

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 la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)

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.

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



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Epidemiología de dos virosis de la vid en viñedos de Baja
California: enrollamiento de la hoja y mancha roja**

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

Presenta:

Karen Guadalupe García Reséndiz

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Karen Guadalupe García Reséndiz

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Jimena Carrillo Tripp
Directora de tesis

Dra. Rufina Hernández Martínez

Dra. Fadia Sara Ceccarelli

Dr. Miguel Ángel Alonso Arévalo

Dr. José Ramón Úrbez Torres



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 **Karen Guadalupe García Reséndiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ciencias de la Vida

Epidemiología de dos virosis de la vid en viñedos de Baja California: enrollamiento de la hoja y mancha roja

Resumen aprobado por:

Dra. Jimena Carrillo Tripp
Directora de tesis

Las enfermedades del enrollamiento de la hoja de la vid (GLD por sus siglas en inglés) y enfermedad de la mancha roja de la vid (GRBD por sus siglas en inglés) son de importancia para el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.), causando importantes pérdidas económicas debido a reducciones en el rendimiento y la calidad de la fruta. En Baja California se conoce desde hace algunos años la ocurrencia de estas enfermedades, sus virus asociados y la presencia del piojo harinoso de la vid (PHV, *Planococcus ficus*), vector de algunos virus asociados a GLD; sin embargo, aún se desconoce el alcance de su propagación en el estado y el origen geográfico del PHV. En este trabajo se realizó un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia e incidencia de plantas sintomáticas asociadas a ambas enfermedades. La infección viral en plantas sintomáticas se estudió mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real de 190 muestras para cuatro virus asociados a GLD y para el virus causante de GRBD. Los parámetros de desempeño del diagnóstico basado en la evaluación de síntomas tuvieron una sensibilidad del 91% y una especificidad del 52% respecto a los resultados de la PCR en tiempo real. Se seleccionó un número representativo de viñedos en todo el estado, de forma aleatorizada, para determinar la prevalencia basándose en la evaluación de cuadrantes que contenían 1,000 plantas. Los resultados mostraron que el 92% de los viñedos analizados presentaron plantas sintomáticas, con una prevalencia promedio del 20%, mínima de 0 y máxima del 92%. Las principales variables asociadas con la prevalencia fueron el porcentaje de plantas infestadas de PHV por viñedo (correlación positiva), localidad, temperatura ambiente (correlación negativa), temperatura del suelo (correlación positiva) y unidades de calor acumulado (correlación positiva). La incidencia se determinó en cinco viñedos en cuadrantes de 2,500 plantas cada uno ubicados en tres localidades diferentes durante tres años (2021-2023). Los cinco viñedos exhibieron un aumento promedio de 1.7% y 9% en 2022 y 2023, respectivamente. Un viñedo con ausencia de PHV mostró el porcentaje más bajo de plantas sintomáticas en todos los años. ‘Cabernet Sauvignon’ y ‘Nebbiolo’ mostraron más plantas sintomáticas que ‘Merlot’. Por otra parte, se realizaron estudios filogeográficos para caracterizar las poblaciones de PHV y del grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), predominante en GLD. Los análisis filogenéticos basados en los genes *co1* e *its1* del PHV mediante el método de inferencia bayesiana revelaron una estrecha concordancia con muestras de Estados Unidos, Egipto e Israel. Mientras que las filogenias basadas en el gen *hsp70h*, mostraron clado compartido con Estados Unidos, Nueva Zelanda, Alemania y Sudáfrica. La presencia y amplia distribución de GLD, GRBD, virus causales y vectores, subrayan la necesidad de implementar programas de manejo regional fitosanitario en los viñedos de Baja California, con especial atención a virosis.

Palabras clave: Enfermedad del enrollamiento de la hoja, enfermedad de la mancha roja, virus, piojo harinoso de la vid

Abstract of the thesis presented by **Karen Guadalupe García Reséndiz** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science

Epidemiology of two viral diseases in Baja California vineyards: leafroll and red blotch

Abstract approved by:

Jimena Carrillo Tripp
Thesis Director

Grapevine leafroll disease (GLD) and grapevine red blotch disease (GRBD) are important diseases affecting grapevine cultivation (*Vitis vinifera* L.), causing considerable economic losses due to reductions in yield and fruit quality. In Baja California, the occurrence of these diseases, their associated viruses, and the presence of the vine mealybug (*Planococcus ficus*), a vector for some viruses associated with GLD, have been known for several years. However, the extent of their spread within the state and the geographic origin of the vine mealybug remains unknown. This study conducted an epidemiological assessment to determine the prevalence and incidence of symptomatic plants associated with both diseases. Viral infection in symptomatic plants was tested using real-time polymerase chain reaction (PCR) on 190 samples for four viruses associated with GLD and the virus causing GRBD. Diagnostic performance parameters based on symptom assessment had 91% sensitivity, and 52% specificity compared to real-time PCR results. A representative number of vineyards across the state were randomly selected to determine prevalence based on quadrant evaluations containing 1,000 spot plants. Results showed that 92% of the analyzed vineyards had symptomatic plants, with an average prevalence of 20%, ranging from 0 to 92%. Key variables associated with prevalence included the percentage of the vine mealybug-infested plants per vineyard (positive correlation), locality, ambient temperature (negative correlation), soil temperature (positive correlation), and accumulated heat units (positive correlation). Incidence was determined in five vineyards using quadrants of 2,500 spot plants each, located across three different areas over three years (2021-2023). The five vineyards showed an average increase of 1.7% and 9% in 2022 and 2023, respectively. A vineyard without the vine mealybug had the lowest percentage of symptomatic plants in all years. 'Cabernet Sauvignon' and 'Nebbiolo' showed more symptomatic plants than 'Merlot'. Additionally, phylogeographic studies were conducted to characterize the vine mealybug and the grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), the most prevalent GLD-associated virus in the region. Phylogenetic analyses of the vine mealybug *co1* and *its1* partial genes using the Bayesian inference method revealed close similarity with samples from the United States, Egypt, and Israel. Meanwhile, *hsp70h* partial gene phylogenies showed a clade shared with the United States, New Zealand, Germany, and South Africa. The presence and widespread distribution of GLD, GRBD, causal viruses, and their vectors highlight the need for regional phytosanitary management programs in Baja California vineyards, with special attention to viral diseases.

Keywords: Grapevine leafroll disease, grapevine red blotch disease, virus, vine mealybug

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico brindado a través de la beca de posgrado No. de becario 862581.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por permitirme llevar a cabo este trabajo y contribuir a mi crecimiento profesional. Al personal académico y administrativo del posgrado en Ciencias de la Vida, por su apoyo y guía cuando fue necesario.

A la Dra. Jimena Carrillo, por recibirme en su equipo de trabajo. Gracias por su confianza y la libertad para guiar este proyecto, pero siempre bajo su supervisión. Sobre todo, agradezco todo su apoyo y enseñanzas que me orientaron siempre a esforzarme y mejorar, mostrándome una admirable manera de trabajar.

A mis sinodales, la Dra. Rufina Hernández, la Dra. Sara Ceccarelli, el Dr. Miguel Alonso y el Dr. José Úrbez, por sus aportes, preguntas y sugerencias para el enriquecimiento de este proyecto, destacándose cada uno por su área de experiencia.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC), por su invaluable apoyo en campo, especialmente a los Ings. Pedro López y Gabriela Moyano, que siempre estuvieron presentes y dispuestos a colaborar desde la planeación hasta la ejecución en campo.

Al personal técnico del laboratorio de microbiología y biotecnología marina, especialmente los técnicos Mtra. Idalia Montesinos, Guillermo Gonzales y la Dra. Edna Sánchez por su apoyo en campo y laboratorio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Virología Agrícola (los virusitos). A Mariana, por introducirme al laboratorio y a las instalaciones necesarias de CICESE. A Dailyn, Cynthia y Marco, gracias por estar siempre dispuestos a apoyar y por las experiencias compartidas en el laboratorio. A los estudiantes de prácticas y servicio, muchas gracias por su asistencia en campo y en el laboratorio, hacen una gran labor. A todos, gracias por mantener un ambiente tan agradable en el equipo.

Por último, pero muy importante, a mi familia. A mis padres, Mine y Trini. A mis hermanos y sobrinas, Saúl, Caro, Ana y Paola. Gracias por siempre estar presentes y apoyándome en cualquier paso que doy. A mi esposo, Edgardo, muchas gracias por todo tu respaldo y compañía, por ayudarme a mantener la paz y los pies en la tierra mientras crezco. A mis abuelos, tíos y primos, gracias por siempre estar al tanto de mi desarrollo. A mis amigos, que aún en la distancia se hacen presentes, por escucharme y acompañarme.

Tabla de contenido

	Página
Resumen.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Generalidades de la vid	1
1.1.2 Cultivo de vid en Baja California.....	2
1.1.3 Enfermedades virales de la vid.....	2
1.1.4 Biología y fenología del piojo harinoso de la vid.....	9
1.1.5 Estudios de enfermedades virales de vid en México	12
1.2 Justificación	12
1.3 Hipótesis.....	13
1.4 Objetivos	13
1.4.1 Objetivo general	13
1.4.2 Objetivos específicos.....	13
1.5 Organización de la tesis.....	13
Capítulo 2. Epidemiología de GLD y GRBD.....	15
2.1 Resumen.....	15
2.2 Materiales y métodos	16
2.2.1 Sitio de estudio.....	16

2.2.2	Estandarización de técnicas de diagnóstico molecular	17
2.2.3	Fecha óptima de monitoreo de síntomas	20
2.2.4	Prevalencia	20
2.2.5	Incidencia	21
2.2.6	Análisis estadístico	23
2.3	Resultados	24
2.3.1	Optimización del diagnóstico molecular	24
2.3.2	Evaluación del diagnóstico visual vs análisis molecular (RT-PCR en tiempo real)	25
2.3.3	Carga viral en hojas con distintos niveles de síntomas	27
2.3.4	Ventana de tiempo para la evaluación por síntomas en campo.....	28
2.3.5	Análisis de prevalencia de virosis (GLD y GRBD) en Baja California	29
2.3.6	Evaluación de incidencia de GLD y GRBD	33
2.4	Discusión	36
2.5	Conclusión	40
Capítulo 3. Biogeografía del piojo harinoso de la vid y el grapevine leafroll-associated virus 3...41		
3.1	Resumen.....	41
3.2	Materiales y métodos	42
3.2.1	Sitio de estudio.....	42
3.2.2	Procesamiento de las muestras	43
3.2.3	Análisis molecular y filogenético.....	43
3.3	Resultados	45
3.3.1	Amplificación de genes del piojo harinoso de la vid y del virus GLRaV-3	45
3.3.2	Árboles filogenéticos.....	47
3.3.3	Análisis de haplotipos.....	51
3.4	Discusión	55
3.5	Conclusión	57

Capítulo 4. Discusión y conclusiones generales.....	58
4.1 Discusión general y trabajo futuro	58
4.2 Conclusión general	60
Literatura citada.....	61
Anexos.....	73

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ejemplos de síntomas foliares y en frutos producto de GLD..	4
2. Ejemplos de síntomas foliares y en fruto producto de GRBD..	6
3. Síntomas de hojas de vides tintas observados en cultivares tintos.	8
4. Mapa de sitios de estudio de prevalencia e incidencia del GLD y/o GRBD en Baja California.	16
5. Imágenes de referencia de hojas de vid clasificadas por síntomas de GLD y/o GRBD.....	22
6. Diagnóstico molecular para GLRaVs y GRBV mediante PCR en tiempo real.	26
7. Ejemplo de la variación del ciclo de amplificación (PCR en tiempo real, GLRaV-3) de hojas de una misma planta con distintos niveles de síntomas.	27
8. Distribución espacial de plantas clasificadas por síntomas de GLD y/o GRBD en un viñedo durante un período de seis semanas.....	28
9. Mapa de prevalencia de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD en Baja California..	30
10. Prevalencia de plantas sintomáticas con GLD y/o GRBD asociado a localidad, cultivar y presencia de PHV..	32
11. Distribución espacial de plantas sintomáticas de GLD y/o GRBD en cuadrantes de cinco viñedos durante tres años.	34
12. Porcentaje de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD y porcentaje de plantas infestadas por PHV.	35
13. Mapa de sitios de muestreo para filogeografía del PHV y GLRaV-3. Grupo= sitios cuyas muestras fueron procesadas agrupadas para PHV. Estrella roja= sitios de estudio de PHV.42	42
14. Productos de PCR del <i>its1</i> en muestras de PHV que se utilizaron para posteriores análisis de filogeografía (producto esperado 497 pb).....	45
15. Amplicones de las muestras individuales de PHV con el marcador <i>its1</i> (producto esperado 497 pb).....	46
16. Amplicones de las muestras de vid/GLRaV-3 con el marcador <i>hsp70h</i> (producto esperado 546 pb).....	46

17.	Árboles Bayesianos consenso de <i>its1</i> para poblaciones de PHV: <i>Planococcus ficus</i> (y grupos externos <i>Pl. citri</i> , <i>Ps. longispinus</i> y <i>Ps. viburni</i>) de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p>0.9$) en los nodos.....	47
18.	Árboles Bayesianos consenso de <i>co1</i> para poblaciones de PHV: <i>Planococcus ficus</i> (y grupos externos <i>Pl. citri</i> , <i>Ps. longispinus</i> y <i>Ps. viburni</i>) de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p>0.9$) en los nodos.....	48
19.	Árbol Bayesiano consenso para poblaciones de PHV de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p>0.9$) en los nodos.....	49
20.	Árbol Bayesiano consenso de <i>hsp70h</i> de GLRaV-3 de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p>0.9$) en los nodos.....	50
21.	Red Neighbor-joining de haplotipos para la región <i>its1</i> de poblaciones de PHV recolectadas en sitios de las localidades Francisco Zarco (sitios 5, 7 y 12) y San Vicente (sitio 10).....	51
22.	Distribución geográfica de los haplotipos <i>its1</i> de muestras de PHV colectadas en Baja California, México.....	52
23.	Red Neighbor-joining de haplotipos para la región <i>hsp70h</i> (GLRaV-3) de muestras de vid recolectadas en sitios de las localidades Francisco Zarco (sitios 5, 7 y 12) y San Vicente (sitio 10).....	53
24.	Distribución geográfica de los haplotipos <i>hsp70h</i> de GLRaV-3 de muestras de vid colectadas en Baja California, México.....	54
25.	Curvas de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de GLRaV-1, -2 y -4.....	76
26.	Confirmación de amplificación específica de los cebadores para GLRaV-1, -2 y -4 mediante electroforesis en gel de agarosa.....	77
27.	Prueba de concentraciones de primers para GLRaV-1, -2 y -4.....	78
28.	Prueba de ácidos nucleicos totales y ADN para la detección de GRBV por PCR en tiempo real.....	79
29.	Diagramas de dispersión y matriz de dispersión de variables meteorológicas para prevalencia.....	83
30.	Catálogo fotográfico de síntomas foliares asociados a los virus GLRaVs y GRBV en vid y QR de acceso.....	91
31.	Captura de pantalla del artículo de revisión: Grapevine virus in Mexico: studies and reports.....	92
32.	Artículo de reporte de investigación: Epidemiological Surveillance of Grapevine Leafroll and Red Blotch Diseases in Baja California, Mexico.....	93
33.	Artículo: Analytical sensitivity of molecular techniques used for the detection of grapevine leafroll virus 3 (GLRaV-3), a comparative evaluation.....	94

34. Artículo: Deep Learning-Based System for Early Symptoms Recognition of Grapevine Red Blotch and Leafroll Diseases and its Implementation on Edge Computing Devices. 95
35. Base de datos: Grapevine Virus and Symptom Database. 96

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Orden taxonómico de las especies del complejo GLRaVs y GRBV.....	3
2. Características climáticas de los sitios de muestreo de seguimiento de incidencia.....	17
3. Lista de cebadores.	20
4. Clave de síntomas foliares de GLD y/o GRBD para clasificar plantas de vid (<i>V. vinifera</i>) en viñedos de Baja California.	22
5. Número de plantas positivas analizadas mediante PCR en Tiempo Real para detectar cinco virus clasificados según diagnóstico visual.	26
6. Distribución de frecuencia del diagnóstico visual en comparación con la detección molecular de uno o más virus.....	27
7. Resumen de las características de las localidades de evaluación de prevalencia de plantas sintomáticas a GLD y /o GRBD.	31
8. Regresión múltiple de variables meteorológicas para prevalencia de síntomas de GLD y/o GRBD.....	32
9. Coeficientes del Modelo Lineal General (GLM) que muestran las relaciones estadísticas entre varios factores y la presencia de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD en cinco sitios.....	35
10. Variación de secuencias de <i>its1</i> (497 pb) de las muestras de PHV en Baja California.....	51
11. Variación de secuencias de GLRaV-3 (546 pb de la región del gen <i>hsp70h</i>) en muestras de vid en Baja California.....	54
12. Eficiencia de extracciones de ARN de peciolo de vid comparando dos tiempos en PowerLyzer.	73
13. Eficiencia de extracciones de ARN de peciolo de vid comparando perlas de cerámica o de vidrio en PowerLyzer.	74
14. Eficiencia de extracciones de ARN de peciolo de vid comparando cantidad de lavados de cloroformo.	75
15. Análisis de Chi cuadrada para la asociación entre el diagnóstico por síntomas y el diagnóstico molecular.	80
16. Resultados estadísticos de la asociación de la prevalencia con localidad, cultivar e infestación por PHV.....	81

17.	Regresión múltiple de variables meteorológicas para prevalencia.....	84
18.	Modelo lineal general para incidencia.....	85
19.	Modelo de regresión lineal de incidencia de GLD y/o GRDB y PHV.	86
20.	Resumen de muestras probadas para GLRaVs y GRBV por RT-PCR punto final y por RT-PCR en tiempo real.....	87
21.	Resumen de grupos 2021 probados para GLRaVs y GRBV por RT-PCR en tiempo real.	88
22.	Listado del número de acceso a GenBank y país de origen de las secuencias incluidas en el análisis de GLRaV-3.....	89
23.	Lista de abreviaturas.....	97

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades de la vid

La vid es una planta perteneciente al género *Vitis* (Familia Vitaceae), el cual engloba 60 especies nativas de zonas templadas en el hemisferio norte y algunas en los trópicos. Tan solo en América del Norte se encuentran 25 especies. La especie con mayor importancia económica es *Vitis vinifera* L., dado que sus frutos se utilizan para la elaboración de vinos (alrededor del 68%), jugos, uva de mesa y pasas. La vid es una planta perenne, con crecimiento dicotiledóneo y caducifolio (Mullins et al., 1998). Es una planta trepadora vigorosa, que sube por medio de zarcillos bifurcados. Sus hojas miden entre 9 y 28 cm de ancho y son palmeadas lobuladas, con bordes dentados y pecíolo largo. Sus frutos, son bayas llamadas uvas (Vaughan y Geissler, 2009).

