tanto para su adquisición como para su transmisión (Catto et al., 2022).

Persistentes no propagativos: también se limitan al floema de la planta. Se retienen en el intestino medio o posterior (círculos amarillos de la Figura 4). Tras su adquisición a través de la endocitosis mediada por receptores, la partícula viral atraviesa la barrera del intestino medio hacia la hemolinfa, donde una proteína endosimbótica interactúa con el virión. Luego, llega a las glándulas salivales primarias. Este paso también está mediado por receptores específicos que dependen de la especie del vector (Catto et al., 2022).

Persistentes propagativos: no solo atraviesan la barrera del intestino medio (óvalos rojos y sección C de la Figura 4), sino que también se replican en sus células, donde las glicoproteínas de la cubierta viral facilitan la entrada. De esta manera, el vector también actúa como hospedero del virus (Catto et al., 2022).

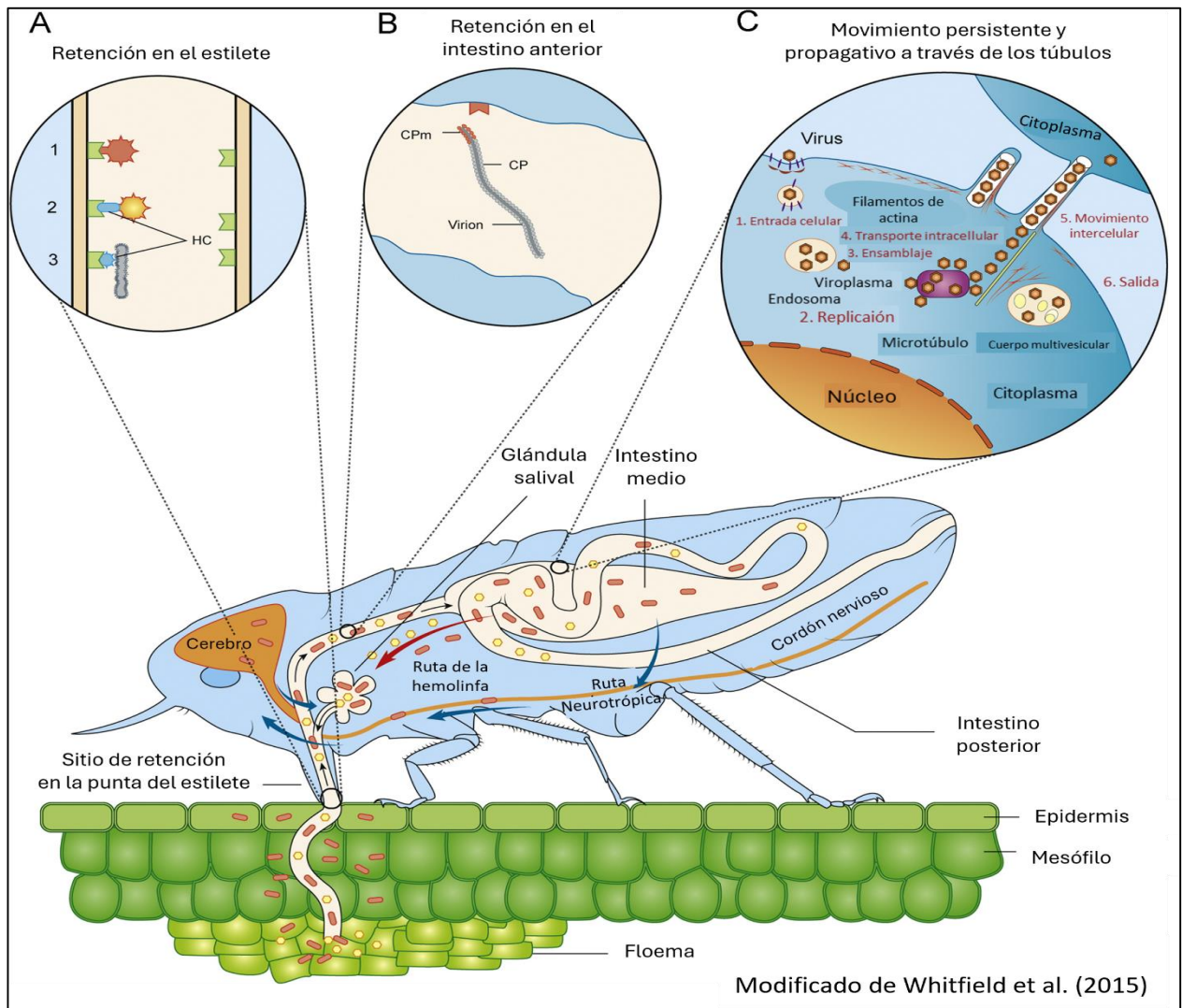


Figura 4. Representación esquemática de los sitios de localización del virus en insectos vectores.

1.1.3.3 Insectos vectores de geminivirus

Los geminivirus se transmiten de forma persistente no propagativa, y sus vectores conocidos son los periquitos (Hemiptera: Membracidae), las chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae), las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) y los pulgones (Hemiptera: Aphididae) (Kolliopoulou et al., 2020) (Figura 5). La especificidad del insecto vector está determinada por la proteína de la cubierta de los geminivirus (Kahl et al., 2021). En relación con esto, se ha sugerido que residuos específicos de aminoácidos en la proteína de la cubierta están involucrados en la endocitosis mediada por receptores; tanto en el intestino de los insectos como en las glándulas salivales (Kahl et al., 2021). En general, los vectores de insectos compatibles con un geminivirus en particular se caracterizan por estar limitados a una sola especie o a unas pocas especies estrechamente relacionadas dentro de un mismo género (Kahl et al., 2021).



Figura 5. Insectos representativos de familias de hemípteros con integrantes vectores de geminivirus.

1.1.3.4 Candidatos a vectores de GRBV

Actualmente, un insecto candidato solo puede considerarse un vector legítimo de un virus si se comprueba su capacidad de transmisión mediante experimentos en invernaderos altamente controlados, con réplicas experimentales (Kahl et al., 2021). Se han realizado varias investigaciones sobre ensayos de transmisión del GRBV utilizando distintos vectores potenciales (Poojari et al., 2013; Bahder et al., 2016a; Flasco et al., 2021; 2023a; Kahl et al., 2021; Hoyle et al., 2022; LaFond et al., 2022).

Los miembros de la familia *Geminiviridae* son transmitidos por insectos del orden Hemiptera (Bahder et

al., 2016a). Algunos autores informaron la capacidad de transmisión viral por parte de la chicharrita de la parra de Virginia (*Erythroneura ziczac*, Hemiptera: Cicadellidae), sugiriéndola como posible vector (Poojari et al., 2013). Sin embargo, esta idea fue rápidamente refutada (Flasco et al., 2023b). El hecho de que este insecto se alimente del mesófilo, mientras que GRBV se limita al floema es contradictorio. Además, posteriores intentos de experimentación en el laboratorio resultaron fallidos (Kahl et al., 2021).

Otros estudios han revelado la capacidad de transmisión viral en las siguientes especies de la familia Membracidae: *Stictocephala basalis*, *S. bisonia* (Kahl et al., 2021); así como, *Entylia carinata* y *Enchenopa binotata* (LaFond et al., 2022). No obstante, se ha generado cierto grado de incertidumbre al respecto, ya que la mayoría de los experimentos de transmisión de GRBV reportados en la literatura no se replicaron. Por otro lado, en uno de los ensayos se comprobó la capacidad de los insectos de transferir partículas virales a una solución tamponada de sacarosa, utilizada como receptor del virus en lugar de tejido vegetal (Kahl et al., 2021). Al respecto, Flasco et al. (2023b) plantean que es necesario completar el estudio de transmisión utilizando vides negativas como receptoras finales. Por otro lado, se han reportado ciertas especies y géneros de insectos con detección positiva para GRBV (Wilson et al., 2022). Esto se debe simplemente a que son eficientes succionadores de la savia del floema, pero no son vectores efectivos. No obstante, en algunos especímenes se ha sugerido una evaluación profunda como vectores candidatos debido a su alta afinidad con la vid y alta frecuencia de pruebas positivas para GRBV, tal es el caso de *Scaphytopius graneticus* (Hemiptera: Cicadellidae) (Wilson et al., 2022).

Si bien no se debe descartar que algunos insectos ameritan una investigación más detallada; hasta la fecha, el periquito tricornudo de la alfalfa, *Spissistilus festinus* (Hemiptera: Membracidae), es considerado el único vector de GRBV. Su modo de transmisión viral persistente no propagativo se ha demostrado tanto en el invernadero como en el viñedo (Flasco et al., 2021; Flasco et al., 2023a). Múltiples réplicas de ensayos experimentales han arrojado resultados concordantes con la relevancia epidemiológica de este membrácido en la enfermedad de la mancha roja de la vid (Flasco et al., 2023b). La participación de un vector en la propagación secundaria de GRBV solo se ha confirmado en California y el sur de Oregón, EE. UU. Sin embargo, esta forma de dispersión viral no se ha reportado en otros países con presencia de GRBV como Suiza, Francia, Italia o México.

1.2 Justificación

El GRBV ha sido detectado en Baja California, la región vitivinícola más importante de México.

Investigaciones previas han demostrado que el periquito tricornudo de la alfalfa transmite el virus en condiciones de invernadero, y recientemente se ha confirmado como vector de relevancia epidemiológica en algunas regiones vitivinícolas de Norteamérica. Además, se ha propuesto que pudieran existir otros insectos candidatos a vectores pertenecientes a las familias Membracidae y Cicadellidae.

Es necesario identificar cuál o cuáles son los posibles insectos vectores de GRBV en Baja California, donde aún no se han reportado. Esto permitirá establecer medidas de control específicas, basadas en una contención más eficaz del GRBV y, por ende, evitar pérdidas económicas ocasionadas por este virus.

1.3 Hipótesis

En los viñedos de Baja California existen hemípteros que son vectores potenciales del GRBV y que, con el tiempo, podrían estar contribuyendo al aumento en el número de vides enfermas, como un modo de propagación secundario.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar insectos portadores del virus de la mancha roja de la vid, como vectores potenciales en viñedos de Baja California, México.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Identificar vectores potenciales del GRBV principalmente en zonas donde se ha detectado la enfermedad de la mancha roja de la vid.
2. Detectar el virus en los vectores potenciales mediante PCR en tiempo real.
3. Evaluar de manera preliminar, la transmisión del virus en condiciones de laboratorio.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Diseño experimental

El presente estudio se desarrolló en dos vertientes metodológicas principales. La primera consistió en la exploración de campo para la obtención de posibles vectores del GRBV, con el empleo de la técnica de PCR en punto final. Tras el hallazgo de la familia de hemípteros que portaba el virus, se llevó a cabo la segunda línea. Esta se centró en la realización de pruebas preliminares bajo condiciones controladas de laboratorio, cuyo objetivo fue evaluar la capacidad de estos insectos para transmitir el virus en un entorno simulado. Finalmente, se procedió a la identificación molecular de especímenes de interés, incluidos los que resultaron positivos durante el desarrollo de ambas líneas de investigación.

2.1.1 Selección de los sitios de estudio

Los viñedos elegidos para realizar el muestreo de potenciales vectores del GRBV en regiones vitivinícolas de Baja California se clasificaron en dos categorías. La primera, se basó en la presencia de GRBV previamente confirmado por pruebas de biología molecular, en el Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE. La segunda, comprendió sitios sin diagnóstico conocido de GRBV. Esto fue posible gracias al acceso a varias regiones del Valle de Guadalupe, donde se colectaron membrácidos como parte de un proyecto que pretende conocer los efectos de la vegetación circundante de los viñedos, en la comunidad de artrópodos del cultivo (Dr. David Schneider, comunicación personal).

2.1.2 Selección de hemípteros de interés

La preselección de los grupos de interés se determinó de forma exhaustiva a través de la revisión bibliográfica. Primero, se establecieron los aspectos a tomar en cuenta para la elección de las familias de hemípteros. Estos criterios fueron: alimentación del floema (donde se encuentran las partículas del GRBV) (Díaz Lara et al., 2023a); densidad poblacional suficiente para obtener un tamaño de muestra adecuado (≥ 20 individuos); asociación con la vid o plantas cercanas a ella; y cercanía taxonómica con vectores de geminivirus y cuya filogenia de la CP guarde estrecha relación con la CP del GRBV (Bahder et al., 2016a).

El orden Hemiptera es un grupo taxonómico muy amplio, por lo que, basándonos en los antecedentes bibliográficos, nos centramos en cicadélidos y membrácidos, ya que se ha informado la detección de GRBV en varias especies de estas familias (Bahder et al., 2016a; Poojari et al., 2013; Flasco et al., 2021; Kahl et al., 2021; LaFond et al., 2022).

2.2 Muestreo de insectos y vides

La colecta de insectos se realizó de forma manual en vides cultivadas o vegetación nativa cercana a ellas, cuando era necesario. Sin embargo, la mayoría de las veces se llevó a cabo utilizando una máquina de muestreo al vacío tipo D-vac sobre el dosel de las plantas. El D-vac consta de un soplador/aspirador de gasolina de 25 cc, equipado con un balde de 18.9 litros (5 galones) en el tubo de vacío, para crear un cono de muestreo de 0.093 m², como describen Wilson et al. (2022). En los viñedos con previa confirmación de GRBV, el aspirado se realizó en 20 vides, tomando en cuenta las plantas positivas y las sospechosas. Se cubrió una superficie de muestreo de 1,200 m², aproximadamente. En los sitios sin diagnóstico viral conocido en vides, el aspirado se hizo sobre las 12 plantas que integraban cada cuadrante en estudio. Se realizaron tres empujes por vid, con la máquina funcionando a toda velocidad (en total, aproximadamente 20 segundos de muestreo de vacío continuo). Al mismo tiempo, se colectó tejido de vides sintomáticas en las que se encontraron hemípteros de interés durante la recolección, principalmente en viñedos que, aunque con diagnóstico desconocido, se consideraban sospechosos.

El material muestreado destinado para la detección molecular fue transportado en neveras con geles refrigerantes. Al llegar al laboratorio, los insectos se conservaron en un cuarto frío a una temperatura de 4°C, por un período no mayor a una semana, para luego ser procesados. Mientras que el tejido vegetal se conservó en un congelador a -20°C hasta la extracción del ADN.

2.3 Procesamiento de los insectos

Primeramente, se limpió el material colectado contenido en las bolsas del equipo de aspiración mediante la extracción de fragmentos de hojas, frutos, zarcillos, pequeñas ramas, etc. Posteriormente, se realizó la separación y clasificación manual en grupos taxonómicos según los criterios morfológicos correspondientes; bajo un estereoscopio. Durante el procesamiento de las muestras, éstas fueron manipuladas con mucho cuidado y preservadas en etanol al 95%, en un tubo de microcentrífuga de 1.5

mL a -20°C hasta ser utilizadas para la biología molecular. Adicionalmente, a los especímenes provenientes de viñedos sin previo diagnóstico viral, se les realizó un doble lavado con etanol al 70% antes de ser almacenados, ya que, tras su colecta, se conservaron en frascos junto con otros insectos que no eran de interés para este estudio.

2.4 Clasificación morfológica de los hemípteros de interés

La identificación de las familias de hemípteros se realizó de acuerdo con los criterios morfológicos registrados en la literatura (Caldwell et al., 1949; Dietrich y Dmitriev, 2006; Wheeler et al., 2022) y especialistas en el área entomológica. El análisis de los caracteres morfológicos como la dimensión del insecto, nervadura de las alas, vellosidades de las patas traseras, estructura bucal, coloración y patrones, segmentación de las antenas, tamaño y forma del pronoto; nos permitió distinguir los diferentes taxones y entre ellos a Cicadellidae y Membracidae, entre todos los artrópodos colectados. Esto fue posible mediante la observación minuciosa bajo el estereoscopio.

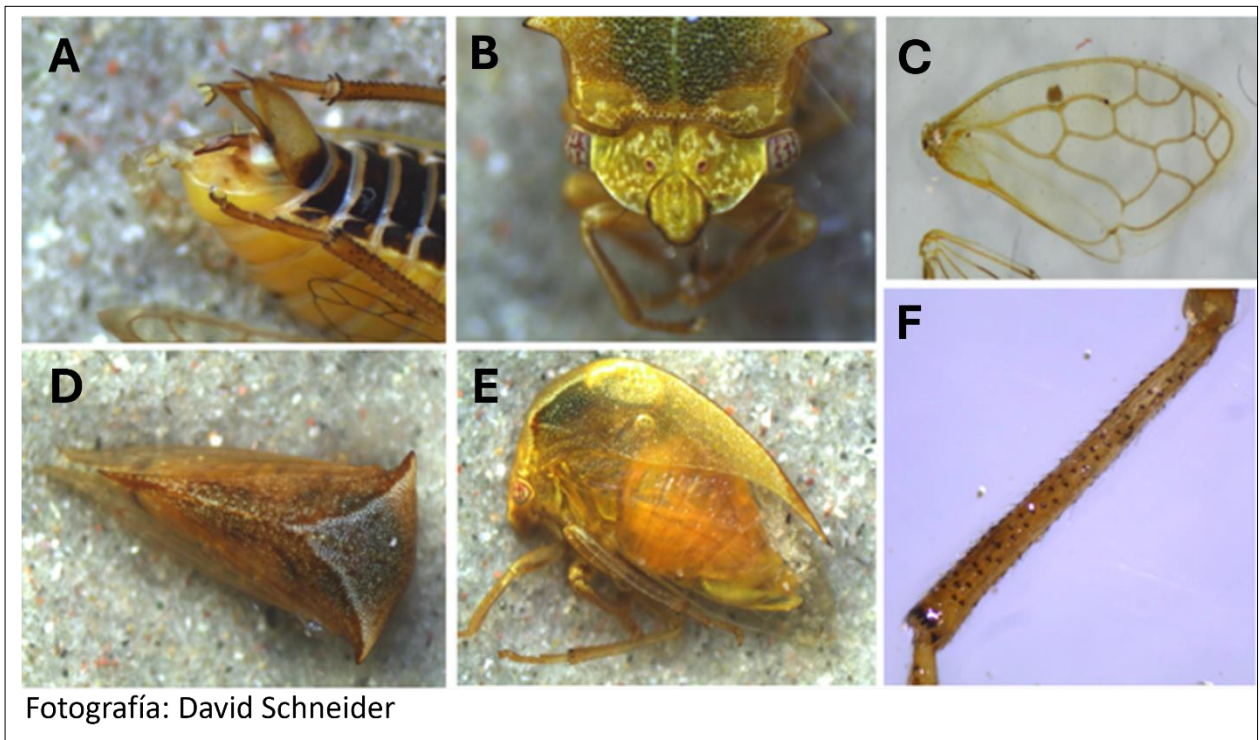


Figura 6. Rasgos morfológicos de membrácidos de la tribu Ceresini observados al estereoscopio para la identificación taxonómica. A) Vista lateral del abdomen y genitalia masculina. B) Vista anterior de la cabeza y cuernos pronotales. C) Patrón de las nervaduras de una de las alas anteriores. D) Vista dorsal y E) Vista lateral, donde se observa la elevación vertical del pronoto por encima de la cabeza con crestas laterales que se unen sobre el tórax. F) Filas de setas cuculadas en la tibia de la pata metatorácica.

La Figura 6 muestra un ejemplo del análisis morfológico en membrácidos. Con el fin de determinar el nivel especie, en algunos individuos se disectó la genitalia y se analizaron sus características. Se seleccionaron los especímenes de mayor relevancia en el estudio para su identificación mediante el “código de barras” molecular (Hebert et al., 2003), lo cual permitió confirmar las identificaciones morfológicas, comprender la diversidad ecológica de los membrácidos presentes en los viñedos de la región y evaluar si la capacidad de adquisición viral está relacionada con la especie.

2.5 Identificación molecular de los insectos

La región denominada el “código de barras” del gen I del citocromo C oxidasa mitocondrial (COI) sirvió para la identificación a nivel especie. En la PCR punto final, se utilizó el par de cebadores LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3', dirigidos a la amplificación de un fragmento del gen COI con una longitud aproximada de 710 pb (Folmer et al., 1994).

Se usó la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 95 °C durante 2 minutos; 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 90 segundos y 72 °C durante 90 segundos, con un paso de extensión final a 72 °C durante cinco minutos. Se utilizó bromuro de etidio como agente intercalante para la visualización de los productos amplificados en un gel de agarosa al 1%, con el tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) al 1X. Los productos de amplificación de ADN se enviaron a la empresa biotecnológica MacroGen (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación a través del método de Sanger en ambas direcciones. La edición, alineamiento y obtención de secuencias únicas se lograron con el programa bioinformático BioEdit. Las herramientas bioinformáticas “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)” (Altschul et al., 1990) y “The Barcode of Life Data System (BOLD)” (Ratnasingham y Hebert, 2007), permitieron el acoplamiento y la comparación de secuencias para hallar la identidad más probable. Específicamente, BOLD se especializa en la identificación mediante el código de barras genético, particularmente en la región 5' del gen COI. Además, este sistema ofrece un árbol de unión de vecinos, lo cual permite visualizar la colocación jerárquica del individuo.

2.6 Detección molecular de GRBV

Al inicio, se realizaron pruebas de detección viral de sondeo para obtener una visión general, debido al

carácter exploratorio de la investigación. En este contexto, los cuerpos enteros de cicadélidos pertenecientes a una misma especie y provenientes de un mismo viñedo, se trabajaron en grupos de 5-10 individuos, constituyendo cada uno la muestra en cuestión para la extracción del ADN total. Lo mismo se aplicó en las ninfas de membrácidos colectados en plantas no cultivadas del viñedo. Para membrácidos adultos, la extracción de ADN se hizo de forma individual a partir del cuerpo del insecto sin la genitalia. Por razones prácticas para la PCR en tiempo real, fue necesario combinar el ADN aislado de varios individuos (de cuatro a seis) con el fin de optimizar los tiempos y recursos. El criterio considerado para establecer las agrupaciones (también llamadas “pools”) fue el sitio de colecta. Cada vez que un pool resultaba positivo, se analizaban individualmente las muestras de ADN de los especímenes de dicho grupo. No obstante, al final se abrió el resto de los pools para detectar muestras positivas en caso de que alguna tuviera una carga viral muy baja.

2.6.1 Extracción de ácidos nucleicos de hemípteros y tejido vegetal

En la extracción de los ácidos nucleicos de cicadélidos, el ADN total se aisló siguiendo el “Protocolo de aislamiento de ADN total del piojo harinoso de la vid”, con fuente original Doyle y Doyle (1990), estandarizado en el Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE. Sin embargo, este protocolo se modificó para los membrácidos, donde la molienda se hizo manualmente con pistilos. En ambos casos, el ADN precipitado se resuspendió en 30 μL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DPEC).

El ADN total de las vides se aisló siguiendo las instrucciones del “Protocolo de aislamiento de ADN total de plantas de vid”, estandarizado en el Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE, modificado en 2022 y cuya fuente original es Lodhi et al. (1994). El ajuste principal realizado al protocolo original fue el uso del PowerLyzer 24 homogenizer (QIAGEN), en lugar de triturar manualmente el tejido vegetal con nitrógeno líquido, utilizando un mortero. El ADN precipitado se resuspendió en 50 μL de agua tratada con DPEC. La extracción del ADN de tejido vegetal se realizó por duplicado, y de cada muestra se seleccionó la réplica que presentaba mayor calidad (valores óptimos de concentración y pureza).

La concentración (≥ 50 ng/ μL) y la pureza del ADN (relación de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2.0) de insectos y plantas se comprobó por espectrofotometría con un NanoDrop (Thermo Scientific™). Para la PCR, se utilizó 1 μL de ADN diluido a 50 ng/ μL en un volumen total de 10 μL , lo que equivale a 50 ng de ADN en la reacción.

2.6.2 Diagnóstico de GRBV por PCR en tiempo real

La presencia de GRBV en el tejido vegetal y en hemípteros se determinó mediante PCR en tiempo real, utilizando dos réplicas técnicas por muestra. Para ello, se amplificó un fragmento del gen de la proteína de la cápside (CP) con los siguientes cebadores: CPfor (5'-AGCGGAAGCATGATTGAGACATTGACG-3', posiciones nucleotídicas 1073 a 1099) y CPrev (5'-AACGTATGTCCACTTGCAGAAGCCGC-3', posiciones nucleotídicas de 1329 a 1304), reportados por Krenz et al. (2014). Se usó la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las condiciones del termociclador se configuraron de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, el alineamiento a 61 °C durante 30 segundos y la extensión a 72 °C durante 15 segundos. Para la curva de disociación, se programó un gradiente de temperatura desde 65 °C hasta 95 °C, con incrementos de 0.5 °C cada 0.05 segundos.

El control positivo incluyó un plásmido que contiene un fragmento de GRBV (1.9 Kb) que incluye el gen de CP, aislado de vides en Baja California (Palacios Gutiérrez, 2019), y el ADN de vid infectada proveniente de uno de los sitios con presencia confirmada del virus. El control negativo fue la mezcla de la reacción de amplificación sin ADN. El control interno de la calidad del ADN de vid se evaluó bajo las mismas condiciones de termociclado utilizadas en la detección viral con los cebadores: Rbc1-F (5'-TAC TTG AAC GCT ACT GCA G-3') y Rbc1-R (5'-CTG CAT GCA TTG CAC GGT G -3'), que amplifican un fragmento del gen de la enzima rubisco (Gambino y Gribaudo, 2006). En los membrácidos se utilizó el par de cebadores Sf18SFor (5'-GTGAGGTCTTCGGACTGGTG-3') y Sf18Srev (5'-GGTTCACCTACGGAAACCTTG-3') que empleó Flasco et al. (2023a) con el fin de amplificar un fragmento del gen del ADNr del periquito tricornudo de la alfalfa. La funcionalidad de estos cebadores en membrácidos de otras especies, se corroboró mediante el acoplamiento con dichas secuencias en el BLAST. El control interno del ADN de cicadélidos se evaluó por amplificación del gen COI por PCR en punto final como se describió arriba.

Se consideraron como positivas aquellas muestras que presentaron un valor de Cq menor a 30 ciclos de amplificación con un umbral de 60 unidades relativas de fluorescencia (RFU), valores de temperaturas de disociación (Tm) dentro del rango de referencia establecido para muestras positivas a GRBV (84.0 ± 1 °C) y una fluorescencia superior al valor umbral 50 d (RFU)/dT en la curva de disociación.