Los requerimientos climáticos de la vid son de 0 a 3,000 m de altura y precipitación de entre 400 a 1,100 mm anuales, con veranos secos y alta insolación; idealmente el promedio de humedad atmosférica debería ser inferior al 60%. *Vitis vinifera* requiere de un periodo de invierno de dos meses con temperatura media inferior a los 10°C y maduración a temperaturas diarias promedio entre 10 y 35°C; la temperatura promedio óptima es de 24 a 26°C. La insolación mínima requerida es entre 1,500 y 1,600 horas luz. Tiene preferencia del suelo de texturas franco-arenosos, pero se adapta bien a diferentes tipos de suelos desde arenosos hasta arcillosos. Se desarrolla en un pH de entre 5.0 y 8.0, siendo el ideal alrededor de 6.5 (Corral et al., 2013).

La vid es cultivada en más de 7,450,000 ha a nivel mundial, es la planta más cultivada y el cultivo frutal de mayor importancia económica en el mundo (OIV, 2016). Existen cerca de 10,000 cultivares de *V. vinifera*, clasificando el cultivar según la coloración del fruto: blanco o tinto; o uso final: mesa, jugo, vino o pasas (Vaughan y Geissler, 2009). Las producidas mayormente en México son las tintas Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Merlot, Garnacha, Cariñena, Salvador, Alicante, Barbera, Zinfandel, Nebbiolo y misión y las blancas Ungi Blanc, Chenin Blanc, Riesling, Palomino, Verdone, Feher-Zagos, Málaga y Colombard (OEIDRUS, 2011).

1.1.2 Cultivo de vid en Baja California

En México, el cultivo de vid cubrió una superficie de 36,404.68 ha en 2022, equivalente a 477,304.95 toneladas de producción de uva. Sólo en el estado de Baja California hay sembradas 4,704.93 ha, produciendo 29,839.73 toneladas (SIAP, 2020). Hasta el 2022, se contaba con 2,350 predios dedicados a la producción de uva a nivel nacional (AGRICULTURA y SIAP, 2024). Alrededor del 16% de la uva producida en México es de tipo industrial; satisfaciendo parcialmente de los requerimientos nacionales con producción interna (OEIDRUS, 2011; SAGARPA, 2017).

Según AGRICULTURA y SIAP en 2024, en el estado de Baja California se produjeron 24,208 toneladas, con un valor de 612 millones de pesos. Adicionalmente, Baja California se ubicó como el segundo estado, después de Zacatecas, productor de uva industrial a nivel nacional durante el 2024, con un 31% del total nacional. La mayor parte de los valles vitivinícolas de Baja California se encuentran dentro de los municipios de Tecate, Ensenada y Tijuana. En Ensenada están 166 de las aproximadamente 195 unidades de producción de vid de la entidad. Estas se ubican principalmente en Valle de Guadalupe, San Vicente, Santo Tomás, Ejido Uruapan y San Antonio de las Minas. De los anteriores, el Valle de Guadalupe cuenta con el 50% del área cultivada (1,565.91 has) (González-Andrade, 2015).

1.1.3 Enfermedades virales de la vid

Los viticultores se enfrentan a problemas de plagas durante todo el año, por nematodos, insectos, ácaros, malezas, o vertebrados (Ohmart y Matthiasson, 2006). Las enfermedades fúngicas son las más preocupantes y con mayor importancia en los programas de manejo (Vincent et al., 2012). Algunas de las enfermedades más importantes son: el moho gris (*Botrytis cinerea*), el oídio (*Erysiphe necator*), el mildiú (*Plasmopara viticola*) y los hongos de la madera (Armijo et al., 2016; Bekris et al., 2021).

Adicionalmente, existen alrededor de 101 virus y agentes infecciosos similares como viroides y fitoplasmas identificados hasta la fecha que pueden infectar a la vid (*Vitis vinifera* L. y *Vitis* spp.), lo que convierte a la vid en el cultivo agrícola con el mayor número de virus descritos (Fuchs, 2023). Casi la mitad de estos virus están asociados a cinco categorías de enfermedades: degeneración infecciosa, enrollamiento de la hoja (enfermedad del enrollamiento de la hoja de la vid, GLD- por sus siglas en inglés), complejo de la madera rugosa, marbruna y mancha roja (enfermedad de la mancha roja de la vid, GRBD- por sus siglas en inglés) (Krenz et al., 2014; Martelli, 2017).

1.1.3.1 Enfermedades del enrollamiento de la hoja y mancha roja de la vid, y sus virus asociados

La GLD se encuentra entre las enfermedades virales más extendidas y sus agentes causales son los virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid (GLRaVs), pertenecientes a la familia *Closteroviridae*. Actualmente, se identifican seis GLRaVs, nombrados secuencialmente como GLRaV-1, -2, -3,... -13 (Ito y Nakaune, 2016) (Tabla 1). Entre estos, el “grapevine leafroll-associated virus 3” (GLRaV-3; especie *Ampelovirus trivitis*) es el más extendido a nivel mundial (ICTV, 2024; Rayapati et al., 2008). Por su parte, la GRBD ha ganado importancia en años recientes al haberse detectado ampliamente en América del Norte (Gasperin-Bulbarela et al., 2019; ICTV, 2024; Martelli, 2014). El agente causal de GRBD es el virus de la mancha roja de la vid (GRBV; especie *Grablovirus vitis*) (Tabla 1), perteneciente a la familia *Geminiviridae*. El GRBV también se ha reportado en Suiza, Corea del Sur, India, Italia, Francia, Argentina y, recientemente, en Australia, pero se desconoce el estado actual de su prevalencia e incidencia (Achala et al., 2022; Agriculture Victoria, 2022; Bertazzon et al., 2021; Lim et al., 2016; Luna et al., 2019; S Poojari et al., 2017; Reynard et al., 2018). Otros virus importantes son el “grapevine virus A” causante del surco del tallo de Kober y el “grapevine virus B” que se asocia con el síndrome de la corteza de corcho, pertenecientes al género *Vitivirus* (Armijo et al., 2016).

Tabla 1. Orden taxonómico de las especies del complejo GLRaVs y GRBV.

Familia	Género	Especie	Variante
<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus</i>	<i>Ampelovirus univitis</i> (GLRaV-1)	
		<i>Ampelovirus trivitis</i> (GLRaV-3)	
		<i>Ampelovirus tetravitis</i> (GLRaV-4)	Strain 5, strain 6, strain 9, strain Pr, strain Car
		<i>Ampelovirus tredecimvitis</i> (GLRaV-13)	
	<i>Closterovirus</i>	<i>Closterovirus vitis</i> (GLRaV-2)	
	<i>Velarivirus</i>	<i>Velarivirus septemvitiis</i> (GLRaV-7)	
<i>Geminiviridae</i>	<i>Grablovirus</i>	<i>Grablovirus vitis</i>	

Elaborado con datos de ICTV, 2024; Martelli, 2014.

1.1.3.2 Síntomas e implicaciones de GLRaVs y GRBV

Las afectaciones causadas a la vid por el complejo de GLRaVs varían según los cultivares, ubicación, edad de las vides, suelo del viñedo, condiciones ambientales, genotipo del virus o conjunto de virus presentes en las plantas, entre otros (Chooi et al., 2022; Maree et al., 2013). En la Figura 1, se ejemplifican síntomas

comunes de GLD; los cuales difieren entre las cultivares tintos y blancos. Si aparecen síntomas, los cultivares tintos exhiben una coloración rojiza o violeta en las áreas intervenales de las hojas, exhibiendo también una franja de tejido foliar verde a ambos lados de las nervaduras principales. Por el contrario, los cultivares de uva blanca, muestran ligeros moteados amarillentos o cloróticos en las zonas intervenales de las hojas, pero estos síntomas tienden a ser sutiles en la mayoría de los casos y pueden no ser reconocidos en muchos cultivares (Martelli, 2017; Rayapati et al., 2008). Tanto las plantas de frutos tintos como las de blancos afectadas con GLD muestran márgenes de las hojas enrollados.

En ambos cultivares (tintos y blancos), los síntomas de GLD son más visibles y aparecen primero en las hojas maduras que en las jóvenes, hacia la parte inferior del dosel, alrededor del envero (fase de transición que representa el inicio de la maduración de los frutos, con el cambio del color de la cáscara del fruto), y progresivamente hacia arriba, a hojas más jóvenes, a medida que avanza la temporada (Coombe y McCarthy, 2000; Rayapati et al., 2014). Adicionalmente, las plantas infectadas muestran una reducción en el tamaño y número de racimos y frutos, una maduración desigual, poco vigor de la planta y disminución en el rendimiento (Alabi et al., 2016; Over de Linden y Chamberlain, 1970). Cabe señalar que esos síntomas son comunes en infecciones con GLRaV-1 y GLRaV-3, ya que dentro del complejo de virus asociados a GLD algunas cepas de GLRaV-2 y -7, pueden causar infecciones asintomáticas en ciertos cultivares (Al Rwahnih et al., 2012; Poojari et al., 2013).

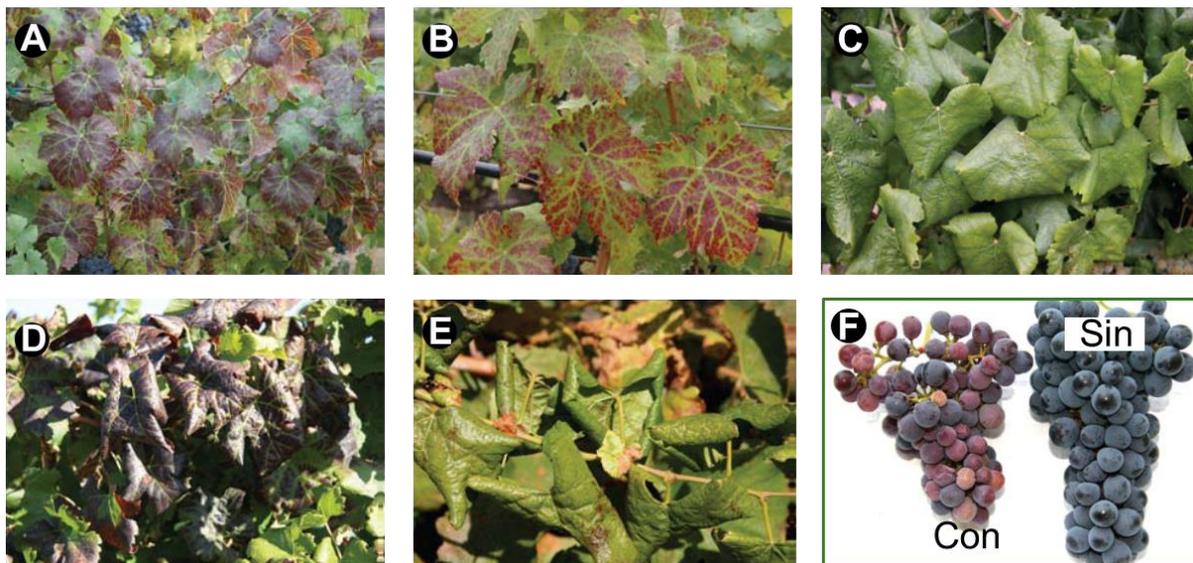


Figura 1. Ejemplos de síntomas foliares y en frutos producto de GLD. Fuente: Rayapati et al. (2008)/ Washington State University. A: Cabernet. B: Cabernet. C: Chardonnay. D: Cabernet. E: Chardonnay. F: Cabernet franc (Con= Con GLD / Sin= Sin GLD).

Dado que los GLRaVs se replican y movilizan en los tejidos del floema de la vid, causan que se interrumpa el flujo de nutrientes hacia los brotes, hojas y pedicelos de los frutos (Vuorinen et al., 2011). Esto ocasiona que se disminuya la calidad de los frutos y se modifiquen características que son deseables para la elaboración de vinos, como el porcentaje de azúcares solubles, la acidez (pH y acidez titulable), el contenido de alcohol, las antocianinas, los taninos y los compuestos fenólicos (Alabi et al., 2016).

Los síntomas en plantas ocasionados por virus se pueden explicar por las modificaciones fisiológicas en plantas. La clorosis en cultivares blancos con GLD, se debe a la reducción de clorofila en las hojas; mientras que el enrojecimiento de cultivares tintos, está dado por la síntesis *de novo* de antocianinas, debido a la acumulación de azúcares en la hoja. Asimismo, el enrollamiento de los márgenes es resultado del incremento de la presión osmótica y la fortificación de la pared celular por la partición de carbohidratos alterada (Song et al., 2022).

Estos síntomas típicos se atribuyen a la expresión de genes que codifican enzimas para la síntesis de antocianinas y la acumulación de flavonoides en las hojas enfermas. El aumento en la acumulación de compuestos antociánicos totales se relaciona con el desarrollo de síntomas de GLD en las plántulas infectadas bajo estrés por PEG; esta acumulación implica la regulación positiva de dos genes clave, MYBA1 y UFGT, y sus niveles de expresión se incrementan aún más por el estrés por sequía (Cui et al., 2017). También se ha encontrado que la proteína de la cápside (CP) del GLRaV-3 interacciona con la 3-deosid-arabino-heptulosanato 7-fosfato sintasa 02, que está involucrada en el metabolismo primario de carbohidratos.

Por su parte, las proteínas p20A y HSP de GLRaV-2, ocasionan alteraciones en MAP4K épsilon de plantas de vid, asociada con la unión a clorofila (Mostert et al., 2023). En hojas de plantas infectadas por GLRaV-3, se da una disminución en la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis y un aumento en genes relacionados con defensa y estrés; en los frutos, se ocasiona una disminución en la expresión de genes de metabolismo y señal de transporte de azúcares (Perrone et al., 2017).

Las reducciones de rendimiento atribuidas a GLD varían, pero a nivel mundial se informa que rondan el 50% (o más, dependiendo de la gravedad) (Ricketts et al., 2015). El impacto económico de GLD se estimó entre 25,000 y 40,000 dólares por hectárea durante la vida útil de viñedos de 25 años de Cabernet franc (Atallah et al., 2012) y alrededor de 47,000 dólares por hectárea durante 20 años en viñedos de Sauvignon blanc y Merlot en Nueva Zelanda (Nimmo-Bell, 2006). También en las zonas de cultivo de uvas de

California, el costo económico de la GLD se estimó entre 29,902 y 226,405 dólares por hectárea, dependiendo del porcentaje de infección y de las estrategias de manejo (Ricketts et al., 2015).

Por su parte, las plantas infectadas con GRBV pueden presentar síntomas similares a los de GLD, incluyendo pigmentación roja en los márgenes y nervaduras de las hojas en cultivares de uva tinta y clorosis irregular en cultivares blancos, incluso necrosis hacia el final de la temporada en ambos cultivares (Figura 2) (Sudarshana et al., 2015). Al igual que con la GLD, en cultivares blancos los síntomas son menos visibles (Cieniewicz, Perry, et al., 2017).