2.7 Ensayos de transmisión

2.7.1 Obtención y mantenimiento de vides sanas e infectadas con GRBV

El material vegetal donante del virus provino de esquejes colectados en el sitio C, los cuales se confirmó que estaban infectados mediante PCR en tiempo real. Estas plantas se mantuvieron en hidroponía a temperatura ambiente. Por otro lado, las vides receptoras certificadas como libres de GRBV se adquirieron en EE. UU. (Guillaume Grapevine Nursery), y se mantuvieron aisladas dentro de una tienda en el invernadero para protegerlas de patógenos. Además, fueron monitoreadas y regadas de manera sistemática, según el nivel de humedad del sustrato, y se les aplicó fertilizante cada mes. También se les realizó un diagnóstico de GRBV mediante PCR en tiempo real para confirmar que estuviesen libres del virus.

2.7.2 Obtención y mantenimiento de membrácidos

Los insectos utilizados en los ensayos de transmisión se obtuvieron en el sitio C, no solo se muestrearon individuos de la tribu Ceresini en las vides, sino que también se encontraron especímenes de la tribu Hypsoprini habitando en plantas nativas conocidas como arbusto del coyote (*Baccharis pilularis*). Los insectos se transportaron en contenedores de plástico de 950 mL con tapas de malla, junto con fragmentos de las plantas de origen. Al llegar al laboratorio, se trasladaron a macetas protegidas con malla que contenían arbustos de coyote, una planta nativa no hospedera de GRBV (Wilson et al., 2022). Allí se mantuvieron hasta el momento del ensayo; ya que, según lo observado en campo, los membrácidos tienen una gran afinidad con esta planta.

2.7.3 Normalización de condiciones experimentales para ensayos de transmisión

Inicialmente, se estableció una colonia de membrácidos utilizando plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y alfalfa (*Medicago sativa*) como hospederos de crianza y alimentación para los insectos (Beyer et al., 2017). Con este fin, se realizaron repetidas visitas al sitio C, enfocadas a la colecta manual de membrácidos que habitaban en la planta arbusto del coyote. En uno de los muestreos se capturaron 18 adultos y 32 ninfas de la tribu Ceresini y especies no identificadas. La baja tasa de aclimatación de los insectos para el

establecimiento de una colonia condujo a la búsqueda de alternativas más sencillas para poner en marcha el ensayo de transmisión y garantizar que los membrácidos sobrevivieran el mayor tiempo posible. En este sentido, se realizaron dos prácticas previas al ensayo final para estimar el mínimo de tiempo necesario que los insectos debían permanecer en cada etapa de la transmisión, así como optimizar el diseño y las condiciones de las jaulas. En la primera práctica, se utilizaron los membrácidos que sobrevivieron durante el establecimiento de la colonia (nueve adultos y cinco ninfas), en un ensayo con un período de acceso a la adquisición (AAP) de siete días y un período de acceso a la inoculación (IAP) de cuatro días. En la segunda práctica, se utilizaron cuatro individuos adultos de la tribu Ceresini y 25 ninfas de la tribu Hypsoprini, y el tiempo de AAP se redujo a tres o cuatro días para asegurar que una mayor cantidad de individuos avanzara a la siguiente etapa.

2.7.4 Ensayos de transmisión finales

En el ensayo de transmisión final participaron 17 membrácidos de la tribu Ceresini y 158 de la Hypsoprini, que se alimentaron de vides infectadas con un AAP máxima de cuatro y tres días, respectivamente (Figura 7). Posteriormente los insectos se transfirieron a nuevas jaulas con hojas provenientes de vides receptoras, durante un IAP de cuatro días para ambos grupos. Las jaulas se diseñaron de tal manera que una parte de los peciolo de las vides quedaba sumergida en agua estéril, en el interior de viales de recolección de 2 mL y 0.6 mL recubiertos por un parafilm al cual se le hizo un orificio manteniendo el peciolo en posición vertical. En algunos casos, también se colocaron peciolo en la base del recipiente, facilitando que los insectos tuvieran mayor acceso a ellos. Se realizó un monitoreo y conteo sistemático de los insectos, y a medida que los membrácidos morían, se retiraban de las jaulas. Dado que la población de hypsoprinis era considerablemente mayor, se agruparon según la fecha de fallecimiento para su conservación, y bajo este mismo criterio se hicieron pools de individuos para la extracción de ADN. En el caso de los ceresinis, los ácidos nucleicos se aislaron de forma individual y la detección molecular se realizó en pools, agrupados según la fecha en que los insectos muertos fueron extraídos de la jaula durante el experimento. Los membrácidos que completaron el ensayo se analizaron de manera individual en la detección viral, debido a su relevancia en el experimento. Las vides receptoras no se retiraron hasta el final, incluyendo aquellas cuyos insectos no sobrevivieron. Esto se hizo para maximizar la posibilidad de replicación viral en caso de que hubiera ocurrido la transmisión, y así aumentar la probabilidad de detección del GRBV. Al finalizar el ensayo, tanto los membrácidos conservados en etanol absoluto como las vides receptoras se almacenaron a -20°C hasta el diagnóstico de GRBV por PCR en tiempo real. Puesto que todos los insectos estuvieron en contacto con vides positivas durante un tiempo determinado, se les

realizó el diagnóstico para verificar si, al menos, habían ingerido las partículas virales durante ese AAP y en esas condiciones.

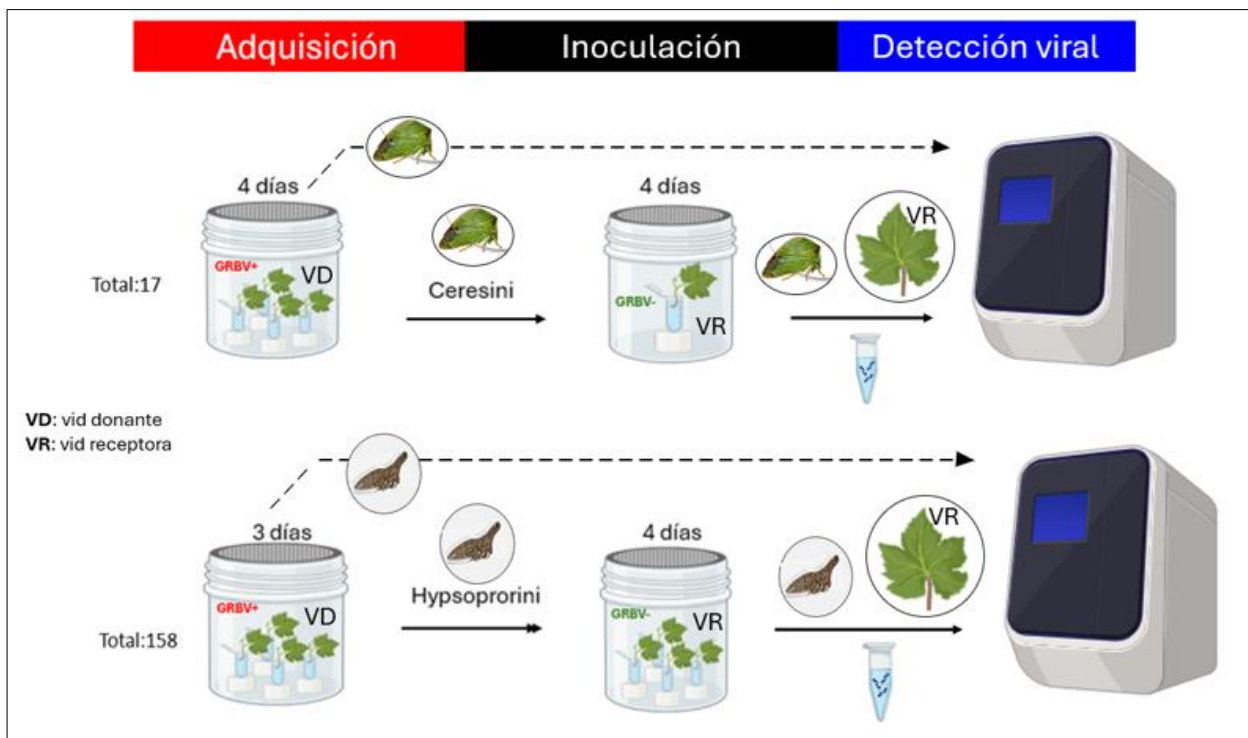


Figura 7. Diseño experimental de ensayo de transmisión final. Tiempos de adquisición (AAP) e inoculación (IAP).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Prospección de potenciales vectores de GRBV

De febrero a noviembre de 2023 se realizaron las salidas a campo para la búsqueda de insectos vectores. Los sitios con confirmación previa de la presencia de GRBV se muestran en color morado en la Figura 8. Estos viñedos (B, D y E) se ubican en la región del Valle de Guadalupe y Ojos Negros. En el sitio B se colectaron aproximadamente 500 cicadélidos; sin embargo, el cuadrante previamente diagnosticado había sido asperjado con insecticida al momento de la visita. Como alternativa, se realizó el muestreo sobre el dosel de vides sintomáticas en un cuadrante contiguo y en el borde del viñedo, cercano a la vegetación nativa. Debido a esto, fue necesario tomar muestras de algunas de las vides sobre las cuales se aspiró, para corroborar que también estaban infectadas con GRBV. En los viñedos D y E, únicamente se obtuvieron artrópodos de otros órdenes, como hormigas y arañas. Aunque estos se visitaron repetidamente, no siempre fue posible el muestreo debido a que el lugar había sido tratado previamente con insecticida.

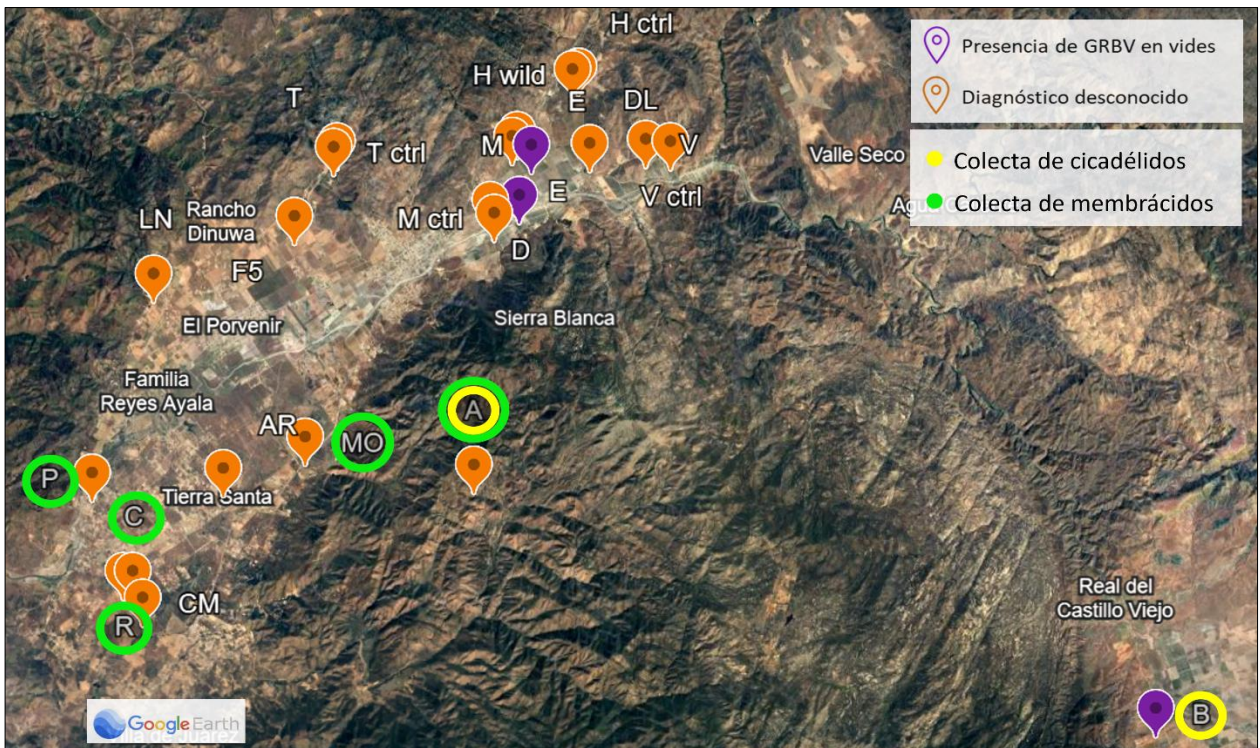


Figura 8. Distribución de los 23 sitios seleccionados para el estudio de prospección de hemípteros portadores de GRBV en el Valle de Guadalupe, Baja California, México. Se indican los sitios con y sin previo diagnóstico molecular de GRBV en vides, así como la presencia de insectos de las familias Cicadellidae y Membracidae.

La Figura 8 muestra en color naranja los 20 sitios localizados en el Valle de Guadalupe que no tenían diagnóstico previo de GRBV. Por cuestiones prácticas, se comenzó el estudio en viñedos con presencia de síntomas (A, C, H y T), donde se tomaron muestras de vides sospechosas. Luego, la investigación se extendió al resto de los sitios. Finalmente, se obtuvo un total de 30 membrácidos adultos que se encontraban en vides cultivadas en cinco regiones (A, C, P, R y MO), señalados en verde en la Figura 8. Además, se colectaron aproximadamente 300 cicadélidos en el sitio A. Tanto en la vegetación cultivada como en la nativa del sitio C se muestrearon membrácidos manualmente para preservarlos con vida y utilizarlos en los ensayos de transmisión.