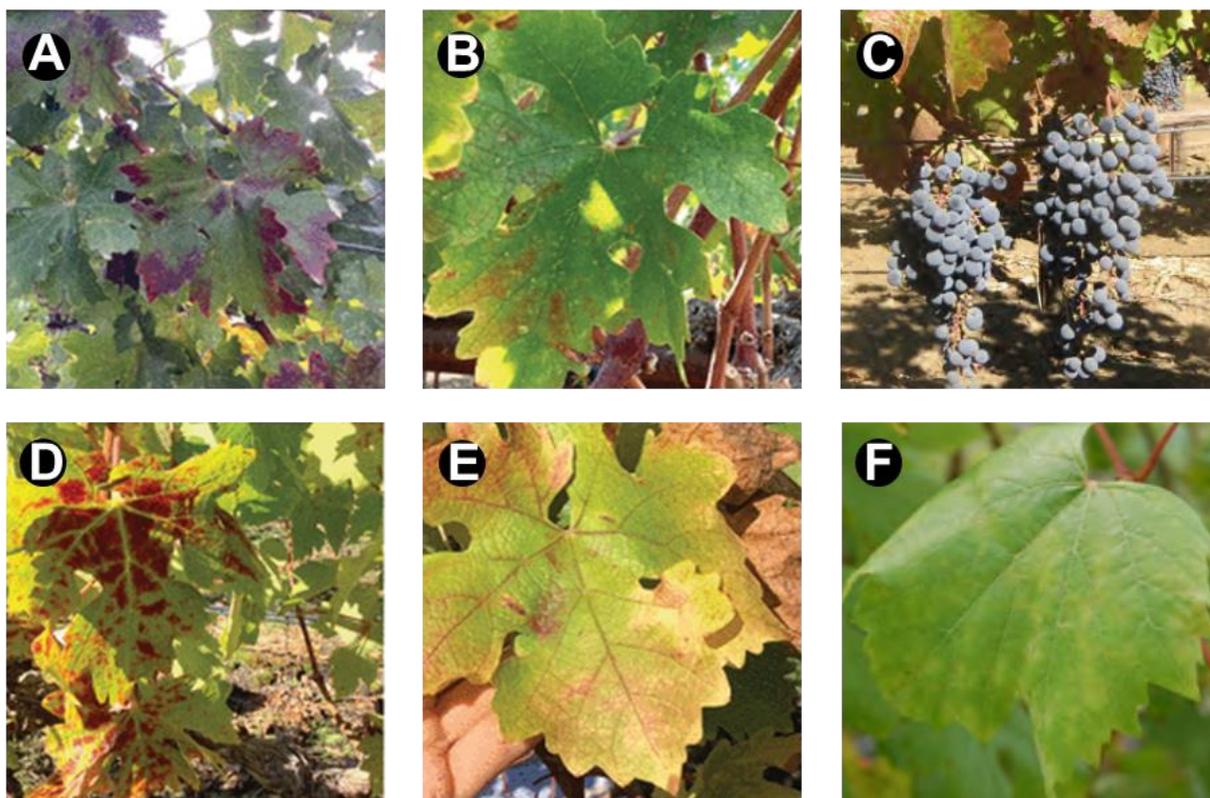


Figura 2. Ejemplos de síntomas foliares y en fruto producto de GRBD. Fuente: Rohrs et al. (2023) y Cieniewicz y Fuchs (2014). A-B: Cabernet Sauvignon. C: Cabernet Franc. D-E: Cabernet Sauvignon. F: Chardonnay.

GRBV altera el metabolismo primario y secundario de la maduración de la baya de uva al reprimir las vías de maduración, mientras activa las rutas metabólicas de desarrollo temprano. El virus reduce notablemente las enzimas esenciales para la síntesis de flavonoides y antocianinas, lo que lleva a una disminución de la acumulación de antocianinas, pero un aumento de los niveles de ácido shikímico y resveratrol (Blanco-Ulate et al., 2017).

El GRBV, induce una alteración en la química del jugo de fruta, y reduce los sólidos solubles totales y el

contenido de antocianinas en la piel de las uvas (Bowen et al., 2020). Además, GRBV altera factores de transcripción clave y vías hormonales, como las vías del ácido abscísico, etileno y auxina, afectando la maduración normal de las bayas. Los síntomas se manifiestan predominantemente después del envero, lo que indica que el inicio de la enfermedad se alinea más con la etapa de desarrollo de la vid que con la acumulación viral (Blanco-Ulate et al., 2017; Rumbaugh et al., 2021).

El GRBV causa pérdidas económicas significativas, como resultado de la reducción de la calidad de la fruta y el retraso en la maduración. El GRBV amenaza la producción rentable y sostenible de uva, causando pérdidas económicas de entre 2,231 y 68,548 dólares por hectárea durante los 25 años de vida útil de un viñedo (Ricketts et al., 2017). Los síntomas de GLD y GRBD pueden modificarse por el cultivar, la combinación de porta vástagos y por los factores ambientales que prevalecen en una región determinada. Además, se pueden confundir por síntomas causados por deterioros nutricionales, como deficiencia de potasio y zinc, daño físico durante las operaciones vitícolas o abrasión por el viento, fitotoxicidad por herbicidas, y por la presencia de plagas (Rayapati et al., 2008, 2014).

1.1.3.3 Co-infecciones

Así como la infección por GLD se puede generar en presencia de uno o por la co-infección con otros de los virus del complejo de los GLRaVs, también se ha encontrado co-infección con virus ajenos a los GLRaVs. Ejemplo de lo anterior, es que los GLRaVs se han asociado con vitivirus como el GVA y GVB que están relacionados con el complejo de la enfermedad de la madera rugosa (Le Maguet et al., 2012). Adicionalmente, se ha encontrado la co-infección con el grapevine red blotch virus (GRBV) (Adiputra et al., 2018).

La relevancia de la posible co-infección de los GLRaVs con GRBV, es que el GRBV puede generar síntomas similares a los de GLD, especialmente el enrojecimiento de las hojas (Figura **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), y que se manifiestan en la misma temporada del año o del ciclo fenológico de la planta. Aunque es posible distinguir entre los síntomas visuales de las dos enfermedades, solo personal experimentado puede hacerlo. Incluso, se sospecha que la presencia de GRBV estuvo enmascarada durante muchos años por la presencia generalizada de GLRaVs en viñedos comerciales (Martínez-Lüscher et al., 2019).

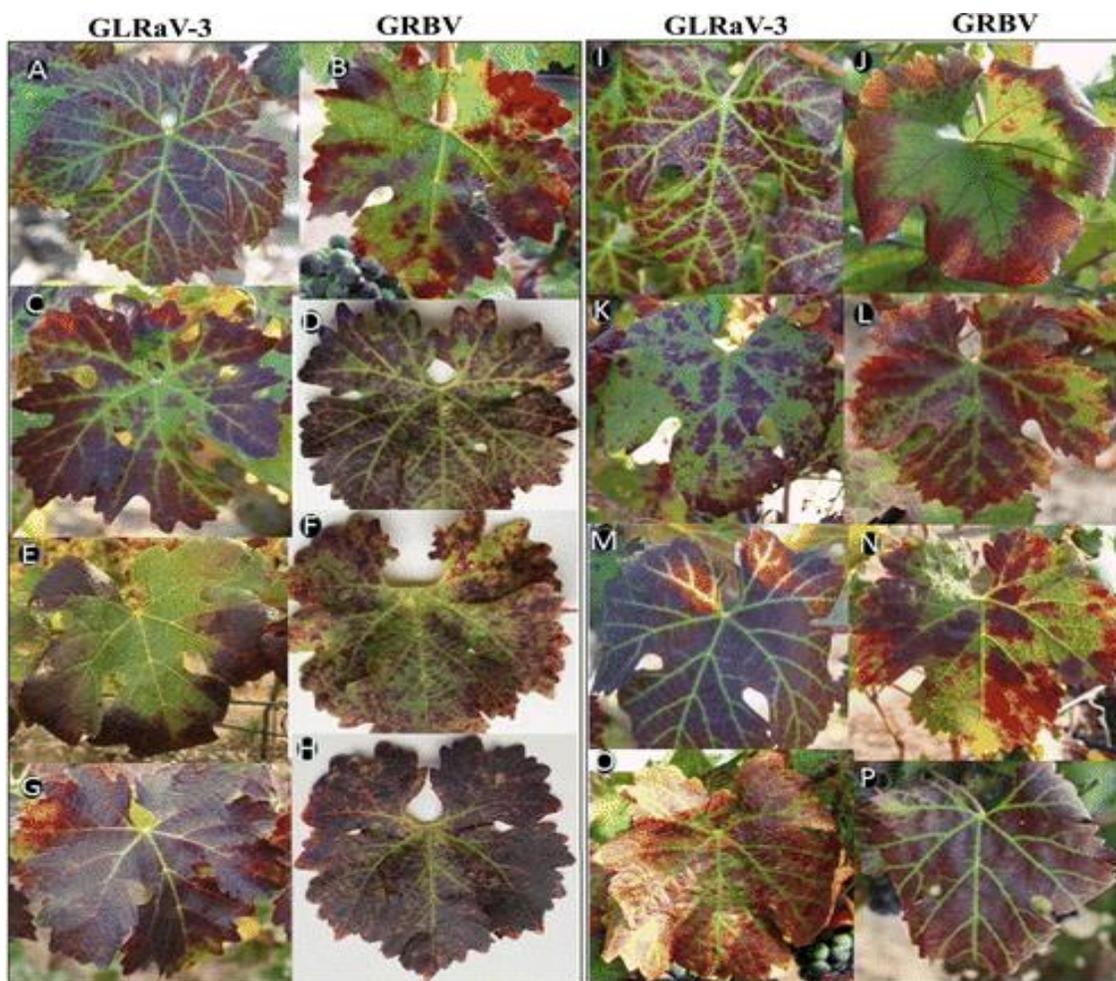


Figura 3. Síntomas de hojas de vides tintas observados en cultivares tintos. Fuente: Adiputra et al. (2018)/ American Phytopathological Society. Cabernet Sauvignon (A-H), Merlot (I-L) y Cabernet Franc (M-P). Las muestras que dieron positivo para GLRaV-3 y GRBV se indican en la parte superior de cada columna.

1.1.3.4 Transmisión de GLRaVs y GRBV

La diseminación primaria del GLRaVs se produce a través de la propagación vegetativa (Rayapati et al., 2014). Además, estos virus pueden tener una propagación secundaria, transmitida a través de plagas de plantas que actúan como vectores. Se han identificado varias especies de la familia Pseudococcidae (Insecta: Hemiptera), comúnmente conocidas como cochinillas, que transmiten GLRaV-1 y GLRaV-3, y se ha demostrado que el piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus* Signoret, PHV) se encuentra entre las más eficientes (Tsai et al., 2010). El pequeño tamaño de las ninfas del primer estadio permite que las cochinillas sean transportadas por el viento, trabajadores y equipos como tractores y/o cosechadoras (Barrass et al., 1994; Daane et al., 2012). En el caso del GRBV, puede transmitirse por injerto, siendo la propagación primaria, la introducción de material infectado en los viñedos (Cieniewicz et al., 2018). El periquito

tricornudo de la alfalfa (*Spissistilus festinus* Say) realiza la transmisión secundaria del GRBV, en laboratorio y en campo (Flasco et al., 2023, 2021).

1.1.4 Biología y fenología del piojo harinoso de la vid

El PHV presenta dimorfismo sexual, las hembras tienen cinco estadios de desarrollo: huevo, tres estadios ninfales y adulto, y los machos siete: huevo, tres estadios ninfales, pre-pupa, pupa y adulto. A partir de la tercera etapa de crecimiento se produce la diferenciación más visible entre sexos (Bazelet, 2018; Daane et al., 2012; Walton y Pringle, 2004). Al alcanzar la madurez sexual, las hembras liberan feromonas para atraer a los machos. Después de la copulación hay un período en el cual la hembra pone huevos en los ovisacos cerosos (Vieux y Malan, 2013; Walton y Pringle, 2004). La producción del ovisaco con huevos viables tiene un alto costo, ya que las hembras mueren poco después de su producción (Waterworth et al., 2011). Cada hembra de *P. ficus* pone en promedio 362 huevos dentro de los ovisacos (Vieux y Malan, 2013). Las hembras sólo se reproducen sexualmente, aunque hembras no apareadas, son capaces de producir ovisacos y huevos no viables (Waterworth et al., 2011). Nunca se ha observado reproducción partenogenética en *P. ficus* (Cocco et al., 2020).

En una revisión llevada a cabo por Walton y Pringle (2004), según lo observado en Sudáfrica, Israel e Italia, se sugiere que el movimiento ascendente del PHV en el tronco comienza a partir de la primavera o principios de verano. En viñedos de Sudáfrica, las poblaciones comienzan a desarrollarse con un nuevo crecimiento, y el pico de población se registra a finales de enero y principios de febrero, después el número disminuye rápidamente. Las cochinillas que se encuentran en el dosel de la vid después de la cosecha forman los núcleos de las colonias invernales. Durante la primavera, los rastreadores o ninfas en primer estadio suben por el tallo principal hasta las nuevas áreas en crecimiento donde se forman las colonias. Mientras progresan las estaciones, estas colonias se dispersan a hojas apicales recién formadas. Después en la estación de colonización, se da el máximo desarrollo en la cosecha. La mayoría de los individuos pasan el invierno como huevos (Geiger y Daane, 2001). Por lo tanto, la ubicación a lo largo de la planta a través de la temporada suele ser muy similar en distintas regiones geográficas. Sin embargo, el número de generaciones por año puede variar. Walton (2003), encontró entre cinco y seis generaciones por año en Sudáfrica, y en Mendoza Argentina, el número de generaciones encontrado en el ciclo 2004-2005, fue de seis. Mientras que en Italia solo se han registrado tres generaciones por año (Becerra et al., 2006). Esto podría deberse a las diferencias en temperatura entre las distintas regiones geográficas (Walton y Pringle, 2004).

1.1.4.1 Diagnóstico de virus asociados a GLD y GRBD

Cuando existen sospechas de la presencia de GLD y/o GRBD, se deben utilizar métodos que determinen la ocurrencia de GLRaVs o GRBV para poder asociar la sintomatología a esta enfermedad. Los métodos más comunes para el diagnóstico de GLD son tres, uno está basado en campo y dos en laboratorio. El primero es conocido como indexación de campo o biológica, es ampliamente aceptado, pero requiere mucho tiempo y trabajo, así como una gran extensión de terreno, y entre dos y tres estaciones para obtener resultados. Por otro lado, los métodos de laboratorio más comunes para la detección de GLRaVs y GRBV son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Rayapati et al., 2014).

Pero, en los últimos años han surgido nuevos enfoques como la amplificación isotérmica (LAMP y RPA) (incluido GLRaV-3), y se han incorporado en la detección de virus inteligencia artificial con análisis de aprendizaje automático de imágenes hiperespectrales (Kishan et al., 2024; Wang et al., 2023). A pesar de estos avances, el diagnóstico visual sigue siendo el método principal, cuando el análisis molecular de muchas muestras no es factible por limitación económica o no se dispone de alta tecnología. El seguimiento de los síntomas de GLD y GRBD ha sido esencial para comprender la epidemiología de estas enfermedades y sus efectos sobre la calidad de la fruta. Los síntomas también sirven como indicativo para la recolección de muestras para un diagnóstico molecular posterior (Bell et al., 2017; Rohrs et al., 2023).

1.1.4.2 Tipos y programas de control de GLD y GRBD

Para el control de GLD y/o de la dispersión de los GLRaVs, la estrategia más efectiva es la utilización de material certificado libre de virus en viñedos nuevos (Volpe et al., 2010). En el caso de viñedos ya afectados, una estrategia es la eliminación de plantas infectadas y replantación del viñedo por completo cuando se supera un umbral de infección entre el 20 y 30%, pero es una solución impráctica. Sin embargo, si el viñedo es maduro, la replantación con material certificado podría ser la mejor opción para el productor. La eliminación de planta va acompañada de la sustitución con planta certificada libre de virus y del control de vectores. Cuando no se hacen cambios en el material vegetal, generalmente se recurre al control de vectores (Rayapati et al., 2008).

Las principales medidas fitosanitarias aplicadas son: el muestreo o monitoreo de los vectores, el control cultural, el control biológico y el control químico. El monitoreo de las plagas, aunque laborioso, es

importante, ya que con la captura y conteo de PHV, incluso se puede predecir el daño en los frutos. El control cultural, intenta limitar la diseminación de GLD mediante la producción de injertos libres de virus y la eliminación de plantas infectadas, a través de programas de certificación y esfuerzos de educación en promoción de la implementación de viveros certificados. Por otro lado, el control biológico plantea el uso de depredadores de pseudocóccidos; por ejemplo, *Cryptolaemus montruzieri* Mulsant, y los parasitoides *Acerophagus maculipennis* Signoret y *Anagyrus pseudococci* Signoret. El control químico incluye la aplicación de insecticidas como algunos neonicotinoides, reguladores de crecimiento, ingredientes botánicos e inhibidores de biosíntesis (SENASICA, 2019). También se han reportado tratamientos por quimigación utilizando cloronicotinilo e imidacloprid, que han mostrado ser efectivos en el control de PHV. En situaciones de riego deficitario, tiametoxam y dinotefurano han sido útiles, ya que al aplicar imidacloprid es necesario mantener la humedad del suelo (Rayapati et al., 2008).

En México la vigilancia epidemiológica fitosanitaria para evitar la dispersión de GLD, es llevada a cabo mediante el Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, a través de la Estrategia Fitosanitaria de Área de exploración en los estados de Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Chihuahua, Guanajuato, Nuevo León, Querétaro, Sonora y Zacatecas (CESVBC, 2019). En Baja California, en el año 2018, se lanzó el “Programa de trabajo de la campaña contra PHV en el estado de Baja California” para dar seguimiento al control de piojo que se llevaba a cabo en la entidad. Mediante esta iniciativa se planteó conservar libre de PHV una superficie de 2,751 has distribuidas en los municipios de Mexicali, Tecate, Tijuana y Ensenada. Además, reducir el nivel de infestación promedio de PHV por debajo de un PHV por planta, bajo la premisa de su presencia en 54 viñedos (1,048.9 ha). Las estrategias planeadas fueron el muestreo, el análisis de muestras sospechosas, el monitoreo mediante colocación de trampas con feromona, el control cultural con el descortezado de plantas y el control químico (CESVBC, 2018).

Del planteamiento anterior, surgió el “Programa de trabajo específico de la campaña contra plagas de la vid 2019” en el estado de Baja California. En este programa se propuso la protección contra el PHV de 2,700 ha de cosecha en los municipios de Ensenada, Mexicali, Tecate y Tijuana, siguiendo las mismas estrategias que en 2018. Además, para el control de GLD se realizaron muestreos en predios con diagnóstico fitosanitario positivo, entrenamiento por medio de pláticas a productores y personal de viñedos, y la realización de informes a los productores para comunicar los resultados del muestreo (CESVBC, 2019). Posteriormente, se incluyó al programa el monitoreo de GLD y el diagnóstico de virosis en la entidad.

1.1.5 Estudios de enfermedades virales de vid en México

En una revisión de estudios y reportes sobre virus de vid en México llevada a cabo como parte de este proyecto, encontramos que son escasos los estudios publicados en revistas internacionales. En recursos nacionales se encontraron reportes de enfermedades virales asociadas a nueve virus. Estas especies se agrupan en siete géneros y seis familias. Los reportes fueron de Aguascalientes y Baja California. Tres de las especies reportadas se asocian con GLD, tres con enfermedad de la madera rugosa, una con marbruna, una con degeneración infecciosa y una (en Baja California) con la GRBD.

En resumen, en México se ha reportado la presencia de virus asociados con enfermedades virales de la vid, incluyendo GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 y GRBV en los estados de Baja California y Aguascalientes (García-Resendiz y Carrillo-Tripp, 2022). Además, en Querétaro se identificaron catorce virus diferentes: el grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV), grapevine Cabernet Sauvignon reovirus (GCSV), grapevine fanleaf virus (GFLV), grapevine fleck virus (GFkV), grapevine Pinot gris virus (GPGV), grapevine red globe virus (GRGV), grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFV), grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1), grapevine virus B (GVB) y GLRaV-1, -2, -3 y -4 (Díaz-Lara, Stevens, et al., 2023). Sin embargo, estos informes carecen de detalles sobre dispersión, incidencia y asociación con vectores.

1.2 Justificación

Las enfermedades causadas por virosis de la vid, incluidas GLD y GRBD, junto con sus virus y vectores asociados, son temas que requieren mayor investigación en México. Existe un desconocimiento de la prevalencia e incidencia de ambas enfermedades en viñedos, limitando su detección y control oportuno. Dado que GLD y GRBD son de las enfermedades virales de mayor importancia económica en la vid, es indispensable conocer su estatus en viñedos del estado de Baja California. Aunado a ello, es necesario incrementar el conocimiento sobre el papel del PHV (*P. ficus*) en la dispersión de estos virus; lo que indirectamente brindará información para tomar medidas en la región para el control de esta plaga.

La importancia de este tipo de estudios en Baja California radica en prevenir y controlar la dispersión de plagas y patógenos de la vid en un estado productor de uva para vino. Este trabajo planea incrementar el conocimiento de GLD y GRBD, sus virus asociados y del PHV, fortaleciendo las actividades llevadas a cabo

por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. Lo anterior, también favorece la generación de conocimiento en un ámbito nacional e internacional.

1.3 Hipótesis

La ocurrencia de las enfermedades del enrollamiento de la hoja de la vid y de la mancha roja, así como la presencia de los GLRaVs y GRBV en viñedos de Baja California varían anualmente, y en el caso de GLD, está asociada al piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus*).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Contribuir a la comprensión de la enfermedad del enrollamiento de la hoja de la vid (GLD) y de la mancha roja de la vid (GRBD), sus virus asociados (GLRaVs y GRBV) y el papel del piojo harinoso de la vid (PHV) (*Planococcus ficus*) en viñedos de Baja California.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la incidencia y prevalencia de GLD y GRBD en Baja California, así como la presencia de los GLRaV-1,-2,-3, -4 y GRBV.
2. Explorar el origen biogeográfico del virus preponderante del complejo asociado a GLD y su principal vector en poblaciones representativas de tres valles viticultores de Baja California.

1.5 Organización de la tesis

En el Capítulo 1, se abordó la introducción y antecedentes que brindan contexto al trabajo, seguido por la justificación, hipótesis y objetivos. En el Capítulo 2, se desarrolló la metodología, resultados, discusión y

conclusión de los experimentos desarrollados para el cumplimiento del objetivo específico 1. En el Capítulo 3, se detallan los métodos, resultados, discusión y conclusión de las actividades necesarias para el cumplimiento del objetivo específico 2. En el Capítulo 4, se da cierre a la tesis, con las discusiones y conclusiones generales. Por último, en los Anexos se encuentran resultados de la optimización y estandarización de técnicas moleculares de diagnóstico (Anexos A-G), pruebas estadísticas (H-Ñ), claves de acceso a GenBank (Anexo O), productos obtenidos a partir del trabajo de tesis como el “Catálogo fotográfico de síntomas foliares asociados a GLRaVs y GRBV en vid” (Anexo P), publicaciones (Anexos Q-T), acceso a la base de datos (Anexo U) y listado de abreviaciones (Anexo V).

Capítulo 2. Epidemiología de GLD y GRBD

2.1 Resumen

Las enfermedades GLD y GRBD son importantes en la vid (*Vitis vinifera* L.), causando altas pérdidas económicas debido a la reducción en el rendimiento y en la calidad de la fruta. En Baja California, México, se conoce desde hace algunos años la ocurrencia de estas enfermedades, sus virus asociados y la presencia del PHV, vector de algunos virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid; sin embargo, aún se desconoce su distribución en el estado. En este trabajo se realizó un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia e incidencia de plantas sintomáticas asociadas a ambas enfermedades. Se seleccionó un número representativo de viñedos al azar para determinar la prevalencia, basándose en la evaluación de cuadrantes que contenían 1,000 plantas.

Los resultados de prevalencia mostraron que el 92% de los sitios analizados presentaron plantas sintomáticas, con una prevalencia promedio de 20%, mínima de 0 y máxima de 92%. Las principales variables asociadas con la prevalencia fueron el porcentaje de plantas infestadas de PHV por sitio (correlación positiva), localidad, temperatura ambiental (correlación negativa), temperatura del suelo (correlación positiva) y unidades de calor acumulado (correlación positiva).

La incidencia se determinó en cinco viñedos en cuadrantes de 2,500 plantas cada uno ubicados en tres sitios alejados durante tres años (2021-2023). Los cinco sitios exhibieron un aumento promedio de 1.7% y 9% en 2022 y 2023, respectivamente. Un sitio con ausencia de PHV mostró el porcentaje más bajo de plantas sintomáticas en todos los años. ‘Cabernet Sauvignon’ y ‘Nebbiolo’ mostraron más plantas sintomáticas que ‘Merlot’.

La infección viral en plantas sintomáticas se probó mediante PCR en tiempo real de 190 muestras para los virus asociados a GLD, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 y para el virus GRBV, causante de la enfermedad GRBD. El diagnóstico basado en la evaluación de síntomas tuvo una sensibilidad del 91% y una especificidad del 52%, respecto a los resultados de la PCR en tiempo real. La presencia y amplia distribución de GLD y GRBD indican la necesidad de implementar programas de manejo regional en los viñedos de Baja California.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Sitio de estudio

El estudio se realizó en el estado de Baja California, México. Los climas predominantes en la zona de estudio son templado muy seco, templado seco con lluvias invernales, subhúmedo y templado semifrío. La temperatura promedio anual en Baja California es de 18 a 19 °C, con una precipitación promedio anual de 200 mm (INEGI, 2016). Para estudiar la prevalencia de GLD y GRBD se analizaron las principales zonas vitivinícolas en las localidades de Ejido de Piedras Gordas, Ejido Real del Castillo, Ejido Nacionalista Sánchez Taboada, Ejido Uruapan, Valle de Ojos Negros, Valle de San Vicente, Valle de Santo Tomás, Tecate, Valle de las Palmas, Ejido El Porvenir, Ejido El Sauzal, Francisco Zarco y San Antonio de las Minas (Figura 4). El monitoreo de incidencia de GLD y GRBD se realizó en cinco viñedos dentro de tres localidades: tres sitios en Francisco Zarco, uno en Valle de Ojos Negros y uno en Valle de San Vicente (Figura 4, Tabla 2).

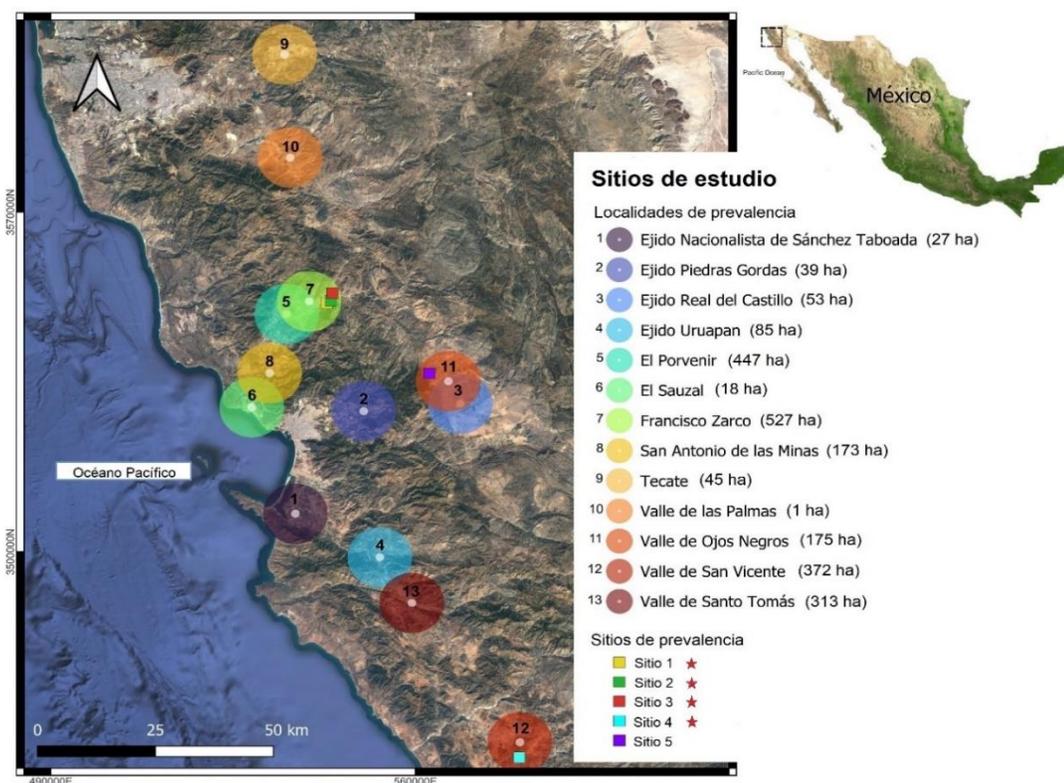


Figura 4. Mapa de sitios de estudio de prevalencia e incidencia del GLD y/o GRBD en Baja California. Estrella roja: sitios con presencia de PHV. Entre paréntesis: hectáreas de producción de vid por localidad.

Tabla 2. Características climáticas de los sitios de muestreo de seguimiento de incidencia.

Sitio	Localidad	Coordenadas	Elevación	Clima	Referencias
1, 2, y 3	Francisco Zarco	(32° 00' a 32° 08')	335 msnm	Clima templado mediterráneo seco con precipitaciones invernales. Temperaturas medias anuales entre 13.9 °C y 19.8 °C, con precipitaciones anuales de 58.8 a 707.7 mm.	(SEFOA, 2015; SIAP, 2016)
4	San Vicente	(31°19' a 116° 15')	100 msnm	Clima muy árido o seco, con precipitaciones en verano e invierno. Valores promedio anuales de precipitación y temperatura de 173 mm y 17.4°C, respectivamente.	(CONAGUA, 2023; SEFOA, 2015)
5	Ojos Negros	(31°52' a 31°57')	690 msnm	Clima mediterráneo semiárido con precipitaciones invernales y veranos secos; la temperatura media anual es de 18.7 °C (máx. de 52.8 °C, mín. de -4 °C; la precipitación media anual es de 253 mm.	(Venegas Cardoso y García López, 2005)

2.2.2 Estandarización de técnicas de diagnóstico molecular

Como se abordará posteriormente, para la evaluación de la prevalencia e incidencia de GLD y/o GRBD, se diseñó una herramienta para realizar diagnóstico visual a través de síntomas foliares; dicho diagnóstico se corroboró con diagnóstico molecular de los virus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 y GLRaV-4 (asociados a GLD) y GRBV (causante de GRBD) utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real.

2.2.2.1 Procedimiento de muestreo

Para la detección molecular se utilizó tejido foliar seleccionado de manera dirigida (por presencia/ausencia de síntomas). Las unidades de estudio fueron plantas de vid (*Vitis vinifera* L) y se muestrearon 10 hojas por planta por personal capacitado. Se tomaron un total de 190 muestras durante el mes de octubre de los años 2022 y 2023, en distintos sitios de estudio de incidencia y prevalencia. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE en hieleras con geles congelados y procesadas inmediatamente o almacenadas a 4°C hasta su uso. Se generó una base de datos con información de cada muestra, asignándole un código de identificación según el sitio y el año de recolección. La recolección de muestras se realizó siguiendo las pautas de UC-Davis Foundation Plant Services (<http://fps.ucdavis.edu/samplecollection.cfm>), con modificaciones que requieren la recolección

de al menos 10 hojas y el transporte en hieleras con geles refrigerantes. Todos los propietarios de viñedos o sus representantes firmaron un formulario de consentimiento informado para participar en el proyecto que incluyó procesamiento de muestras para diagnóstico molecular, evaluación de incidencia y prevalencia. Para garantizar la confidencialidad de los datos, no se revela la identidad ni la ubicación exacta de los viñedos muestreados.

2.2.2.2 Extracción de ácidos nucleicos totales

Para la extracción se empleó el procedimiento basado en bromuro de cetiltrimetilamonio o CTAB (por sus siglas en inglés) descrito por Gambino et al. (2008), con modificaciones por Sandez-Salas, Carrillo-Tripp y García Reséndiz, incrementando a cuatro los lavados con clorformo:alcohol isoamílico (24:1) e incorporando equipo nuevo para la homogenización de la muestra. El protocolo fue modificado con la implementación del homogeneizador de tejido PowerLyzer 24 Homogenizer de Qiagen, con la sugerencia del manual para homogenización de peciolo a velocidad de 4,200 rpm. Se probaron dos tiempos: 5 ciclos de 1 minuto con 30 segundos de espera entre ciclo y ciclo; y 10 ciclos de 1 minuto con 30 segundos de espera entre ciclo y ciclo (Anexo A, Tabla 12). Además, se probó la utilización de perlas de cerámica o perlas de vidrio (4 ó 5 perlas) (Anexo B, Tabla 13). También se comparó la extracción con tres lavados de cloroformo, contra un lavado extra (Anexo C, Tabla 14). Para medir la eficiencia de la extracción se utilizaron como parámetros la concentración (ng/ μ l) y la relación A260/280. Con base en las pruebas anteriores, se seleccionaron las condiciones óptimas de extracción de los ácidos nucleicos totales (ANT) con 10 ciclos de 1 minuto con 30 segundos de espera entre ciclo y ciclo, utilizando perlas de vidrio y 4 lavados con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los ANT extraídos se cuantificaron mediante espectrofotometría (absorbancia 260 nm) utilizando el sistema Nanodrop Lite. Se determinó la pureza de los ANT con la proporción de absorbancias 260/280 con el mismo sistema, considerándose ANT de pureza óptima en el rango de 2.0-2.2. Para la utilización de ANT en las pruebas de PCR en tiempo real, se colocó 1 μ l de cada muestra con una concentración entre 20-50 ng/ μ l.