3.1.1 Identificación morfológica

Se identificaron los cicadélidos del sitio A y B como chicharrita de la vid occidental (*Erythroneura elegantula*) (Figura 9). Además, se encontraron membrácidos de la tribu Ceresini y para su identificación precisa se disectó la genitalia (Figura 10). Los insectos capturados en la vegetación nativa del sitio C se identificaron como *Spissistilus nigricans* (Figura 11); mientras que los individuos muestreados en las vides pertenecieron al género *Tortistilus*. Adicionalmente, se identificó a *Philya californiensis* dentro de la tribu Hypsopropini.

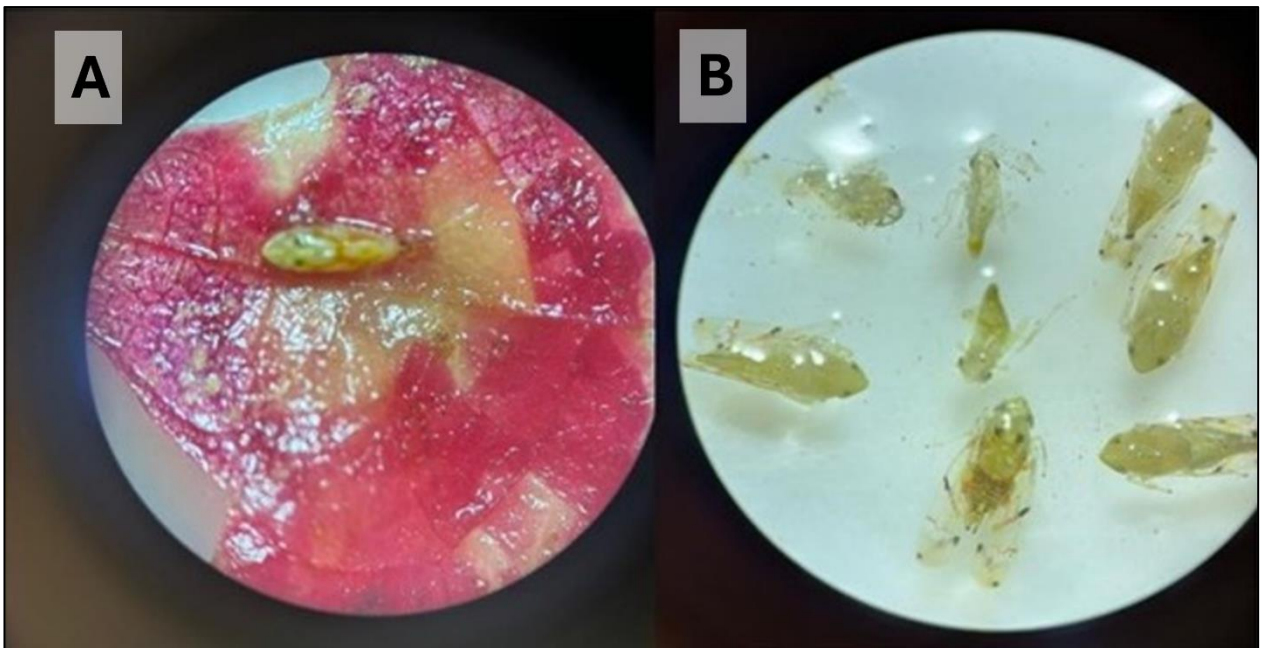


Figura 9. Fotografías tomadas bajo un microscopio estereoscópico a magnificación 5X de chicharritas de la vid occidental (*Erythroneura elegantula*) colectados en los sitios A y B.



Figura 10. Fotografías mostrando el punto de disección de la genitalia de membrácidos para la identificación morfológica de la especie. El resto del cuerpo se destinó a la detección molecular de GRBV.

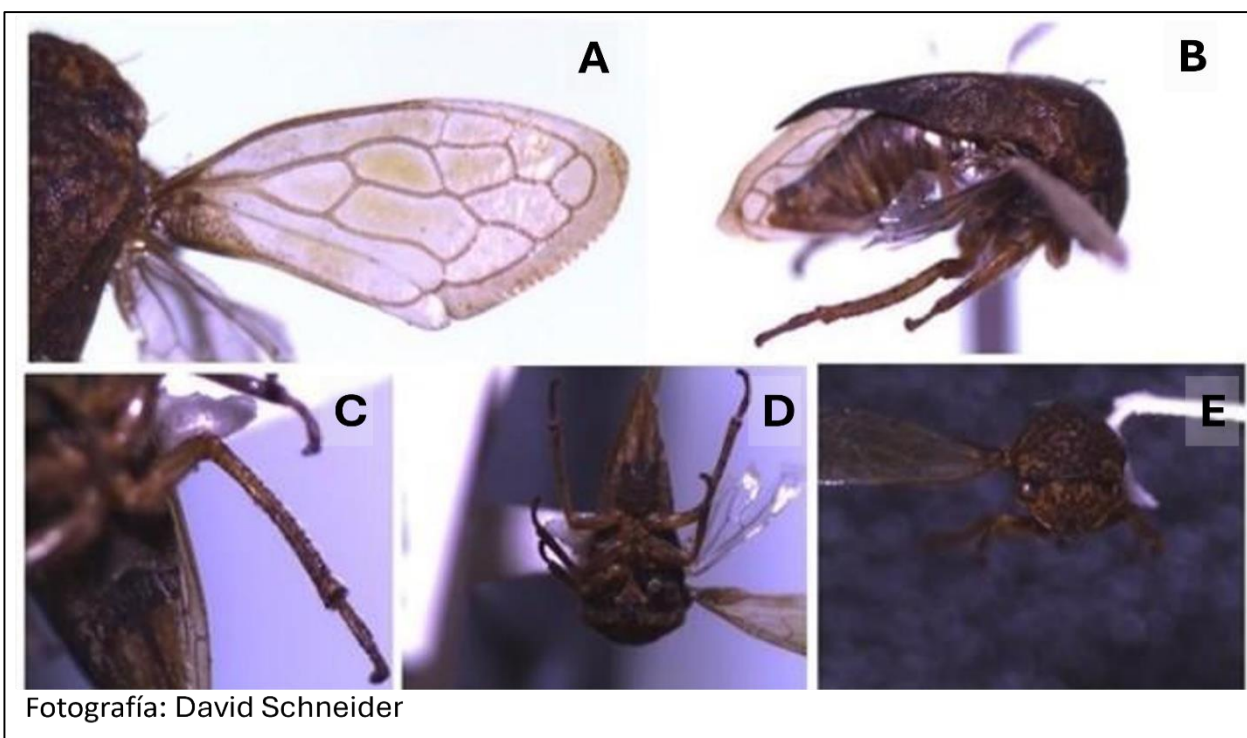


Figura 11. Hembra de la especie *Spissistilus nigricans* colectada en una planta nativa cercana a las vides cultivadas del sitio C. A) Vista dorsal, que muestra el patrón de nervaduras del ala anterior derecha. B) Vista lateral, que muestra el cuerpo completo del individuo. C) Vista ventral de la genitalia y pata metatorácica. E) Vista ventral del insecto completo. D) Vista frontal de la cabeza, el pronoto y el ala anterior derecha.

Los individuos del género *Tortistilus* se pudieron clasificar en distintos morfotipos que variaban en cuanto a coloración y presencia o ausencia de cuernos pronotales (no se cuantificó, se analizó con carácter cualitativo). Para esclarecer si estábamos o no en presencia de varias especies, se agruparon los individuos de acuerdo con el morfotipo representativo para la identificación molecular.

3.1.2 Detección molecular de GRBV

3.1.2.1 Diagnóstico de GRBV en vid

En el sitio B ya se había confirmado la presencia de GRBV en un cuadrante específico; sin embargo, la detección viral en cinco vides sintomáticas de nuevos cuadrantes confirmó presencia del virus en otras áreas de este viñedo. En los viñedos A y C se corroboró que los síntomas observados se debían a la infección por GRBV. Los esquejes del sitio C que resultaron infectados se utilizaron como material donante de virus en el ensayo de transmisión. Todas las muestras amplificaron el fragmento del gen correspondiente a rubisco.

3.1.2.2 Diagnóstico de GRBV en insecto

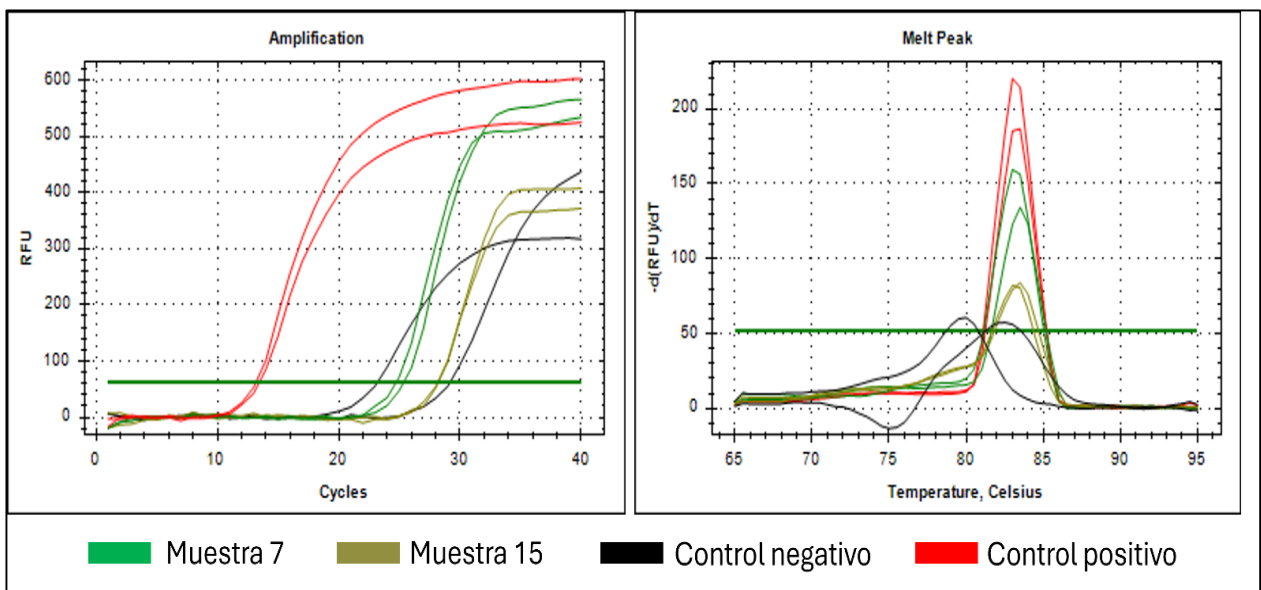


Figura 12. Curvas de amplificación. Membrácidos portadores de GRBV en la prospección.

Tabla 1. Membrácidos colectados en sitios de prospección. Identificación taxonómica y diagnóstico molecular.

| | Mes de colecta (2023) | Viñedo | Identificación | | Diagnóstico de GRBV PCR tiempo real |
|----|-----------------------|----------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| | | | Molecular (especie) | Morfológica (género) | |
| 1 | Julio | A | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 2 | Mayo | C | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 3 | Mayo | C | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 4 | Mayo | C | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 5 | Mayo | C | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 6 | Mayo | R | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 7 | Julio | A | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + |
| 8 | Mayo | P | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 9 | Junio | A | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 10 | Junio | A | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 11 | Junio | A | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 12 | Junio | A | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 13 | Junio | R | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 14 | Junio | R | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 15 | Junio | C | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + |
| 16 | Junio | C | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 17 | Junio | R | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 18 | Junio | R | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 19 | Junio | P | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 20 | Junio | P | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 21 | Julio | MO | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 22 | Julio | A | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 23 | Julio | A | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 24 | Mayo | C | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 25 | Mayo | MO | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 26 | Mayo | R | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 27 | Mayo | MO | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 28 | Mayo | R | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | - |
| 29 | Mayo | R | na | <i>Tortistilus</i> | - |
| 30 | Mayo | R | na | <i>Tortistilus</i> | - |

na: no aplica ya que el ADN del individuo no se secuenció.

Los cíadelidos obtenidos en los sitios A y B resultaron negativos para GRBV, al igual que los membrácidos de la tribu Ceresini colectados en plantas nativas. La Tabla 1 muestra la información correspondiente a los 30 membrácidos recolectados en los sitios sin diagnóstico previo, así como los resultados de la detección del genoma viral mediante PCR en tiempo real. Se obtuvieron dos individuos portadores del virus: uno en el sitio A y otro en el sitio C, con una prevalencia de 6.67%, lo que coincidió con el diagnóstico positivo en las vides de esas regiones. En la Figura 12 se observan las curvas de amplificación y disociación de los

individuos portadores del virus. El fragmento del genoma correspondiente al gen COI y al gen 18S se amplificó en todos los ejemplares de cicadélidos y membrácidos, respectivamente.

3.2 Ensayos de transmisión

Dada la dificultad para mantener vivos a los hemípteros durante períodos prolongados, el protocolo diseñado para el ensayo de transmisión final se basó en la experiencia y observación del comportamiento y adaptabilidad de los individuos a los recursos y condiciones a las que fueron sometidos durante los ensayos preliminares descritos en la sección de metodología. Las jaulas se acondicionaron de manera que los membrácidos estuvieran en un ambiente óptimo (Figura 13). De los 17 *Ceresinis*, ocho sobrevivieron al AAP; de estos, solo dos finalizaron el ensayo, permaneciendo en su planta receptora durante cinco días adicionales hasta su muerte. Esto se hizo para observar su tiempo de supervivencia y comparar los resultados del diagnóstico viral entre vides receptoras expuestas a más o menos días de inoculación. Por otro lado, de los 158 *hypsoprorinis* dos completaron el IAP. Finalmente, se detectó la presencia de GRBV en nueve membrácidos de la tribu *Ceresini* y en un pool de dos membrácidos de la tribu *Hypsoprorini*. Sin embargo, el virus no fue detectable en ninguna de las vides receptoras. La Tabla 2 muestra los resultados de la detección viral de los membrácidos y sus vides receptoras en el ensayo de transmisión final.