2.2.2.3 Extracción de ADN

Al igual que para la extracción de ANT, el tejido foliar se trituró con el uso del PowerLyzer 24 Homogenizer de Qiagen con las mismas condiciones. Se aplicó el método de Lodhi et al. (1994), modificado por Palacios-Gutiérrez y Carrillo-Tripp, resaltando un lavado extra con cloroformo e incremento del tiempo de

incubación a -20°C , así como la utilización del homogeneizador de tejido. Asimismo, el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría. La pureza se determinó por la proporción de absorbancias 260/280 considerándose ADN de pureza óptima en el rango 1.8-2.0. Para la utilización de ADN en las pruebas de PCR en tiempo real, se colocó $1\ \mu\text{l}$ de cada muestra con una concentración de 30-40 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2.2.2.4 Detección de genomas virales por amplificación en PCR en tiempo real

Se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real con cebadores para GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 y GRBV (Tabla 3). Las condiciones de amplificación fueron 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 60 minutos y 70°C durante 10 minutos para la retro transcripción (RT). En la PCR las condiciones fueron 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 61°C durante 30 segundos, 72°C durante 15 segundos. Para obtener la curva de disociación se usaron 65°C durante 5 segundos y 95°C durante 5 segundos. Las muestras se consideraron positivas cuando la fase exponencial de la curva de amplificación fue máxima hasta el ciclo 30, la curva de fusión estuvo por debajo de 300 unidades de fluorescencia relativas (RFU) y el pico de fusión fue de $83 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para GLRaV-1 y GLRaV-2, de $83.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para GLRaV-3, $79 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para GLRaV-4 y de $84 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para GRBV. Todos los diagnósticos se realizaron a la par del control interno amplificando la ribulosa bifosfato carboxilasa de la planta para validar el resultado aun en casos de diagnóstico viral negativo.

Con base en las visitas a campo y al analizar las fotografías tomadas en laboratorio de las muestras del 2021, se observó la presencia de distintos niveles de síntomas en hojas de una misma planta. De lo anterior, surgió la pregunta de si la carga viral varía según el nivel de síntomas de las hojas de una planta sintomática. Para contestarla, se seleccionaron cuatro hojas con distintos niveles de síntomas de una misma planta en tres plantas. Se realizó la extracción de ANT con el protocolo antes descrito y se hizo la prueba de PCR en tiempo real con cebadores para GLRaV-3, colocando 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ANT de cada muestra.

Los cebadores usados se seleccionaron realizando pruebas de la concentración óptima y la temperatura ideal de alineamiento (Anexo D, Figura 25; Anexo E, Figura 26; y Anexo F; Figura 27). También se realizó la comparativa entre transcritos (ANT) y ADN para la detección de GRBV por PCR en tiempo real (Anexo G, Figura 28).

Tabla 3. Lista de cebadores.

Enfermedad	Virus	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (bp)	Referencias
GLD	GLRaV-1	HSP70H-149 F HSP70H-293 R	ACCTGGTTGAACGAGATCGCTT GTAAACGGGTGTTCTTCAATTCTCT	168	(Osman et al., 2007)
	GLRaV-2	198 F 290 R	CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT GATGACAACCTTGTCCGCTATAGC	116	(Osman et al., 2007)
	GLRaV-3	MSSq2-F MSSq2-R	CGCTCATGGTGAAAGCAGAGACGT ACGCTCTACGCACGCAGTAA	140	(Sandez-Salas, 2021)
	GLRaV-4	HSP-85 F HSP-178 R	ATATACATACCAACCGTTGTGGGTATAA CCCTATAAACTAGCACATCCTTCTCTAGT	93	(Osman et al., 2007)
GRBD	GRBV	CPfor CPrev	AGCGGAAGCATGATTGAGACATTGACG AACGTATGTCCAATTGCAGAAGCCGC	245	(Krenz et al., 2014)
Control interno	Rubisco	Rbc1-F Rbc-R	TACTTGAACGCTACTGCAG CTGCATGCATTGCACGGTG	186	(Sánchez-Navarro et al., 2004)

Los cebadores usados se seleccionaron realizando pruebas de la concentración óptima y la temperatura ideal de alineamiento (Anexo D, Figura 25; Anexo E, Figura 26; y Anexo F; Figura 27). También se realizó la comparativa entre transcritos (ANT) y ADN para la detección de GRBV por PCR en tiempo real (Anexo G, Figura 28).

2.2.3 Fecha óptima de monitoreo de síntomas

Para determinar el tiempo óptimo dentro del período de presencia de síntomas de GLD y/o GRBD en Baja California, se visitaron los sitios 1 y 2 (de incidencia) tres veces con un intervalo de 24 días (segunda visita) y 28 días (tercera visita). Las plantas se clasificaron como asintomáticas, sospechosas o sintomáticas de GLD y/o GRBD. Con lo anterior, se corroboró la fecha óptima para realizar los monitoreos. Adicionalmente, este ensayo sirvió para decidir si se utilizaba la clasificación de “sospechosa”.

2.2.4 Prevalencia

En el estudio epidemiológico transversal analítico, las unidades de estudio fueron plantas de vid de 121 sitios de Baja California ($p= 50\%$, $IC= 10\%$, $CL= 95\%$). La prevalencia de GLD y GRBD se evaluó mediante el

monitoreo y clasificación de plantas de vid con síntomas de estas enfermedades, se utilizó la guía de la Figura 5 y Tabla 4, clasificando cada una de las plantas con 0 para las asintomáticas y 1 para las sintomáticas, durante los años 2022 (80 sitios en cinco localidades, Valle de las Palmas, Ejido El Porvenir, Ejido El Sauzal, Francisco Zarco y San Antonio de las Minas) y 2023 (41 sitios en ocho localidades, Ejido de Piedras Gordas, Ejido Real del Castillo, Ejido Nacionalista Sánchez Taboada, Ejido Uruapan, Valle de Ojos Negros, Valle de San Vicente, Valle de Santo Tomás y Tecate).

El seguimiento se realizó en octubre de cada año. Se evaluaron cuadrantes de 10 líneas con 100 plantas cada una, con un total de 1,000 plantas por cuadrante en cada uno de los sitios seleccionados al azar en viñedos propiedad de diferentes productores. Se tomó nota cuando se encontró un punto vacío, sin una planta o una planta muerta. Asimismo, se determinó el promedio anual del porcentaje de plantas infestadas por PHV (plantas con al menos un PHV) mediante muestreo de insectos siguiendo la metodología de Fú-Castillo et al. (2002), por técnicos capacitados del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC). Adicionalmente, se obtuvo un promedio anual de la información meteorológica diaria de siete estaciones del Sistema de Información de Manejo del Agua de Riego en Baja California (SIMARBC & AGRICULTURA, 2024), asignando datos a cada sitio de estudio según la proximidad a la estación más cercana.

2.2.5 Incidencia

Se realizó un estudio longitudinal analítico para monitorear los síntomas de GLD y/o GRBD (Tabla 4, Figura 5) en cinco sitios de muestreo (Figura 4). Se realizaron visitas a campo durante el 2020, para definir los sitios y cuadrantes de estudio, así como para probar las categorías para clasificar a las plantas y la toma de muestra para iniciar con la estandarización de técnicas de diagnóstico molecular. Se monitorearon cuadrantes de 25 líneas con 100 plantas cada una (2,500 plantas por sitio) del 2021 a 2023 durante el mes de octubre de cada año. En los sitios 1, 2, 3 y 4 hubo la presencia de PHV, pero no en el sitio 5. En cada viñedo se contabilizó el total de plantas sintomáticas, asintomáticas, replantes y plantas perdidas (por muerte o eliminación). Los puntos con replantes o plantas perdidas se descartaron del análisis estadístico final.

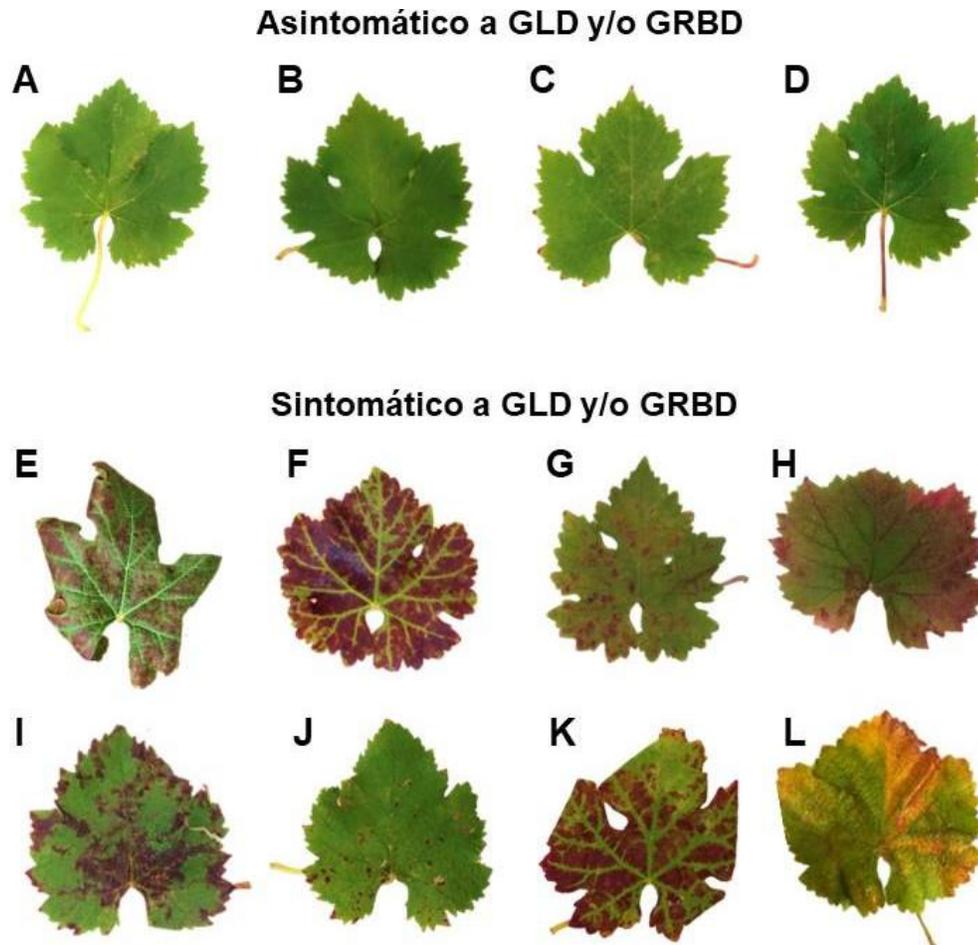


Figura 5. Imágenes de referencia de hojas de vid clasificadas por síntomas de GLD y/o GRBD. La parte superior de la figura muestra hojas asintomáticas (negativas a GLRaV-1, -2, -3, -4 y GRBV), ilustrando la apariencia del follaje de vid sin presencia de estas enfermedades virales. A-C: cv Nebbiolo. D: cv. Cabernet Sauvignon. La parte inferior de la figura muestra hojas sintomáticas, que ilustran las manifestaciones de varios síntomas en las hojas: E: márgenes enrollados, nervaduras verdes claro y decoloración rojiza (cv. Cabernet Sauvignon, positiva a GLRaV-2 y GLRaV-3). F: nervaduras verdes claro y decoloración rojiza (cv. Cabernet Sauvignon, positiva a GLRaV-2 y GLRaV-3). G: manchas rojas agrupadas (cv. Cabernet Sauvignon, positiva a GLRaV-2 y GLRaV-3). H: nervaduras rojas, manchas rojas en la hoja y márgenes irregulares (cv. Nebbiolo, positiva a GLRaV-2 and GRBV). I: manchas rojas en forma de píxeles (cv. Nebbiolo, positiva a GLRaV-3 y GRBV). J: manchas rojas dispersas (cv. Nebbiolo, positiva a GLRaV-2 y GLRaV-3). K: margen enrollado, nervaduras de color verde claro y decoloración rojiza (cv. Cabernet Sauvignon, positiva a GLRaV-2 y GLRaV-3). L: nervaduras verdes claro y manchas cloróticas (cv. Chenin Blanc, positiva a GLRaV-3).

Tabla 4. Clave de síntomas foliares de GLD y/o GRBD para clasificar plantas de vid (*V. vinifera*) en viñedos de Baja California.

Clave	Definición
0	Asintomática: No presenta síntomas de GLD, ni GRBD, pero puede presentar signos de otras afecciones.
1	Sintomática a GLD y/o GRBD: En cultivares tintos: enrollamiento de los márgenes, enrojecimiento en manchas o la hoja completa, deformación de los márgenes, nervaduras verdes claro o púrpura. En cultivares blancos: enrollamiento de los márgenes, clorosis en manchas o la hoja completa, deformación de los márgenes, nervaduras verdes claro.

2.2.6 Análisis estadístico

Para corroborar el diagnóstico visual de GLD y/o GRBD (sintomático o asintomático), se comparó la clasificación de los síntomas con los resultados del diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real dirigida a virus específicos. Las muestras se consideraron positivas a PCR en tiempo real, cuando amplificaron para al menos uno de los virus probados y negativas cuando no amplificó ningún virus. Se calcularon varias medidas estadísticas basadas en 190 muestras para evaluar la concordancia entre el diagnóstico de síntomas y el diagnóstico molecular. Asimismo, se obtuvieron los parámetros epidemiológicos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Además, se realizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates para evaluar la significancia estadística de la asociación entre el diagnóstico de síntomas y los resultados del diagnóstico molecular (Anexo H, Tabla 15).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Plantas sintomáticas y positivas por PCR en tiempo real}}{\text{Total de plantas positivas por PCR en tiempo real}} \quad (1)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Plantas asintomáticas y negativas por PCR en tiempo real}}{\text{Total de plantas negativas por PCR en tiempo real}} \quad (2)$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{Plantas sintomáticas y positivas por PCR en tiempo real}}{\text{Total de plantas sintomáticas}} \quad (3)$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Plantas asintomáticas y negativas por PCR en tiempo real}}{\text{Total de plantas asintomáticas}} \quad (4)$$

Para el estudio de prevalencia, la variable dependiente fue el porcentaje de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD en cada sitio (prevalencia), en relación con el número total de plantas en el cuadrante evaluado (excluyendo puntos sin planta, plantas muertas y replantes). Las variables explicativas o independientes fueron localidad (división territorial dentro de un municipio: El Porvenir, Francisco Zarco, Valle de Ojos Negros, Ejido Piedras Gordas, San Antonio de las Minas, Valle de Santo Tomás, Valle de San Vicente, Tecate, Otros (incluye las localidades con tres o menos sitios) = Ejido Real del Castillo + Ejido Nacionalista Sánchez Taboada + Ejido Uruapan + Valle de las Palmas + Sauzal), cultivar de planta y porcentaje de plantas

infestadas por PHV (%). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95% en las variables categóricas: localidad, cultivar y porcentaje de plantas infestadas por PHV (Anexo I, Tabla 16). Las variables meteorológicas recolectadas fueron precipitación total (mm), radiación solar (Cal/cm²), humedad relativa promedio (%), temperatura ambiental promedio (°C), temperatura promedio del suelo (°C) y unidades de calor acumulado (calor diario acumulado) (Anexo J, Figura 29). Para analizar la relación entre estas variables meteorológicas (promedio anual) y la prevalencia de GLD y GRBD se realizó un análisis de regresión múltiple (Anexo K, Tabla 17).

Para los análisis de incidencia, se obtuvo un Modelo Lineal Generalizado (GLM) que explica la variable dependiente binaria (Presencia/ausencia de síntomas de GLD y/o GRBD), siendo las variables independientes año (2021, 2022 y 2023), cultivar ('Cabernet Sauvignon', 'Nebbiolo' y 'Merlot') y sitio (sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4 y sitio 5) (Anexo L, Tabla 18). Para la asociación entre la incidencia y el porcentaje de plantas infestadas por PHV, se realizó un análisis MANOVA (con sitio y año como variables explicativas) y un análisis de regresión lineal (incidencia como variable dependiente y PHV como variable independiente) (Anexo M, Tabla 19).

Todas las pruebas se realizaron con RStudio versión 1.4.555 (RStudio Team, 2024) y los mapas geográficos en QGIS versión 3.34.0 (QGIS Development Team, 2018).

2.3 Resultados

2.3.1 Optimización del diagnóstico molecular

Posterior a la estandarización de la extracción de ácidos nucleicos (ANT y ADN), se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real para realizar la amplificación de regiones de genomas de virus causales de GLD y GRBD. Se probaron distintos sets de cebadores para cada virus, curvas de temperatura y concentraciones de cebadores. Con base en las curvas de disociación y los ciclos de amplificación (Cq), se determinó utilizar una concentración de 0.4 µm de los cebadores de GLRaV-1, -2 y -4, 0.8 µm de GLRaV-3 y 1 µm de GRBV en análisis posteriores (Anexo D, Figura 25; Anexo E; Figura 26; Anexo F, Figura 27; y Anexo G, Figura 28).

Inicialmente se planteaba trabajar solo con GLD y sus virus asociados, sin embargo, después del muestreo llevado en el 2020 y comparando la clave asignada en la cartografía con el resultado de laboratorio, el

52.5% de las plantas asignadas como sospechosas o sintomáticas a GLD, resultaron con un diagnóstico positivo para al menos uno de los GLRaVs probados. Respecto a las plantas clasificadas como asintomáticas, el 56.5% resultaron negativas en la prueba de PCR punto final. Para tratar de esclarecer la baja correlación, y descartar que se debiera a un error humano en la asignación de claves o fidelidad de la técnica de PCR punto final (Sandez-Salas, 2021), se decidió realizar la prueba por RT-PCR en tiempo real con cebadores de interés para GLRaV-3 y para GRBV (por posible confusión de síntomas). Los resultados se presentan en el Anexo N (Tabla 20). En el caso del GLRaV-3, se analizaron once muestras sintomáticas y negativas a los GLRaVs por RT-PCR punto final. Nueve resultaron positivas, pero con baja concentración viral. Respecto a GRBV, cuatro de seis muestras probadas, resultaron positivas al virus. Algunas muestras positivas a GRBV también resultaron positivas a GLRaV-3 por PCR en tiempo real. Únicamente una de las muestras probadas fue negativa a todos los virus y por todas las técnicas, por lo que también se debería considerar el origen de síntomas debido a otras causas. Por lo anterior, se decidió integrar como parte del estudio a GRBD y su agente causal GRBV.

Con la intención de conocer si era posible la detección de GRBV (un virus con genoma de ADN) por RT-PCR tiempo real, se realizó la comparativa de la utilización de ADN contra ácidos nucleicos totales (ANT) de un set de muestras de campo, incluyendo controles (Anexo G, Figura 28). Los resultados mostraron que es posible la detección de GRBV a partir del transcrito de CP y el genoma del virus presente en los ANT, por lo que se utilizaron únicamente ANT y posteriormente la retro-transcripción (RT), en lugar de realizar extracción de ADN para realizar pruebas de GRBV y de ANT para los GLRaVs.

Durante las pruebas de optimización de protocolos de diagnóstico, se procesaron muestras colectadas durante el 2020 y 2021 (Anexo Ñ, Tabla 21). Producto de lo anterior, se encontró que el virus más prevalente fue el GLRaV-3 (74%), seguido por el GLRaV-2 (29%) y el GRBV (29%). Además, muestras de sitios en los Valles de San Vicente y Ojos Negros, tuvieron mayor porcentaje de plantas con presencia de GRBV, respecto a muestras de la zona de Francisco Zarco.

2.3.2 Evaluación del diagnóstico visual vs análisis molecular (RT-PCR en tiempo real)

La validación de la técnica de diagnóstico visual de GLD y/o GRBD se realizó a través de la comparativa con la PCR en tiempo real (GLD: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 y GRBD: GRBV) con 190 muestras tomadas durante octubre de 2022 y 2023. GLRaV-3 fue el virus más prevalente en el total de muestras analizadas, seguido por GRBV y GLRaV-2. Se detectó GLRaV-1 en una planta y no se detectó GLRaV-4 en ninguna muestra (Figura 6A). En 63 muestras, solo se detectó un virus y en 45 de ellas se encontraron

infecciones mixtas (Figura 6B). Por otro lado, el 95% de las muestras positivas para GLRaV-3, el 90% de las positivas para GRBV y el 97% del total de positivas para GLRaV-2 mostraron síntomas de GLD y/o GRBD (Tabla 5).

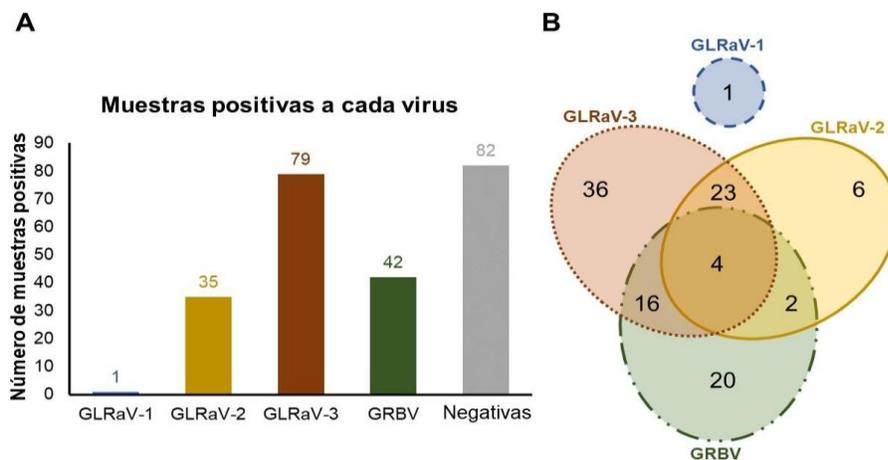


Figura 6. Diagnóstico molecular para GLRaVs y GRBV mediante PCR en tiempo real. Resultados de un total de 190 muestras. A: Distribución de muestras positivas para cada virus analizado. B: Diagrama de Venn que ilustra la distribución de muestras que resultan positivas para uno o más virus.

Tabla 5. Número de plantas positivas analizadas mediante PCR en Tiempo Real para detectar cinco virus clasificados según diagnóstico visual.

		Muestras positivas probadas por RT-PCR en tiempo real				
		GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GRBV
Diagnóstico visual	Sintomático	1	34	75	0	38
	Asintomático	0	1	4	0	4

De las 190 muestras analizadas, el 57% de ellas resultaron positivas por al menos uno de los virus analizados, mientras que en el 43% no se detectó ninguno de los virus. La distribución de frecuencia que compara el diagnóstico visual con la detección molecular de virus reveló diferencias, lo que indica una dependencia entre variables (Tabla 6). El diagnóstico visual demostró una sensibilidad del 91%, una especificidad del 52%, un valor predictivo positivo (VPP) del 72% y un valor predictivo negativo (VPN) del 81%. Estas métricas indican que el diagnóstico visual es eficaz para identificar plantas sintomáticas que dan positivo para al menos un virus. Sin embargo, es débil para detectar plantas asintomáticas que no amplifican los virus, es decir, mayor número de falsos negativos. El detalle de los diagnósticos moleculares y ejemplos de hojas sintomáticas y asintomáticas está disponible en la base de datos digital del Anexo U.

Tabla 6. Distribución de frecuencia del diagnóstico visual en comparación con la detección molecular de uno o más virus. *

		Diagnóstico por RT-PCR en tiempo real	
		Positivo**	Negativo***
Diagnóstico visual	Sintomático	(0.907) 98/108	(0.475) 39/82
	Asintomático	(0.092) 10/108	(0.524) 43/82
Suma de frecuencias		1	1

* Prueba de Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates. Diagnóstico visual versus diagnóstico por RT-PCR en tiempo real: $\chi^2 = 41,087$, $gl = 1$, valor de $p = 1,456e-10$. **Positivo: uno o más virus detectados (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GRBV). ***Negativo: no se detectó ningún virus.

2.3.3 Carga viral en hojas con distintos niveles de síntomas

La evaluación del ciclo de amplificación en la qPCR, según hojas con distintos niveles de síntomas se realizó con hojas de tres plantas. En la Figura 7, se muestra un ejemplo (hojas de una planta), donde se observa que el ciclo de amplificación es mayor en la hoja con más síntomas de virosis (nivel 4 de síntomas), mientras que el resto de las hojas tienen un ciclo de amplificación muy similar entre ellas, pero más bajo que el nivel 4. Otra observación con este ensayo es que la hoja con nivel de síntomas 1 (prácticamente asintomática), tuvo un ciclo de amplificación muy similar a las hojas en niveles 2 y 3 de síntomas; por lo que, el virus es detectable en hojas asintomáticas. El comportamiento antes mencionado, se repitió en las otras 2 plantas.

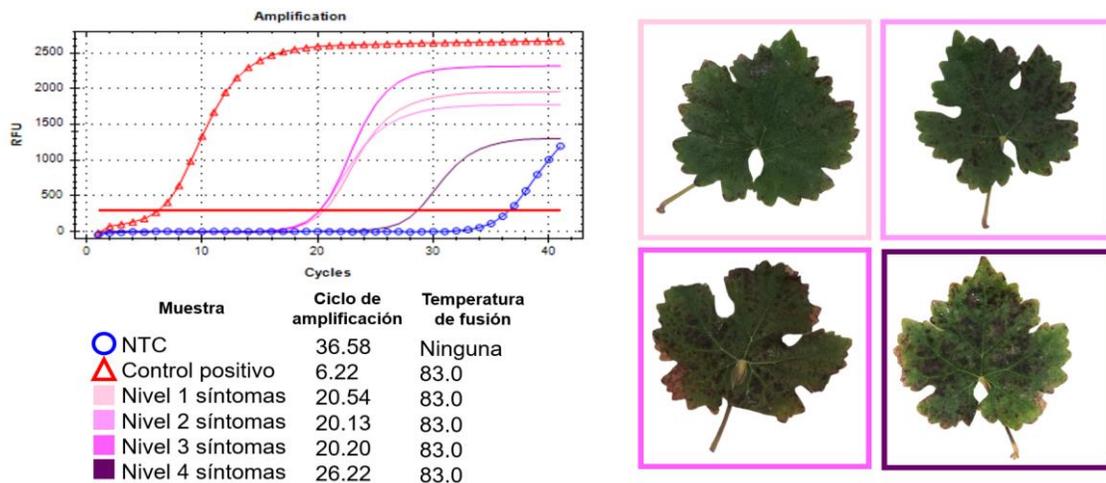


Figura 7. Ejemplo de la variación del ciclo de amplificación (PCR en tiempo real, GLRaV-3) de hojas de una misma planta con distintos niveles de síntomas.

2.3.4 Ventana de tiempo para la evaluación por síntomas en campo

Las plantas se clasificaron como asintomáticas, sospechosas o sintomáticas de GLD y/o GRBD (Figura 8). Se encontró que a finales de septiembre muchas de las plantas clasificadas como asintomáticas, para el segundo muestreo ya mostraban síntomas; y en la tercera visita muchas de estas eran clasificadas como sospechosas. Lo anterior sugiere que la ventana de tiempo para realizar la clasificación más certera de plantas sintomáticas es de una o máximo dos semanas al terminar la cosecha. Adicionalmente se decidió realizar los análisis de prevalencia e incidencia, únicamente con las clasificaciones de asintomático y sintomático, ya que la clasificación de sospechosa resultó muy subjetiva y, según este ensayo, tiende a confundirse con otros síntomas (especialmente de senescencia al final del otoño).

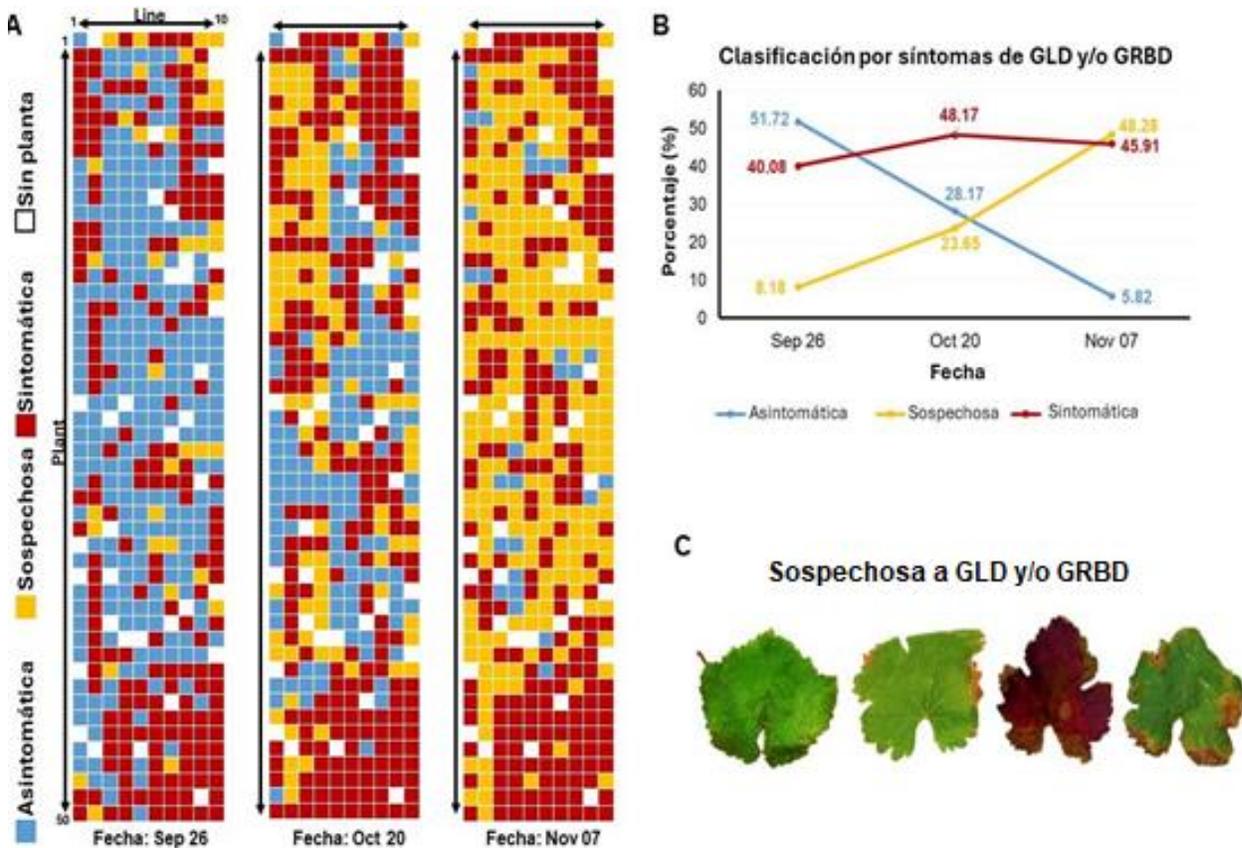


Figura 8. Distribución espacial de plantas clasificadas por síntomas de GLD y/o GRBD en un viñedo durante un período de seis semanas. A: Cuadrante de plantas clasificadas en asintomáticas, sospechosas y sintomáticas. El cuadrante estuvo formado por 10 líneas de 50 plantas (500 plantas en total). B: Porcentaje de plantas por clasificación (asintomáticas, sospechosas y sintomáticas) para cada una de las tres visitas. C: Ejemplos de imágenes de hojas clasificadas como sospechosas; de izquierda a derecha, una hoja con margen deformado (cv. Malbec), una hoja con ligero enrollamiento en el haz y margen marchito (cv. Cabernet Sauvignon), hoja con enrojecimiento en el limbo de aspecto senescente (cv. Merlot), y una hoja con marchitez y algunas manchas de color púrpura oscuro (cv. Cabernet Sauvignon).

2.3.5 Análisis de prevalencia de virosis (GLD y GRBD) en Baja California

Se visitaron un total de 121 sitios en 13 localidades de Baja California durante 2022 (81 sitios) y 2023 (42 sitios) (Tabla 7). Después de hacer el análisis con solo la clasificación de las plantas como asintomáticas o sintomáticas, la prevalencia estatal promedio por sitio fue del 20% de plantas sintomáticas, con un rango entre 0 y 92%. En total, el 92% de los sitios visitados tuvieron presencia de plantas sintomáticas dentro de ese rango. Las localidades con mayor número de plantas sintomáticas fueron Sánchez Taboada con 69% (1 sitio visitado), El Sauzal con 33% (2 sitios) y Francisco Zarco con 29% (19 sitios).