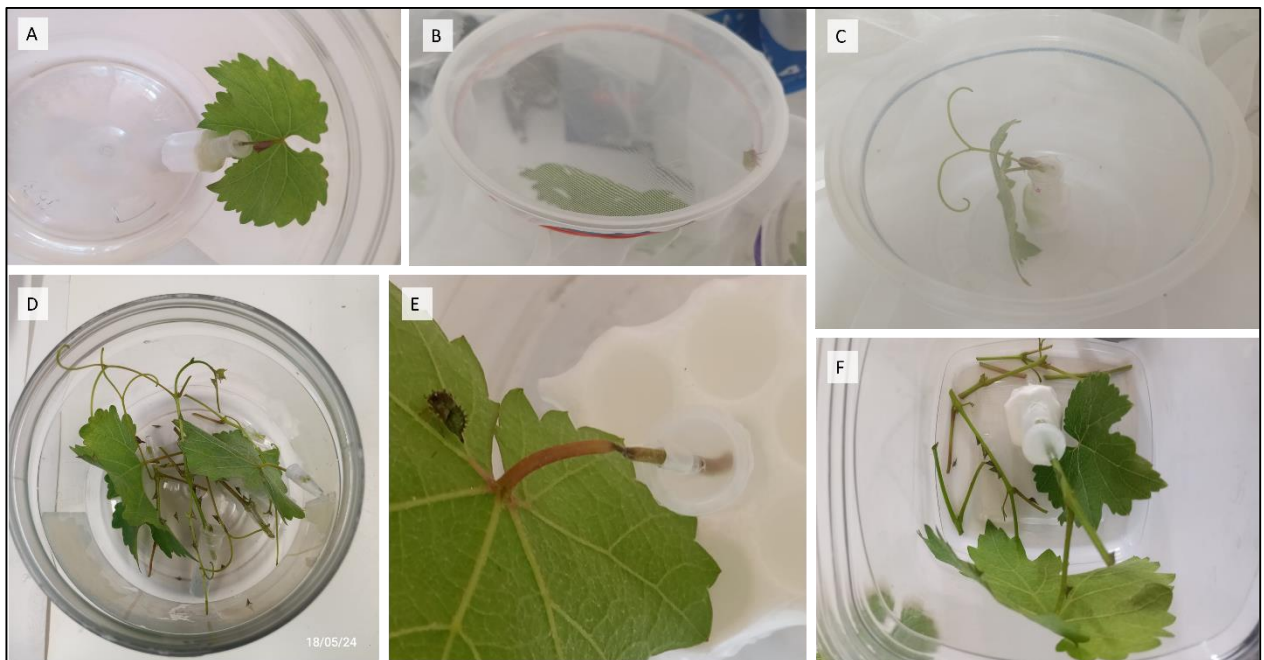



Figura 13. Fotografías representativas del diseño de las jaulas para los ensayos de transmisión con membrácidos: A, B, C, E: tribu *Ceresini*. D, F: tribu *Hypsoprorini*.

Tabla 2. Diagnóstico molecular de membrácidos y vides receptoras del ensayo de transmisión

| | Individuos por tubo de extracción | AAP (días) | IAP (días) | Identificación molecular (Género o especie) | Identificación morfológica (Género o especie) | Diagnóstico de GRBV por PCR en tiempo real | |
|----|-----------------------------------|------------|------------|---|---|--|---------------|
| | | | | | | Membrácido | Vid receptora |
| 1 | 1 a | 4/4 d | 9/4 d | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 2 | 1 a | 4/4 d | 9/4 d | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 3 | 1 a | 4/4 d | < 1/4 d | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 4 | 1 a | 4 /4 d | < 1/4 d | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 5 | 1 a | 4/4 d | < 1/4 d | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 6 | 1 a | 4/4 d | < 1/4 d | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 7 | 1 a | 4/4 d | < 1/4 d | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 8 | 1 a | 4/4 d | < 1/4 d | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 9 | 1 a | 2-4 /4 d | | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 10 | 1 a | 2-4 /4 d | | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 11 | 1 a | 2-4 /4 d | | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 12 | 1 a | 2-4 /4 d | | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 13 | 1 a | 2-4 /4 d | | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 14 | 1 a | 2-4 /4 d | | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 15 | 1 a | 2-4 /4 d | | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 16 | 1 a | 2-4 /4 d | | <i>Tortistilus wickhami</i> | <i>Tortistilus</i> | + | - |
| 17 | 1 a | 2-4 /4 d | | na | <i>Tortistilus</i> | - | - |
| 18 | 6 n* | 3/3 d | 3/4 d | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 19 | 1 a | 3/3 d | 3/4 d | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 20 | 18 n* | 3/3 d | 2/4 d | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 21 | 18 n* | 3/3 d | 2/4 d | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 22 | 15 n* | 3/3 d | | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 23 | 15 n* | 3/3 d | | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 24 | 1 a | 3/3 d | | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 25 | 40 n* | 2/3 d | | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 26 | 40 n* | 2/3 d | | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 27 | 1 a | 2/3 d | | na | <i>Philya californiensis</i> | - | - |
| 28 | 2 n* | 3/3 d | 4/4 d | <i>Philya</i> | <i>Philya californiensis</i> | + | - |

AAP: período de acceso a la adquisición, **IAP:** período de acceso a la inoculación, **a:** adulto, **n:** ninfa, **d:** días, **/:** se utiliza para indicar cuantos días sobrevivió (izquierda) del total programado (derecha), : murió antes de esa etapa del ensayo, **na:** no aplica, debido a que el ADN del individuo no se secuenció, **<:** menos del tiempo que se indica. *: solo un individuo representativo se envió a secuenciar para la identificación molecular.

3.3 Identificación molecular de los insectos

Para la identificación molecular de especies de membrácidos que adquirieron el GRBV en los ensayos de transmisión y de algunos que participaron en el estudio de prospección, se amplificó y secuenció el fragmento correspondiente al gen COI. En la Figura 14 se observan las bandas de aproximadamente 710 pb correspondientes al amplicón, en un gel de agarosa al 1%. La muestra del carril 15 superior no se cargó correctamente en el pozo, por lo que no se visualiza la banda.

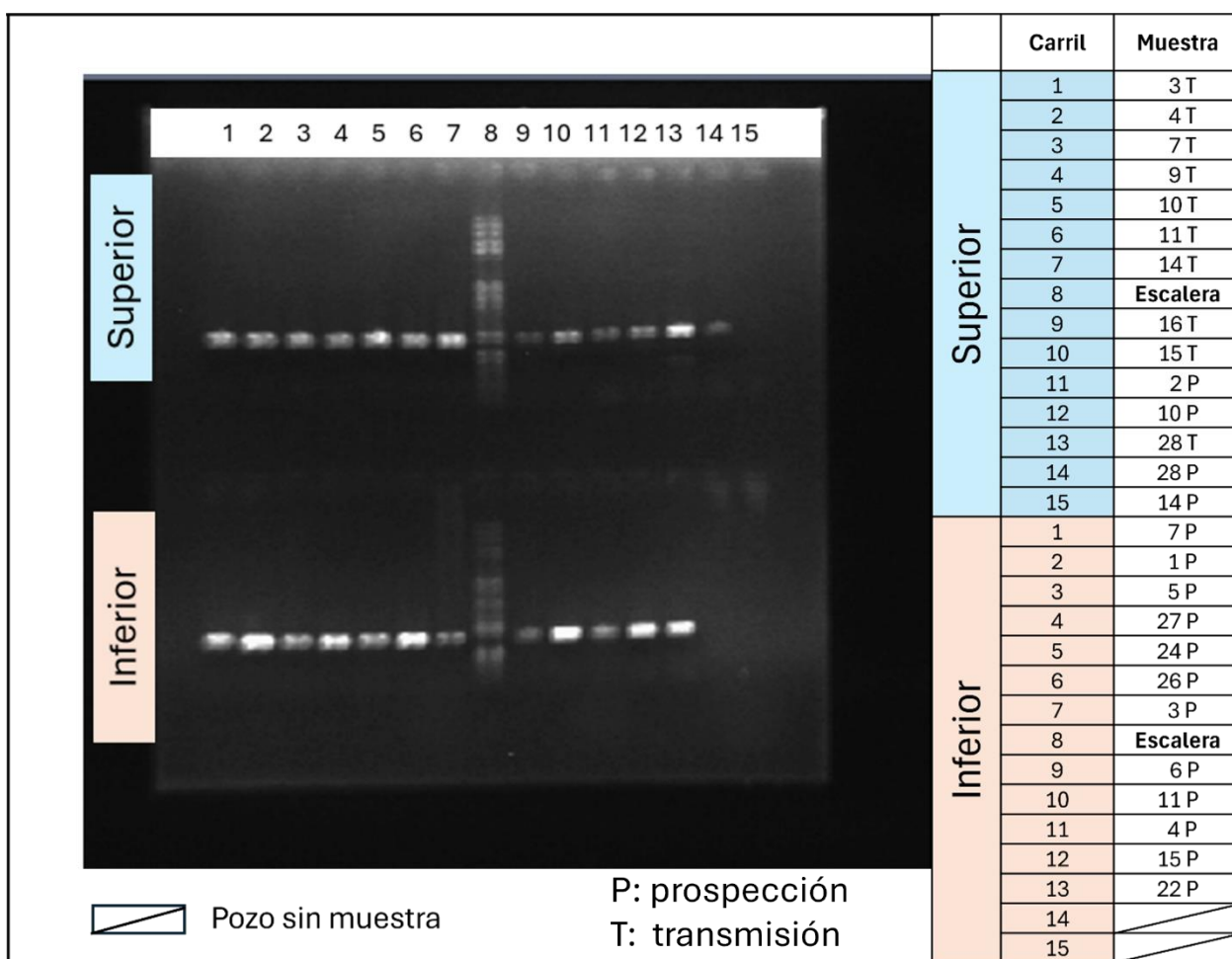


Figura 14. Amplificación de un fragmento del gen COI (710 pb) observado en gel de agarosa al 1%.

En algunas muestras, el análisis de las secuencias sólo fue posible en una dirección debido a la baja calidad

de la amplificación a partir de uno de los cebadores. Los ceresinis de ambas líneas de investigación del proyecto se identificaron como miembros de la especie *Tortistilus wickhami* (Figura 15), con porcentajes de identidad que varían entre 99 y 100 % en el alineamiento con las secuencias homólogas de la base de datos del BOLD. Esta herramienta generó un árbol filogenético, el cual se presenta en el Anexo A, donde se observa que los individuos de la especie *T. wickhami* de este estudio están más relacionados con los individuos de California, EE. UU., en comparación con los especímenes de Canadá, lo cual es coherente dada la proximidad geográfica.

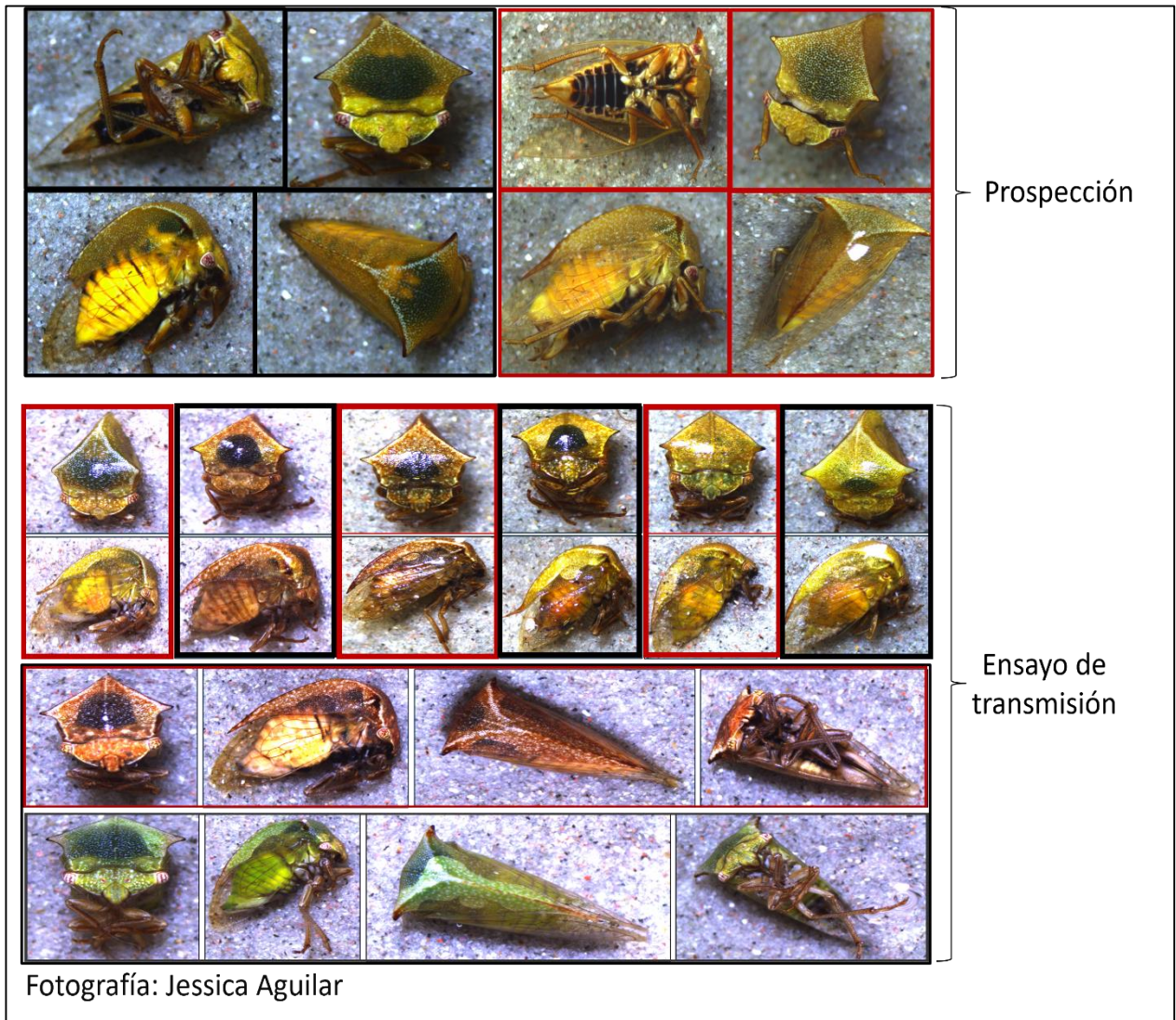


Figura 15. Ejemplo de membrácidos de la tribu Ceresini de la especie *Tortistilus wickhami* que resultaron positivos a GRBV durante el desarrollo de este trabajo.

Por otro lado, los resultados del análisis a partir de la base de datos BLAST coinciden con *T. wickhami* como identidad más probable. Sin embargo, las secuencias homólogas disponibles se amplificaron con

cebadores distintos a los utilizados en este estudio, por lo que, salvo las secuencias completas del gen mitocondrial, el resto cubría el alineamiento aproximadamente en un 62 %. No obstante, también se obtuvo un alto porcentaje de identidad que varió desde 98.62 a 99.18 % y un valor E de cero, lo que confirma que el alineamiento no fue producto del azar. En cuanto a la secuencia de los hypsopróninis (Figura 16), se identificaron como *Philya* con un 93% de identidad y un valor E igual a $1e^{-135}$.

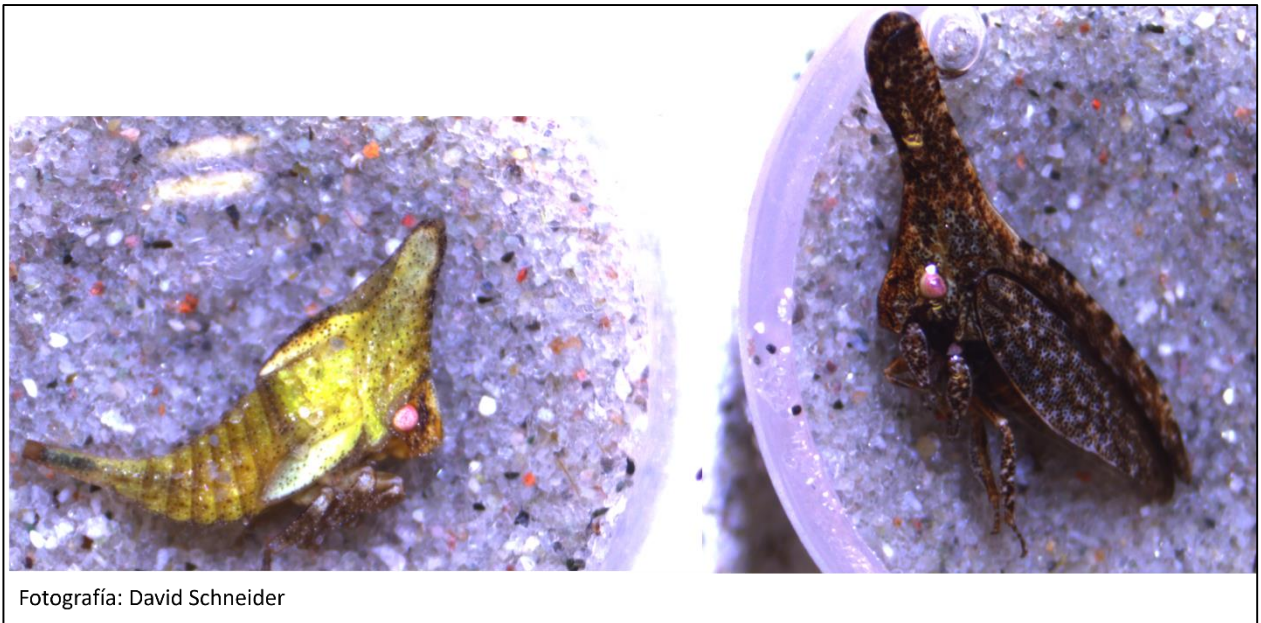


Figura 16. Membrácidos de la tribu Hypsoprónini de la especie identificada como *Philya californiensis*.

Las Tabla 1 y la Tabla 2 resumen los resultados obtenidos en la prospección de insectos y el ensayo de transmisión, respectivamente. En ambos casos se compararon la identificación morfológica y molecular de los membrácidos; de manera que las dos metodologías se complementaron para determinar la taxonomía precisa de los individuos en este estudio. Además, se observan los resultados de la detección viral en insectos y en vides receptoras (ensayos de transmisión).

3.4 Discusión

3.5 Prospección de potenciales vectores de GRBV

El propósito de la presente investigación fue identificar posibles vectores de GRBV en viñedos de Baja California. Los antecedentes bibliográficos referentes a insectos de Nueva York y California han señalado la presencia del virus en diferentes taxones de Hemiptera: Aphididae, Cixiidae, Delphacidae, Membracidae y Phylloxeridae, así como en más de 17 especies de Cicadellidae (Cieniewicz et al., 2019; Wilson et al., 2022). En este proyecto nos enfocamos en cicadélidos y membrácidos, ya que la literatura ha reportado la transmisión viral en dichas familias taxonómicas (Flasco et al., 2023b). El muestreo se realizó de febrero a octubre de 2023, abarcando más de 20 sitios, de los cuales seis presentaban los hemípteros de interés. En dos viñedos se colectaron cicadélidos identificados morfológicamente como chicharrita de la vid occidental (*E. elegantula*), cuya detección viral por PCR en tiempo real resultó negativa. Sin embargo, al momento de la colecta, estos insectos habitaban en vides infectadas con GRBV, por lo que es importante resaltar que no se encontró una relación virus–insecto que evidenciara a los cicadélidos como vectores de la enfermedad de la mancha roja de la vid. Aunque *E. ziczac*, conocida comúnmente como la chicharrita de la parra de Virginia, fue el primer insecto reportado como transmisor del virus (Poojari et al., 2013), la replicación de este resultado no tuvo éxito en estudios posteriores (Bahder et al., 2016a; Kahl et al., 2021). En concordancia con nuestra investigación, algunos autores no detectaron el GRBV en la chicharrita de la vid occidental ni en la chicharrita de la parra de Virginia durante varias temporadas de crecimiento en viñedos con propagación viral (Cieniewicz et al., 2018; Cieniewicz et al., 2019; Wilson et al., 2022). Además, se ha documentado que la chicharrita de la parra de Virginia se alimenta principalmente del mesófilo (Saguez et al., 2015), mientras que GRBV está restringido al floema (Rwahnih et al., 2013). Esto demuestra la falta de evidencia experimental que respalde de manera convincente la capacidad de los cicadélidos para actuar como vectores del GRBV (Flasco et al., 2023b).

Durante mayo, junio y julio de 2023, se colectaron en cuatro viñedos del Valle de Guadalupe 30 membrácidos adultos de la tribu Ceresini, identificados molecularmente como miembros de la especie *T. wickhami*. Según Hoyle et al. (2024), el género *Tortistilus* se distribuye en todo el noroeste del Pacífico, siendo *T. wickhami* más común en el norte y *T. pacificus* en el sur de California. Estos autores documentaron picos poblacionales de *T. wickhami* en junio y julio en viñedos del norte de California. Por su parte, Dalton (2020) indicó que la eclosión de los huevos de insectos de la especie *T. albidosparsus*

ocurre entre abril y mayo, y los adultos emergen a finales de junio o principios de julio. En contraste con lo anterior, y coincidiendo con nuestro estudio, Zalom et al. (2018) señalaron que los adultos de la especie *T. albidosparsus* son más frecuentes durante mayo y junio. En nuestras visitas a campo se observaron adultos en las vides desde mayo, siendo este el mes con mayor número de especímenes recolectados. Estas variaciones fenológicas entre individuos de la misma especie o de especies cercanas podrían explicarse por diferencias geográficas que implican variaciones en factores climáticos, como la temperatura (Dalton, 2020).

En dos viñedos con presencia de GRBV, se identificaron membrácidos de la especie *T. wickhami* positivos al virus, uno en cada viñedo, en junio y julio, respectivamente. Esto coincide con Hebert et al. (2003), quienes refieren que es poco probable que la captación y transmisión del virus por los vectores de GRBV ocurra antes de los meses mencionados. También concuerda con Cieniewicz et al. (2018), quienes detectaron el virus en el periquito tricornudo de la alfalfa a partir de junio en dos años consecutivos. En ese mismo mes, los autores observaron, por primera vez, los anillos producidos mediante la alimentación de los insectos en las vides. La dinámica estacional del periquito tricornudo de la alfalfa sugiere que, cuando los hospederos alimentarios escasean en el viñedo, este migra al dosel de la vid para alimentarse y puede adquirir GRBV de las plantas infectadas (Preto et al., 2019). La prevalencia de membrácidos positivos de *T. wickhami* en nuestro trabajo fue del 6.7% (2/30). De manera similar, Hoyle et al. (2024) reportaron un 6% (48/758) para individuos de esta misma especie y un 23% (59/259) para el periquito tricornudo de la alfalfa. Además, estos autores encontraron que, a diferencia de este último, *T. wickhami* mantuvo tasas similares de ingestión viral entre hembras y machos, lo que sugiere un comportamiento distinto al del periquito tricornudo en los viñedos.

3.6 Ensayos de transmisión

Los resultados obtenidos durante la prospección de insectos como potenciales vectores del GRBV fueron cruciales para el cumplimiento del segundo objetivo de este estudio. El diagnóstico negativo de cicadélidos colectados en vides infectadas, en contraste con la detección positiva en membrácidos, nos llevó a centrar el ensayo de transmisión en estos últimos. La capacidad de los individuos de *T. wickhami* para ingerir las partículas virales en campo, así como su cercanía filogenética con el periquito tricornudo de la alfalfa, refuerza la hipótesis de que los membrácidos *T. wickhami* podrían ser vectores potenciales en la transmisión del virus. Los resultados mostraron que tanto individuos de la especie *T. wickhami* como *P. californiensis* portaban el virus después de alimentarse de vides infectadas, con un AAP máxima de cuatro

y tres días, respectivamente. Sin embargo, no se detectó la presencia viral por PCR en tiempo real en las vides receptoras que estuvieron en contacto con los insectos durante un máximo de cuatro días, en ambos casos. La tasa de ingestión de GRBV en insectos de la especie *T. wickhami* durante el AAP fue de 52.94% (9/17). Algunos investigadores han reportado una tasa de 75% (15/20) para el periquito tricornudo después de alimentarse de vides positivas durante 48 horas (Bahder et al., 2016a). Mientras que membrácidos de *T. albidosparsus* portaron el virus en un 60 % (3/5) en invernadero y un 25% (1/4) en el laboratorio, en ambos ensayos con un AAP de 6 días (Dalton, 2020). La capacidad vectorial de un insecto solo se confirma mediante ensayos de transmisión controlados y replicados (Kahl et al., 2021). En el caso de los virus persistentes, es esencial que el AAP y el IAP sean suficientes para superar el período de latencia (Flasco et al., 2021). Basado en nuestros resultados respecto al tiempo de supervivencia de los insectos en los ensayos preliminares y a los tiempos empleados en otros estudios, en este proyecto se diseñaron AAP e IAP lo más cortos posibles para garantizar que la mayor cantidad de individuos completaran el experimento. Sin embargo, algunos Ceresinis que adquirieron el virus murieron durante el AAP, y otros no finalizaron el ensayo, ya que aquellos que ingirieron las partículas virales sólo sobrevivieron un día durante el IAP, tiempo insuficiente para lograr una transmisión exitosa de un virus como el GRBV. En la literatura, los rangos de AAP e IAP de los ensayos de transmisión de GRBV varían desde 48 horas hasta varias semanas (Flasco et al., 2023b). El uso de un AAP subóptimo genera incertidumbre con respecto a si el tiempo empleado es suficiente para que el virus transite a través del cuerpo del insecto y llegue a las glándulas salivales tras la exposición a una vid infectada, lo que limita la capacidad de transmisión hacia las vides receptoras (Flasco et al., 2023b). En este sentido, Flasco et al. (2021) describen que el GRBV es detectable en el intestino del periquito tricornudo de la alfalfa a los cinco días, en la hemolinfa a los ocho días y en la cabeza y las glándulas salivales a los 10 días. No obstante, se puede esperar una variabilidad en el AAP, dependiendo del par geminivirus-vector (Whitfield et al., 2015). Según Flasco et al. (2023b), dado el modo de transmisión viral persistente no propagativo demostrado en el periquito tricornudo de la alfalfa, la detección del virus en las glándulas salivales es el estándar de oro para evaluar la competencia vectorial de los insectos con GRBV. En este contexto, ninguna de las cabezas con glándulas salivales de individuos de *T. wickhami* (0 %, 0/50) dieron positivo para GRBV en PCR múltiple y qPCR en el estudio de Hoyle et al., (2024). Sin embargo, los resultados de las pruebas de qPCR del experimento de Zalom et al., (2019) indicaron que uno de los 20 adultos *T. albidosparsus* recolectados tanto en vides infectadas como sanas resultó positivo para GRBV en el abdomen y las glándulas salivales, lo que ofrece una posibilidad del 5% de competencia vectorial para GRBV. En nuestro caso, no se realizó la detección específica de GRBV en los órganos por donde transitan los viriones. Este procedimiento habría esclarecido si los membrácidos de la especie *T. wickhami* adquirieron el virus o si simplemente lo ingirieron de la savia.