El 28% de los sitios evaluados se encontraban en El Porvenir, una de las localidades con más unidades de producción. Además, el 61% de los sitios tuvieron la presencia de PHV. Los cultivares de vid más comúnmente encontrados en los sitios fueron Cabernet Sauvignon, Nebbiolo y Tempranillo. Entre los sitios estudiados, cuatro tuvieron de 75 a 100% de plantas sintomáticas, ocho sitios tuvieron de 50 a 75%, 15 tuvieron de 25 a 59% y el resto de los sitios tuvieron entre 0 y 25% (Figura 9).

Localidades como Francisco Zarco, San Antonio de las Minas y Santo Tomás exhibieron una prevalencia promedio notablemente más alta y fueron significativamente diferentes de Ojos Negros, con una prevalencia más baja ($P < 0.01$) (Figura 10A). No se encontró diferencia en la prevalencia según el cultivar ($P > 0.05$) (Figura 10B). Sin embargo, se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de plantas infestadas de PHV y la prevalencia ($P < 0.01$) (Figura 10C).

Según los análisis, las variables meteorológicas que se correlacionan con la presencia de plantas sintomáticas para GLD y/o GRBD fueron la temperatura ambiental promedio, temperatura promedio del suelo y unidades de calor acumuladas (Tabla 8). La temperatura del suelo y las unidades de calor acumuladas se relacionan positivamente a la prevalencia, es decir, aumento de estas variables mayor prevalencia y viceversa. Por el contrario, la temperatura ambiente tiene una asociación negativa con la prevalencia. Variables como precipitación, radiación solar y humedad relativa no fueron estadísticamente significativas para explicar la prevalencia.

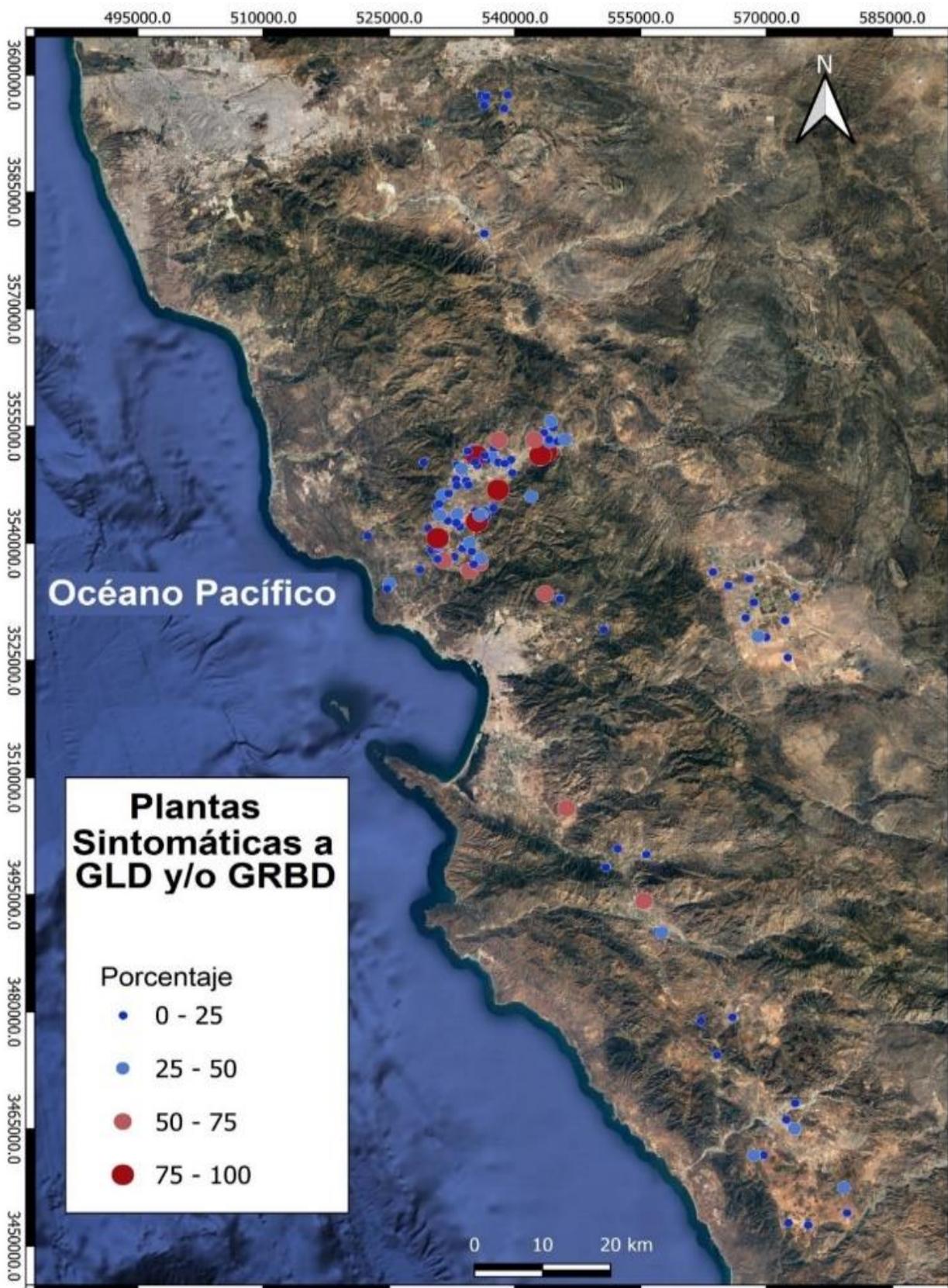


Figura 9. Mapa de prevalencia de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD en Baja California. Cada punto representa uno de los 121 sitios visitados, donde se evaluó un cuadrante de 10 líneas por 100 puntos de plantas; el color indica el porcentaje de plantas sintomáticas dentro de estos cuadrantes; de azul a rojo: menor a mayor prevalencia.

Tabla 7. Resumen de las características de las localidades de evaluación de prevalencia de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD.

Localidad	Cantidad de sitios	Sitios con presencia de síntomas*	Porcentaje promedio de plantas sintomáticas*	Cultivares de plantas	Sitios con presencia de PHV*	Tipo de manejo
Ejido Piedras Gordas	4	3 (75%)	3	Cabernet Sauvignon, Merlot, Nebbiolo	1 (25%)	Tradicional
Ejido Real del Castillo	2	0 (0%)	0	Cabernet Sauvignon	0 (0%)	Tradicional
Ejido Nacionalista de Sánchez Taboada	1	1 (100%)	69	Tempranillo	0 (0%)	Tradicional
Ejido Uruapan	3	3 (100%)	12	Cabernet Sauvignon, Grenache, Syrah	0 (0%)	Tradicional
Valle de Ojos Negros	10	6 (60%)	0.9	Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Syrah, Tempranillo, Thompson	0 (0%)	Tradicional
Valle de San Vicente	11	10 (91%)	16	Barbera, Chardonnay, Crimson, Nebbiolo, Red globe, Sauvignon Blanc, Syrah, Tempranillo	6 (55%)	Tradicional
Valle de Santo Tomás	5	5 (100%)	27	Nebbiolo, Tempranillo	1 (20%)	Tradicional
Tecate	5	5 (100%)	0.3	Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc, Merlot, Misión	1 (20%)	Tradicional
Valle de las Palmas	1	0 (0%)	0	Nebbiolo	1 (100%)	Tradicional
El Porvenir	34	34 (100%)	20	Cabernet Sauvignon, Carignan, Chardonnay, Chenin Blanc, Conlobar, Grenache, Macabeo, Malbec, Merlot, Nebbiolo, Monte Pulchiano, Primitivo, Rosa de Perú, Syrah, Tempranillo	27 (79%)	Tradicional / Orgánico
El Sauzal	2	2 (100%)	33	Cabernet Sauvignon	2 (100%)	Tradicional
Francisco Zarco	19	18 (95%)	30	Cabernet Sauvignon, Grenache, Merlot, Italian nebbiolo, Sauvignon Blanc, Superior, Tempranillo	17 (89%)	Tradicional
San Antonio de las Minas	24	24 (100%)	27	Atemporal, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Grenache, Mission, Malbec, Merlot, Nebbiolo, Red Globe, Tempranillo, Zinfandel	18 (75%)	Tradicional / Orgánico
Total	121	111 (92%)	Promedio 20%	27 cultivares	74 (61%)	Tradicional / Orgánico

*Porcentaje considerando el número total de sitios por ubicación.

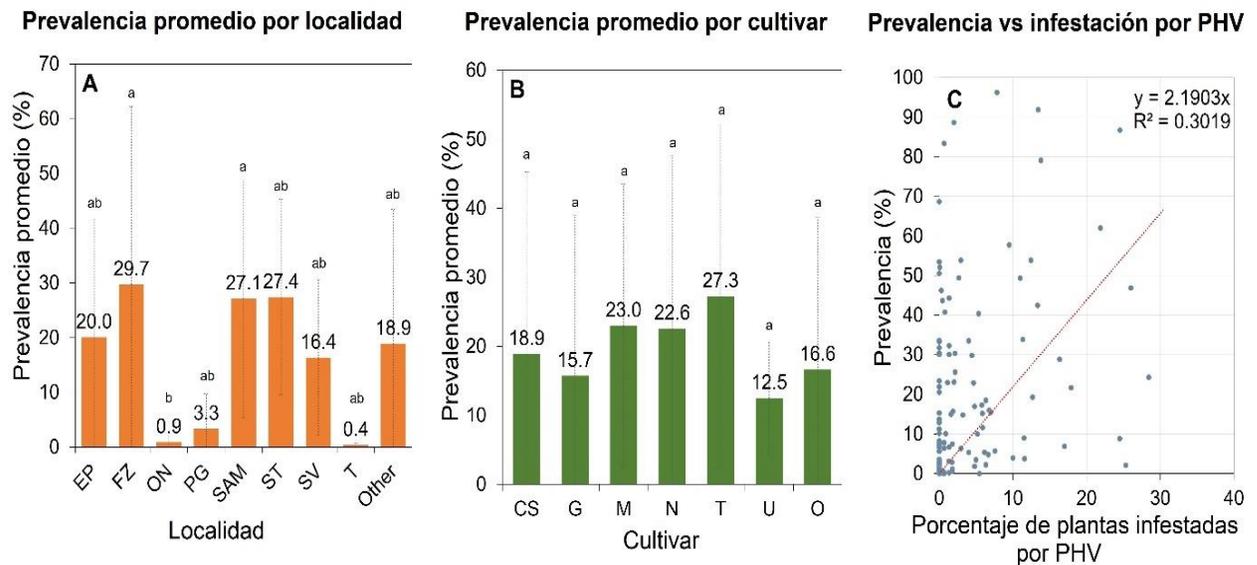


Figura 10. Prevalencia de plantas sintomáticas con GLD y/o GRBD asociado a localidad, cultivar y presencia de PHV. Letras similares en los gráficos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las variables en términos de prevalencia promedio. A: Prevalencia promedio para cada localidad (EP= El Porvenir, FZ= Francisco Zarco, ON= Valle de Ojos Negros, PG= Ejido Piedras Gordas, SAM= San Antonio de las Minas, ST= Valle de Santo Tomás, SV= Valle de San Vicente, T= Tecate, Otros (localidades con tres o menos sitios) = Ejido Real del Castillo + Ejido Nacionalista Sánchez Taboada + Ejido Uruapan + Valle de las Palmas + Sauzal). B: Prevalencia promedio por cultivar de planta (CS= cv. Cabernet Sauvignon, G= cv. Garnacha, M= cv. Merlot, N= cv. Nebbiolo, T= cv. Tempranillo, U= Desconocido, Otro (cultivares presentes en tres o menos sitios)). C: Prevalencia correlacionada con el porcentaje de plantas de vid infestadas con PHV. Para los análisis estadísticos de municipio, se utilizó la prueba t de Welch para dos muestras para evaluar las correlaciones. Para la prevalencia por localidad, cultivar y presencia de PHV, se utilizó la prueba estadística ANOVA (comparaciones múltiples de medias de Tukey, nivel de confianza familiar del 95% en variables categóricas).

Tabla 8. Regresión múltiple de variables meteorológicas para prevalencia de síntomas de GLD y/o GRBD.

Variable	Máx	Min	Prom	Coefficientes estimados	Error estándar	Valor T	P (> t) *
(Intercepto)				491.1	461.8	1.1	0.289762
Precipitación (mm)	1.7	0.1	0.4	-4.1	14.9	-0.3	0.782946
Radiación solar (Cal/cm2)	545.5	454.1	516.4	-0.6	0.5	-1.1	0.269758
Humedad relativa promedio (%)	86.4	44.3	61.1	-1.5	1.7	-0.9	0.375867
Temperatura ambiental promedio (°C)	23.6	15.7	18	-145.7	38.4	-3.8	0.0002**
Temperatura del suelo promedio (°C)	19.4	27.1	22.4	82.1	22.2	3.7	0.0003**
Unidades de calor acumuladas	5328	2330	3329	0.2	0.1	3.8	0.0002**

* Error estándar residual: 21,97 en 114 grados de libertad R cuadrado múltiple: 0,141, R cuadrado ajustado: 0,09575. Estadístico F: 3,118 en 6 y 114 DF, valor p: 0,007257. ** Significancia es igual a 0

2.3.6 Evaluación de incidencia de GLD y GRBD

Del análisis de incidencia para la evaluación espacio-temporal llevado a cabo en cinco sitios de muestreo, se clasificaron un total de 12,500 plantas, descartando los huecos sin planta en los cinco cuadrantes de diferentes sitios de 2021 a 2023. En 2022 y 2023, el número total de plantas sintomáticas se calculó como la suma de las plantas sintomáticas del año anterior, más los casos nuevos, menos los casos perdidos (Figura 11A). El aumento promedio de plantas sintomáticas por sitio fue del 1.7% en 2022 y del 9% en 2023. Todos los sitios mostraron un aumento de casos nuevos de 2022 a 2023 en comparación con el aumento observado de 2021 a 2022.

El sitio 3 exhibió la mayor cantidad de nuevos casos entre 2021 y 2023, totalizando 594 (Figura 11D), seguido del sitio 2 con 271 (Figura 11C), el sitio 1 con 187 (Figura 11B), el sitio 4 con 86 (Figura 11E) y el sitio 5 con 57 (Figura 11F). El aumento de casos nuevos por cuadrante osciló entre el 2% (sitio 5) y el 24% (sitio 3). Al hacer el análisis conjunto del porcentaje de plantas sintomáticas y el porcentaje de plantas infestadas por PHV por sitio, encontramos que en los sitios 2, 4 y 5 ambos porcentajes tienen comportamientos similares (Figura 12). En los sitios 1 y 3, que al año 2023, tuvieron grandes porcentajes de plantas sintomáticas (90.84% y 55.56%, respectivamente), y aunque se observó una disminución en el porcentaje de plantas infestadas por PHV (13.88% y 17.27% final, respectivamente), en ambos sitios se tenían porcentajes mayores de plantas infestadas el 2021 (22.66% y 19.55%, respectivamente).

El modelo GLM para los datos de incidencia indicó una variación estadísticamente significativa en las plantas sintomáticas entre sitios, años y cultivares (Tabla 9). Los años 2022 y 2023 muestran una relación positiva respecto a 2021, es decir, el número de plantas sintomáticas fue mayor en esos años. Respecto al cultivar, 'Nebbiolo' presenta una relación positiva (más probabilidades de encontrar plantas sintomáticas), mientras que 'Merlot' mostró una relación negativa (menos probabilidades de encontrar plantas sintomáticas) con la presencia de plantas de vid sintomáticas al compararlo con 'Cabernet Sauvignon'. En los sitios 2, 3, 4 y 5 es menos probable encontrar plantas sintomáticas que en el sitio 1, siendo los sitios 4 y 5 los que tienen menos probabilidades de tener plantas sintomáticas.