En nuestro trabajo, no fue exitoso el establecimiento de las colonias de membrácidos; al respecto, Zalom et al. (2018) plantean que, hasta el momento de su estudio, ningún grupo de investigación ha logrado mantener una colonia reproductiva de *Tortistilus*. Durante el AAP, obtuvimos una tasa de mortalidad de 52.94% (9/17). En comparación, para el periquito tricornudo de la alfalfa, se ha reportado una mortalidad del 10 al 20% dentro de las 48 h de exposición a la vid infectada, requiriéndose entre 30 y 40 especímenes durante la AAP para lograr transferir de seis a ocho membrácidos sobrevivientes al IAP (Flasco et al., 2021). En un ensayo de transmisión de GRBV, especímenes de *T. albidosparsus* presentaron una tasa de mortalidad superior al 60% al finalizar un período de seis semanas. Este valor sobrepasó el límite superior de decisión (UDL), lo que sugiere que la mortalidad de esta especie fue significativamente alta en comparación con lo que se esperaría en condiciones normales, implicando que el fenómeno observado no fue aleatorio sino el resultado de un efecto significativo relacionado con el tratamiento experimental (Dalton, 2020). Curiosamente, durante nuestros ensayos, la mayor cantidad de individuos que sobrevivieron al AAP correspondió a membrácidos que no portaban el virus. Incluso, dos de ellos permanecieron vivos después de haber finalizado el ensayo. En contraste, la mayoría de los *T. wickhami* que resultaron positivos a GRBV murieron durante el AAP, y los tres que sobrevivieron duraron menos de un día en el IAP. Esto es importante, ya que en el modo de transmisión propagativo no persistente el virus no se replica dentro del vector, sino que circula por el cuerpo del insecto y luego es transmitido a una planta receptora. Además, la literatura documenta cómo ciertos virus inducen comportamientos en los insectos vectores que promueven la propagación viral en plantas, lo que podría mejorar la aptitud del vector para transmitir el virus de manera más eficiente, lejos de provocarle la muerte (Lee et al., 2022). De todas formas, aunque no se ha indagado mucho al respecto, el hecho de que el virus “circule” a través del vector implica atravesar varias barreras de tejido (Flasco et al., 2021), lo cual debe causar estrés celular y quizás daño en estos insectos. Esto, sumado a las cuestiones de adaptabilidad a las nuevas condiciones, afecta su viabilidad.

Por otro lado, durante los ensayos de transmisión se detectó el GRBV en membrácidos de la especie *P. californiensis*; sin embargo, no lo transmitieron a vides receptoras. Estos individuos se integraron al ensayo de transmisión con un carácter más exploratorio, ya que fueron mayoritariamente ninfas colectadas en plantas nativas cercanas al cultivo, pero no en vid. Por lo tanto, no existía evidencia previa de la ingestión de partículas virales provenientes de vides infectadas en campo, como sucedió con la especie *T. wickhami*. Es evidente que la vegetación de donde fueron colectados era su hospedero alimenticio de preferencia. Esto limita la posibilidad de adquisición o transmisión del GRBV en los ensayos de transmisión viral, debido a su comportamiento de alimentación que es esporádico en vid, como se ha observado en el periquito tricornudo de la alfalfa (Flasco et al., 2021). Además, algunos autores plantean que la transferencia de más

de seis a ocho especímenes del periquito tricornudo a hojas extirpadas de vid provoca un daño físico en el tejido vegetal, lo que hace que el proceso de inoculación, y consecuentemente la replicación del virus, sea subóptimo (Flasco et al., 2021). En nuestro estudio, todos los *hypsochorinis* se colocaron en una misma jaula con varias hojas de vid extirpadas (hoja con peciolo). Durante la fase de inoculación, una gran cantidad de membrácidos aparentemente se alimentaba de un número limitado de hojas. Esto pudo provocar un daño en las células del tejido vegetal, impidiendo la replicación y, en consecuencia, la detección viral. El hecho de que los individuos de *P. californiensis* formen parte de una tribu distinta de Ceresini, a la cual pertenece el periquito tricornudo, un vector confirmado de GRBV, reduce la probabilidad de que este individuo juegue un papel crucial en la transmisión viral. Esto se debe a que los geminivirus se caracterizan por estar limitados a una sola especie o a unas pocas especies estrechamente relacionadas dentro de un mismo género (Kahl et al., 2021).

Aunque en esta investigación se demuestra que los individuos de la especie *P. californiensis* portaron GRBV en un ensayo de transmisión en laboratorio y que los membrácidos de la especie *T. wickhami* lo portaron adicionalmente en viñedo, sería muy interesante continuar estudiando estos membrácidos y su papel ecológico en relación con la enfermedad de la mancha roja de la vid en nuestra región. Este conocimiento es crucial para diseñar medidas de control que eviten la propagación de la enfermedad y las pérdidas económicas asociadas al bajo rendimiento de los cultivos. Por esta razón, se recomienda estandarizar las condiciones de reproducción y crianza de estas especies para asegurar su supervivencia durante AAP e IAP idóneos en futuros ensayos de transmisión. Además, se sugiere realizar la detección molecular de GRBV en órganos disectados, como las glándulas salivares, en lugar de insectos completos, para diferenciar entre la simple ingestión de partículas virales contenidas en la savia y la verdadera adquisición del virus.

Capítulo 4. Conclusiones

La combinación de métodos de identificación morfológica y molecular es clave para la identificación precisa de los membrácidos. Este hecho se evidenció particularmente en *T. wickhami*, una especie cuya variabilidad fenotípica puede inducir a una clasificación errónea, llevándola a ser identificada como especies diferentes. Asimismo, el uso complementario de estas herramientas permitió la identificación de *P. californiensis*, cuya secuencia genómica específica aún no ha sido registrada en las bases de datos, lo que subraya la necesidad de un enfoque integrador en la taxonomía de membrácidos.

La ausencia de detección viral en la chicharrita de la vid occidental (*E. elegantula*), en vides positivas, coincide con estudios previos que confirman la incapacidad de los cicadélidos para actuar como vectores de GRBV. Este hallazgo apoya la idea de que los membrácidos como *T. wickhami*, tienen un papel más relevante en la transmisión del virus.

Se comprobó la ingestión de partículas virales por parte de *T. wickhami*, tanto en viñedos como en ensayos de laboratorio, lo que sugiere su potencial como vector de GRBV. Sin embargo, las condiciones subóptimas de los AAP e IAP en los ensayos preliminares de transmisión pudieron haber influido en la falta de confirmación de la transmisión viral. La elevada mortalidad de los insectos durante el AAP y su baja supervivencia durante el IAP subrayan la necesidad de optimizar ciertos parámetros para obtener resultados más concluyentes. Adicionalmente, la detección del virus en órganos clave, como las glándulas salivales, proporcionaría una evaluación más precisa de la competencia vectorial de esta especie.

A pesar de que algunos autores no encontraron evidencia de adquisición viral por parte de *T. wickhami*, otros estudios reportaron la presencia del virus en la glándula salival de una especie cercana a este taxón. Esto subraya la importancia de repetir los ensayos de adquisición viral y realizar detecciones más específicas del virus para esclarecer de manera definitiva la capacidad vectorial de *T. wickhami* y otros membrácidos que podrían estar involucrados en la transmisión del GRBV.

Los resultados de este estudio refuerzan el rol potencial *T. wickhami* como vector del GRBV. No obstante investigaciones futuras deberían centrarse en la optimización del diseño experimental como se sugirió antes, para aclarar de manera definitiva si estos insectos realmente influyen en la epidemiología de la enfermedad. Debido al impacto económico que la enfermedad de la mancha roja de la vid tiene en la región, es prioritario continuar investigando la dinámica de transmisión del GRBV, con el objetivo de

diseñar estrategias de control integradas y efectivas que minimicen la propagación del virus en los viñedos de Baja California.

Literatura citada

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., & Arce-Johnson, P. (2016). Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. *Frontiers in Plant Science*, 7, 382. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>
- Bahder, B. W., Zalom, F. G., & Sudarshana, M. R. (2016b). An Evaluation of the Flora Adjacent to Wine Grape Vineyards for the Presence of Alternative Host Plants of Grapevine red blotch-associated virus. *Plant Disease*, 100(8), 1571–1574. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0153-RE>
- Bahder, B. W., Zalom, F. G., Jayanth, M., & Sudarshana, M. R. (2016a). Phylogeny of Geminivirus Coat Protein Sequences and Digital PCR Aid in Identifying *Spissistilus festinus* as a Vector of Grapevine red blotch-associated virus. *Phytopathology*, 106(10), 1223–1230. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0125-FI>
- Beltran Beache, M., Ochoa Fuentes, Y. M., Cerna Chavez, E., Landero Flores, J., Castro del Ángel, E., & Delgado Ortiz, J. C. (2021). Virus de la “mancha roja” de la vid: una potencial enfermedad en los viñedos de México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(3). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3672>
- Beyer, B. A., Srinivasan, R., Roberts, P. M., & Abney, M. R. (2017). Biology and Management of the Threecornered Alfalfa Hopper (Hemiptera: Membracidae) in Alfalfa, Soybean, and Peanut. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx003>
- Bhattacharjee, B., & Hallan, V. (2022). Geminivirus-Derived Vectors as Tools for Functional Genomics. *Frontiers in Microbiology*, 13, 799345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.799345>
- Burger, J. T., Maree, H. J., Gouveia, P., & Naidu, R. A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 3. In B. Meng, G. Martelli, D. Golino & M. Fuchs (Eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 167–195). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_8
- Caldwell, J. S. (1949). A Generic Revision of the Treehoppers of the Tribe Ceresini in America North of Mexico, Based on a Study of the Male Genitalia. *Proceedings of the United States National Museum*, 98 (3234), 491–521. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.98-3234.491>
- Carrillo Tripp, J., & García Reséndiz, K. G. (2022). Grapevine viruses in Mexico: studies and reports. *Agro Productividad*, 15(4), 103–111. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i4.2152>
- Catto, M. A., Mugerwa, H., Myers, B. K., Pandey, S., Dutta, B., & Srinivasan, R. (2022). A Review on Transcriptional Responses of Interactions between Insect Vectors and Plant Viruses. *Cells*, 11(4), 693. <https://doi.org/10.3390/cells11040693>
- Chang, X., Guo, Y., Ren, Y., Li, Y., Wang, F., Ye, G., & Lu, Z. (2023). Virus-Induced Plant Volatiles Promote Virus Acquisition and Transmission by Insect Vectors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1777. <https://doi.org/10.3390/ijms24021777>

- Cieniewicz, E. J., Pethybridge, S. J., Gorny, A., Madden, L. V., McLane, H., Perry, K. L., & Fuchs, M. (2017). Spatiotemporal spread of grapevine red blotch-associated virus in a California vineyard. *Virus Research*, 241, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.020>
- Cieniewicz, E. J., Pethybridge, S. J., Loeb, G., Perry, K., & Fuchs, M. (2018). Insights Into the Ecology of *Grapevine red blotch virus* in a Diseased Vineyard. *Phytopathology*, 108(1), 94–102. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0239-R>
- Cieniewicz, E., Flasco, M., Brunelli, M., Onwumelu, A., Wise, A., & Fuchs, M. F. (2019). Differential Spread of Grapevine Red Blotch Virus in California and New York Vineyards. *Phytobiomes Journal*, 3(3), 203–211. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-04-19-0020-R>
- Consejo Mexicano Vitivinícola. (n.d). Recuperado el 9 de abril de 2023 de <https://uvayvino.org.mx/>
- Dalton, D. T. (2020). Evaluation of grapevine red blotch virus epidemiology with reference to potential insect vectors [Doctoral dissertation, Oregon State University]. https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/3x816t504
- Diaz Lara, A., Aguilar Molina, V. H., Monjarás Barrera, J. I., Vončina, D., Erickson, T. M., & Al Rwahnih, M. (2023a). Potential Implications and Management of Grapevine Viruses in Mexico: A Review. *International Journal of Plant Biology*, 14(1), 177–189. <https://doi.org/10.3390/ijpb14010015>
- Diaz Lara, A., Stevens, K., Aguilar Molina, V. H., Fernández Cortés, J. M., Chabacano León, V. M., De Donato, M., Sharma, A., Erickson, T. M., & Al Rwahnih, M. (2023b). High-Throughput Sequencing of Grapevine in Mexico Reveals a High Incidence of Viruses including a New Member of the Genus Enamovirus. *Viruses*, 15(7), 1561. <https://doi.org/10.3390/v15071561>
- Dietrich, C. H., & Dmitriev, D. A. (2006). Review of the New World genera of the Leafhopper Tribe Erythroneurini (Hemiptera: Cicadellidae: Typhlocybae). *Illinois Natural History Survey Bulletin*, 37(1–6), 118–190. <https://doi.org/10.21900/j.inhs.v37.121>
- Dietzgen, R., Mann, K., & Johnson, K. (2016). Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses*, 8(11), 303. <https://doi.org/10.3390/v8110303>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39–40. https://www.researchgate.net/profile/Adhityo_Wicaksono/post/Quick_Extraction_of_plant_DNA_does_anyone_have_protocol/attachment/59d642dcc49f478072eaba57/AS:273804717166592@1442291539148/download/Doyle%26Doyle_Focus_1990_CTAB.pdf
- Fiallo Olivé, E., Lett, J. M., Martin, D. P., Roumagnac, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., & Navas Castillo, J. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102(12). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>
- Flasco, M. T., Hoyle, V., Cieniewicz, E. J., Loeb, G., McLane, H., Perry, K., & Fuchs, M. F. (2023a). The Three-Cornered Alfalfa Hopper, *Spissistilus festinus*, Is a Vector of Grapevine Red Blotch Virus in Vineyards. *Viruses*, 15(4), 927. <https://doi.org/10.3390/v15040927>
- Flasco, M., Hoyle, V., Cieniewicz, E. J., & Fuchs, M. (2023b). Transmission of Grapevine Red Blotch Virus: A Virologist’s Perspective of the Literature and a Few Recommendations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 74(2), 0740023. <https://doi.org/10.5344/ajev.2023.23020>

- Flasco, M., Hoyle, V., Cieniewicz, E. J., Roy, B. G., McLane, H. L., Perry, K. L., Loeb, G., Nault, B., Heck, M., & Fuchs, M. (2021). Grapevine Red Blotch Virus Is Transmitted by the Three-Cornered Alfalfa Hopper in a Circulative, Nonpropagative Mode with Unique Attributes. *Phytopathology*, *111*(10), 1851–1861. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-21-0061-R>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, *3*(5), 294–299. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7881515/>
- Galet, P. (2000). *General Viticulture*. Oenoplurimedia.
- Gambino, G., & Gribaudo, I. (2006). Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology*, *96*(11), 1223–1229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223>
- Gasperin Bulbarela, J., Licea-Navarro, A. F., Pino Villar, C., Hernández Martínez, R., & Carrillo Tripp, J. (2019). First Report of Grapevine Red Blotch Virus in Mexico. *Plant Disease*, *103*(2), 381–381. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1227-PDN>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hoyle, V. J., McGinnity Schneider, E. J., McLane, H. L., Wunsch, A. O., Fendell-Hummel, H. G., Cooper, M. L., & Fuchs, M. F. (2024). Assessing the Potential of *Tortistilus* (Hemiptera: Membracidae) from Northern California Vineyards as Vector Candidates of Grapevine Red Blotch Virus. *Insects*, *15*(9), 664. <https://doi.org/10.3390/insects15090664>
- International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. (n.d.). Retrieved August 23, 2023, from <https://ictv.global/>
- Kahl, D., Úrbez-Torres, J. R., Kits, J., Hart, M., Nyirfa, A., & Lowery, D. T. (2021). Identification of candidate insect vectors of Grapevine red blotch virus by means of an artificial feeding diet. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *43*(6), 905–913. <https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1930174>
- Kolliopoulou, A., Kontogiannatos, D., & Swevers, L. (2020). The Use of Engineered Plant Viruses in a Trans-Kingdom Silencing Strategy Against Their Insect Vectors. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 917. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00917>
- Krenz, B., Thompson, J. R., McLane, H. L., Fuchs, M., & Perry, K. L. (2014a). Grapevine red blotch-associated virus Is Widespread in the United States. *Phytopathology*, *104*(11), 1232–1240. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-14-0053-R>
- LaFond, H. F., Volenberg, D. S., Schoelz, J. E., & Finke, D. L. (2022). Identification of Potential Grapevine Red Blotch Virus Vector in Missouri Vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, *73*(4), 247–255. <https://doi.org/10.5344/ajev.2022.21056>
- Lee, H., Stephanus, A. P., Fowles, T. M., Wintermantel, W. M., Trumble, J. T., Gilbertson, R. L., & Nansen, C. (2022). Insect vector manipulation by a plant virus and simulation modeling of its potential impact on crop infection. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12618-2>

- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6–13.
- Martelli, G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*. *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 1–136.
- McGovern, P. E., Fleming, S. J., & Katz, S. H. (Eds.). (2003). *The Origins and Ancient History of Wine*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203392836>
- Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., & Fuchs, M. (Eds.) (2017). *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>
- Olmo, H. P. (1976). Grapes. *Vitis*, Muscadinia (Vitaceae). In N. W. Simmons (Ed.), *Evolution of crop plants* (pp. 294–298). Longman.
- Palacios Gutiérrez, A. K. (2019). Identificación de Geminivirus aislados de vid en Baja California. [Tesis de Licenciatura en Ciencias Agrogenómicas, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2019/noviembre/0798400/index.html>
- Poojari, S., Alabi, O. J., Fofanov, V. Y., & Naidu, R. A. (2013). Correction: A Leafhopper-Transmissible DNA Virus with Novel Evolutionary Lineage in the Family Geminiviridae Implicated in Grapevine Redleaf Disease by Next-Generation Sequencing. *PLOS ONE*, 11(1), 1–3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147510>
- Preto, C. R., Bahder, B. W., Bick, E. N., Sudarshana, M. R., & Zalom, F. G. (2019). Seasonal Dynamics of *Spissistilus festinus* (Hemiptera: Membracidae) in a Californian Vineyard. *Journal of Economic Entomology*, 112(3), 1138–1144. <https://doi.org/10.1093/jee/toz022>
- Rajabaskar, D., Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2014). Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Research*, 186, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.005>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Ray, S., & Casteel, C. L. (2022). Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell*, 34(5), 1514–1531. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058>
- Reynolds, A. G. (2017). The Grapevine, Viticulture, and Winemaking: A Brief Introduction. In B. Meng, G. Martelli, D. Golino & M. Fuchs (Eds), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 3–29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_1
- Rumbaugh, A. C., Sudarshana, M. R., & Oberholster, A. (2021). Grapevine Red Blotch Disease Etiology and Its Impact on Grapevine Physiology and Berry and Wine Composition. *Horticulturae*, 7(12), 552. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120552>

- Rwahnih, M. Al, Dave, A., Anderson, M. M., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., & Sudarshana, M. R. (2013). Association of a DNA Virus with Grapevines Affected by Red Blotch Disease in California. *Phytopathology*, 103(10), 1069–1076. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-12-0253-R>
- Saguez, J., Lemoyne, P., Giordanengo, P., Olivier, C., Lasnier, J., Mauffette, Y., & Vincent, C. (2015). Characterization of the feeding behavior of three *Erythroneura* species on grapevine by histological and DC-electrical penetration graph techniques. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 157(2), 227–240. <https://doi.org/10.1111/eea.12353>
- Sawyer, E., Laroche Pinel, E., Flasco, M., Cooper, M. L., Corrales, B., Fuchs, M., & Brillante, L. (2023). Phenotyping grapevine red blotch virus and grapevine leafroll-associated viruses before and after symptom expression through machine-learning analysis of hyperspectral images. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1117869>
- Sudarshana, M. R., Perry, K. L., & Fuchs, M. F. (2015). Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology*, 105(7), 1026–1032. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0369-FI>
- Weligodage, H. D. S., Jin, G., Kaur, M., Rock, C. D., & Sunitha, S. (2023). Grapevine red blotch virus C2 and V2 are suppressors of post-transcriptional gene silencing. *Heliyon*, 9(3), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14528>
- Wheeler, A. G., Flynn, D. J., Vitanza-Hedman, S., & Abela, A. J. (2022). *Philya ferruginosa* (Goding) (Hemiptera: Membracidae): First Host-Plant Record and Description of the Fifth Instar of a Seldom-Collected Treehopper. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 124(1), 164-173. <https://doi.org/10.4289/0013-8797.124.1.164>
- Whitfield, A. E., Falk, B. W., & Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479–480, 278–289. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.03.026>
- Wilson, H., Hogg, B. N., Blaisdell, G. K., Andersen, J. C., Yazdani, A. S., Billings, A. C., Ooi, K. M., Soltani, N., Almeida, R. P. P., Cooper, M. L., Al Rwahnih, M., & Daane, K. M. (2022). Survey of Vineyard Insects and Plants to Identify Potential Insect Vectors and Noncrop Reservoirs of Grapevine Red Blotch Virus. *PhytoFrontiers™*, 2(1), 66–73. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-04-21-0028-R>
- Zalom, F. G., Daane, K., Kurtural, K., Smith, M. R., & Walton, V. (2019). Biology and Role of Treehoppers in Grapevine Red Blotch Disease. [Interim Progress Report for CDFA Agreement No.18-0398-000-SA, University of California]
- Zalom, F. G., Sudarshana, M. R., Daane, K., Kurtural, K., Smith, M. R., & Walton, V. (2018). Biology and Role of Treehoppers in Grapevine Red Blotch Disease. [Interim Progress Report for CDFA Agreement No.18-0398-000-SA, University of California]
- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., & McKenna, R. (2001). Structure of the Maize Streak Virus Geminata Particle. *Virology*, 279(2), 471–477. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0739>

Anexos

Anexo A

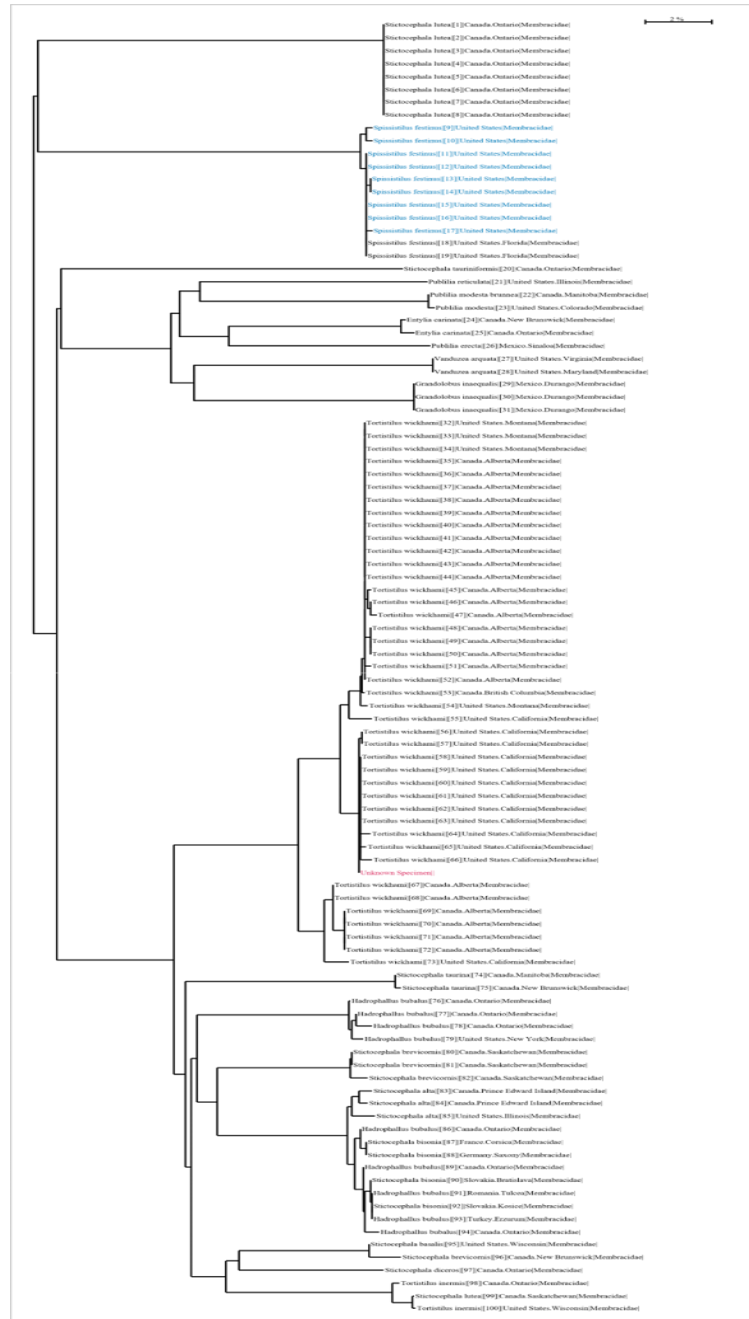


Figura 17. Árbol filogenético proporcionado por la base de datos BOLD. La imagen muestra la ubicación de la secuencia de consulta (subrayada en rojo), correspondiente al membrácido 5 del ensayo de transmisión (5T), que pertenece a la especie *Tortistilus wickhami*. Este ejemplar es representativo de todos los membrácidos de la tribu Ceresini trabajados en este proyecto. Las secuencias de BOLD están marcadas en negro, mientras que las que se señalan en azul son secuencias de GenBank que no están representadas en BOLD. Estas pueden estar menos actualizadas en términos de precisión de la secuencia e identificación taxonómica.