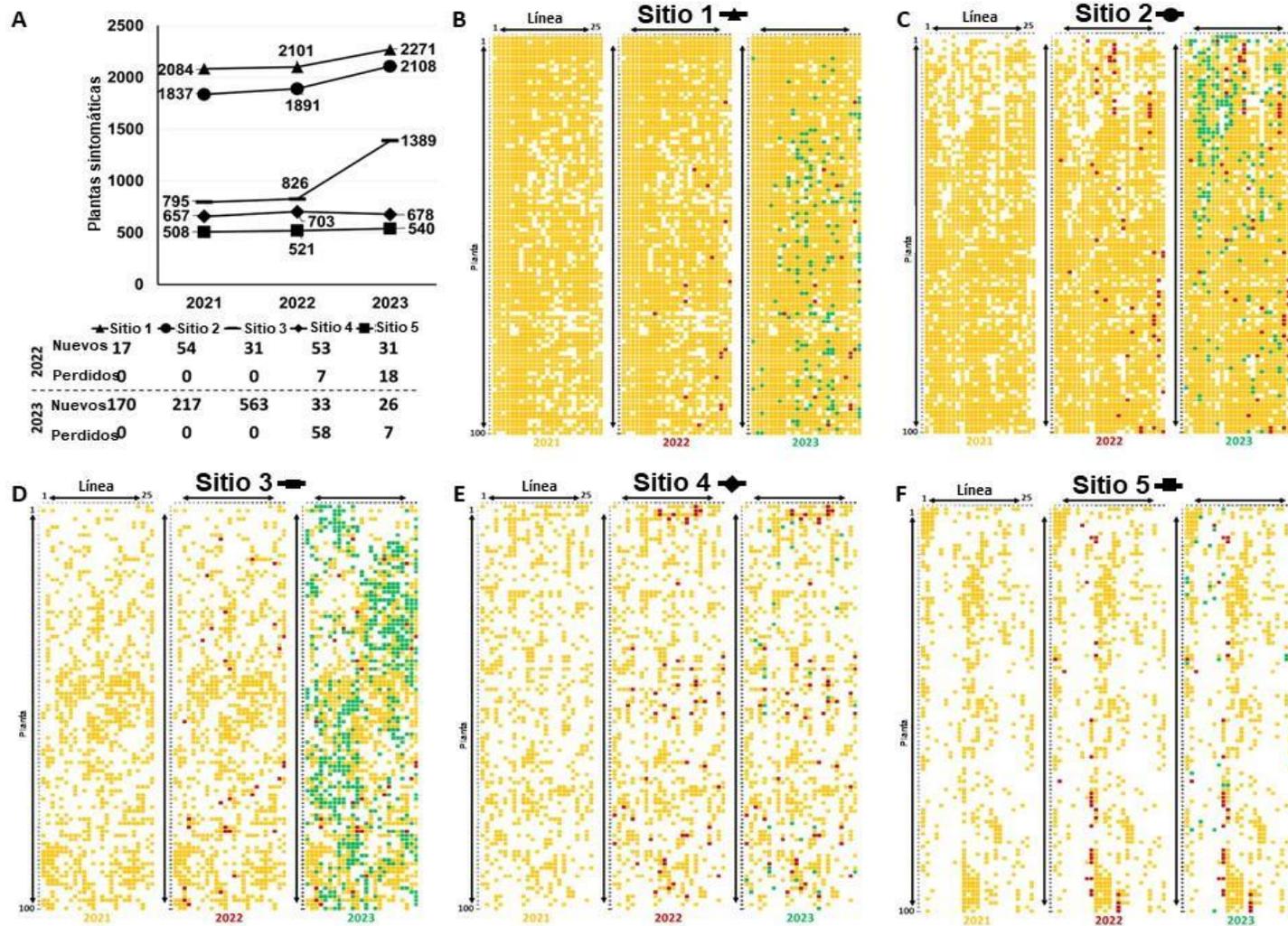


Figura 11. Distribución espacial de plantas sintomáticas de GLD y/o GRBD en cuadrantes de cinco viñedos durante tres años. B a F: Distribución espacial de plantas sintomáticas en cada sitio a lo largo del tiempo. Los cuadrantes constan de 2,500 plantas dispuestas en 25 líneas de 100 puntos de plantas cada una (aproximadamente 1 hectárea). Los cuadrados amarillos representan plantas que presentaron síntomas en 2021, los cuadrados rojos indican plantas nuevas con síntomas en 2022, los cuadrados verdes indican plantas nuevas con síntomas en 2023 y los cuadrados blancos indican plantas asintomáticas o puntos sin plantas.

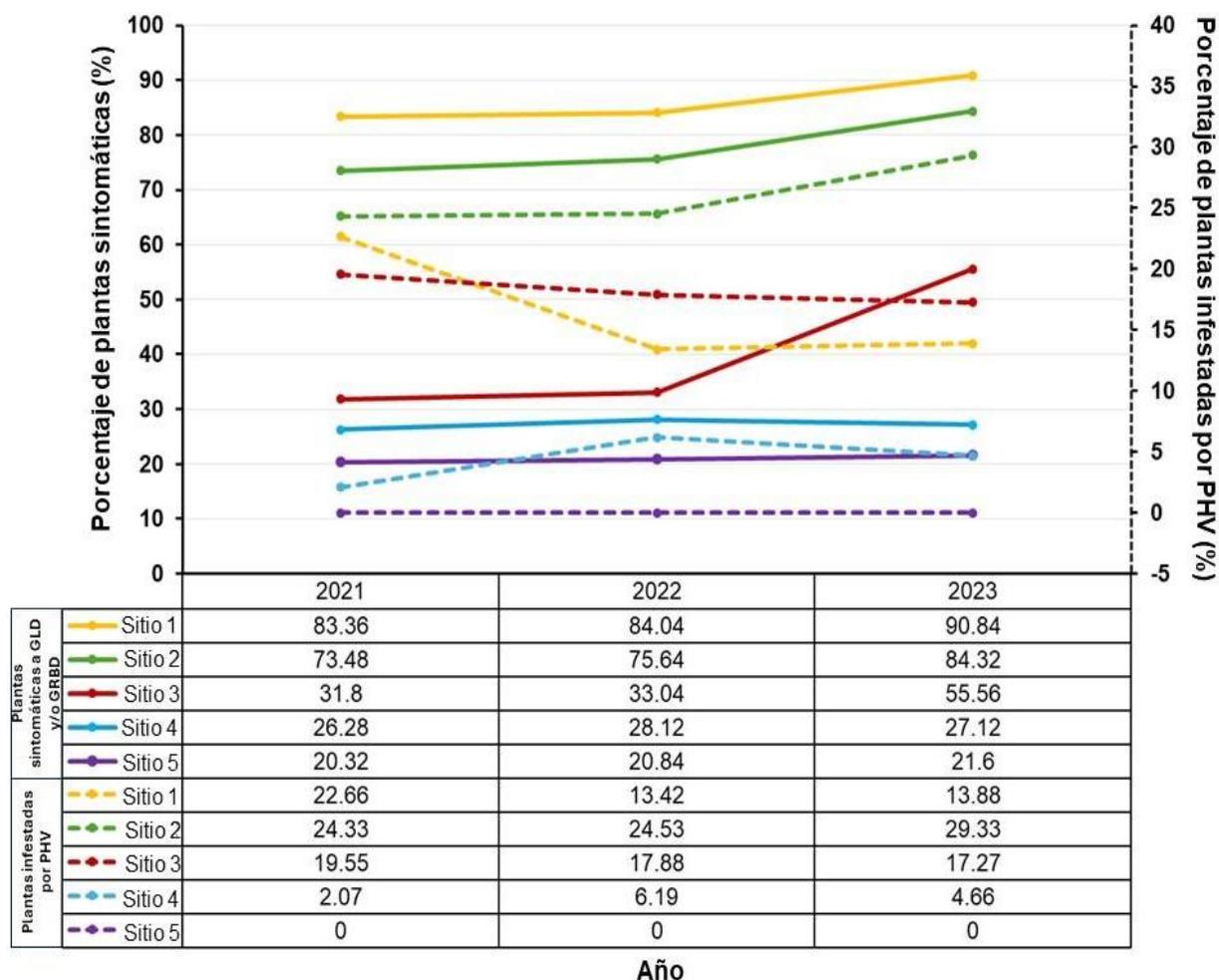


Figura 12. Porcentaje de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD y porcentaje de plantas infestadas por PHV.

Tabla 9. Coeficientes del Modelo Lineal General (GLM) que muestran las relaciones estadísticas entre varios factores y la presencia de plantas sintomáticas a GLD y/o GRBD en cinco sitios.

Variable*	Estimado	Error estándar	Valor Z	Pr(> z)
(Intercepto)	2.4	0.1	46.7	< 2e-16 ***
Año 2022	0.1	0.03	3.0	0.00246 **
Año 2023	0.7	0.03	20.0	< 2e-16 ***
cv. Nebbiolo	0.6	0.1	5.7	9.44e-09 ***
cv. Merlot	-0.9	0.1	-11.6	< 2e-16 ***
Sitio 2	-0.4	0.1	-6.7	2.25e-11 ***
Sitio 3	-2.8	0.1	-53.0	< 2e-16 ***
Sitio 4	-3.9	0.1	-34.2	< 2e-16 ***
Sitio 5	-3.8	0.1	-64.8	< 2e-16 ***

*Variables de referencia: Año = 2021, Cultivar = Cabernet Sauvignon, Sitio = Sitio 1 (el parámetro de dispersión para la familia binomial se considera 1). Desviación nula: 45376 de 33149 grados de libertad. Desviación residual: 31145 de 33141 grados de libertad. AIC: 31163. Número de iteraciones de puntuación de Fisher: 5. Precisión del modelo = 0.7867*** Significancia igual a 0** Significancia igual a 0.001.

2.4 Discusión

En este estudio, el diagnóstico visual identificó eficientemente plantas sintomáticas positivas para virus asociados con GLD o GRBD (sensibilidad del 91%). Sin embargo, sólo el 52% de las plantas asintomáticas resultaron negativas mediante PCR en tiempo real. La baja especificidad podría deberse a la etapa de la infección, la ausencia de síntomas durante la infección y la variabilidad de los síntomas y factores que influyen en ellos (Poojari et al., 2013). Como se observó en otros estudios, GLRaV-3 fue el virus más prevalente y se encontraron infecciones mixtas (Aou-Ouad et al., 2022; Xiao et al., 2018).

Cabe señalar que la optimización de técnicas moleculares de diagnóstico fue parte esencial para el desarrollo de este trabajo. Especialmente la aplicación de la RT-PCR en tiempo real a partir de ácidos nucleicos totales (ANT), ya que redujo el tiempo de procesamiento de gran cantidad de muestras incluyendo diagnósticos de virus con genoma de ARN o ADN con solo una extracción. Con ello, esta metodología resultó eficiente para el diagnóstico de GRBV mediante la detección del gen y ARN mensajero de la proteína de la cápside (CP), cuya secuencia es altamente conservada y se transcribe en gran abundancia en los geminivirus (Fondong, 2013). Sin embargo, es importante mencionar que, en la práctica, los ANT son susceptibles a los cambios bruscos de temperatura (congelado y descongelado) y a la exposición a altas temperaturas por tiempo prolongado, por lo que deben ser tratados con cuidado. Por ejemplo, muestras que durante el 2020 resultaron positivas por RT-PCR punto final (Anexo F, Figura 27), hacia el 2021 parecían ser falsos positivos, por lo que pudo influir la amplia manipulación y utilización de esas muestras entre un diagnóstico y otro.

En este estudio, el diagnóstico visual basado en la sintomatología incluyó tanto a GLD como a GRBD indistintamente ya que ambas enfermedades comparten síntomas, particularmente el enrojecimiento de las hojas. En la región de Baja California, encontramos los síntomas previamente reportados para ambas virosis (Rayapati et al., 2008; Rohrs et al., 2023) y coincidimos en que es difícil asociar los síntomas a GLD o GRBD de manera categórica (Adiputra et al., 2018). Aunque, el seguimiento visual de los síntomas puede ser una herramienta valiosa para reducir costos, esta técnica debe utilizarse sólo como primer método de detección debido a su baja especificidad. Además, la sintomatología asociada a las enfermedades GLD y GRBD puede confundirse con fenotipos causados por otros factores. En el caso de cultivares tintos, el enrollamiento puede manifestarse como respuesta a una infestación de ácaros o a deficiencias nutricionales de potasio o fósforo. Asimismo, en cultivares blancos, la clorosis también puede estar asociada a la deficiencia de magnesio (Cieniewicz, Perry, et al., 2017). Por tanto, para un diagnóstico fiable se deben utilizar pruebas moleculares como la PCR (Sudarshana et al., 2015). Inicialmente se pensó que las primeras plantas sintomáticas de GRBD en Estados Unidos se debían a GLRaVs, y no fue hasta 2018 que

el GRBV se asoció oficialmente con GRBD (Krenz et al., 2023; Yepes et al., 2018). Por lo tanto, sería incorrecto clasificar a las plantas con enrojecimiento como pertenecientes a GLD o GRBD. Además, los virus que causan ambas enfermedades pueden estar presentes en la misma planta, como lo demuestra el diagnóstico molecular, donde se encontraron infecciones mixtas de GLRaV-3, GLRaV-2 y GRBV en casi la mitad de las plantas analizadas infectadas.

Aunque se ha reportado que la manifestación de los síntomas de GLD comienza poco después del envero (Martelli, 2017), observamos la mayor expresión de los síntomas hasta antes de la cosecha, similar al estudio de Rohrs et al. (2023), quienes cuantificaron el aumento progresivo de la incidencia de GRBD por síntomas desde el envero hasta el inicio de la caída de las hojas. Además, ese estudio mostró que la manifestación de los síntomas estaba restringida a algunas partes del dosel, una aparición diferente de los síntomas en lados opuestos del dosel y una aparición tardía de los primeros síntomas. También mencionan que, si los síntomas visuales se cuantifican y mapean antes de su máxima expresión, las vides enfermas pueden pasarse por alto y subestimar la incidencia de la enfermedad. Adicionalmente, Donda et al. (2023) encontraron que al monitorear GLD durante la temporada de crecimiento, se observa un aumento gradual en la incidencia de GLD, con un mayor porcentaje de plantas sintomáticas ubicadas en líneas cercanas a bloques de plantas viejas e infectadas. Por lo tanto, realizamos las visitas en tres tiempos, con aproximadamente 20 días de diferencia, para definir el tiempo de monitoreo óptimo dentro del período de presencia de síntomas de GLD y/o GRBD en las plantas de vid, determinando que al final de la cosecha y pocos días antes de la senescencia de hojas, es el mejor momento para el monitoreo de síntomas. Asimismo, encontramos que una planta puede tener distintos niveles de síntomas en sus hojas, e incluso ser asintomáticas y tener presencia de virus.

En el estudio de prevalencia, se encontró que el 92% de los sitios visitados tuvo plantas sintomáticas de GLD y/o GRBD, y se detectó PHV en el 61% (74 de 121) de los sitios, con una prevalencia promedio de plantas sintomáticas del 20%, considerando los 121 sitios. La prevalencia varió desde el según el municipio y la localidad de los sitios (niveles significativamente más altos en Francisco Zarco, El Sauzal y Ejido Sánchez Taboada), pero no según el cultivar de vid. Nuestros resultados también indican una baja presencia de plantas sintomáticas de GLD y/o GRBD, incluso del 0%, en Real del Castillo, Ojos Negros, Tecate y Valle de las Palmas, que son sitios con baja o nula presencia de PHV y están alejados de áreas con gran cantidad de viñedos.

En el caso de GLD, la presencia de PHV, un vector conocido de GLRaV-1 y GLRaV-3, juega un papel adicional. Este estudio demostró que el porcentaje de plantas infestadas (plantas con al menos un PHV) se asoció

positivamente con la prevalencia de GLD. Se espera que esta asociación se fortalezca con el tiempo, ya que la presencia de cochinillas (tanto PHV, como el piojo de la uva) favorece la propagación especialmente de GLRaV-3, como se ha demostrado en otros estudios (Cabaleiro et al., 2022; Cooper et al., 2018). Sin embargo, también se encontraron casos de alta prevalencia con baja infestación de PHV, como es el caso del Valle de las Palmas. La propagación de plantas contaminadas podría explicar esto porque muchos viñedos en esta región se originan a partir de portainjertos de material local, que pueden desempeñar un papel en la diseminación de GLRaVs o GRBV, como se ha demostrado en otras regiones vitivinícolas (Donda et al., 2023; Maree et al., 2013). Otra fuente potencial es la importación de vides infectadas de otros lugares; sin embargo, serán necesarios más datos para corroborar la influencia del movimiento de material vegetal contaminado en la propagación de virus en Baja California. En este estudio, no se consideró la presencia de vectores de GRBV, ya que, hasta la fecha no se han reportado vectores conocidos en Baja California. Sin embargo, las comunicaciones personales especulan sobre la presencia de vectores potenciales, lo que hace imperativo continuar monitoreando el GRBD y buscando insectos que potencialmente tengan un papel en la propagación del GRBV en la región.

La fenología de la vid está profundamente influenciada por el clima (Cola et al., 2017). En cuanto a la presencia de plantas sintomáticas observadas y su relación con la meteorología, se observó que la temperatura del suelo y las unidades de calor acumuladas se asociaron positivamente con la presencia de plantas sintomáticas. Esto podría estar asociado con el PHV, ya que estos insectos muestran diferencias de desarrollo dependiendo de las temperaturas de exposición. Además, los aumentos de temperatura del suelo favorecen la movilización del PHV, así como la puesta y eclosión de huevos en los troncos (Dalton et al., 2014). Incluso son útiles para monitorear al PHV, ya que esta especie requiere 235 grados día de crecimiento para completar una generación, por lo que cuanto mayor sean las unidades de calor acumuladas, más rápido será el aumento de las poblaciones (Walton, 2003). Asimismo, las unidades de calor acumuladas son un buen indicador de la fenología de las plantas de vid. Además, se espera que la epidemiología de los virus de las plantas se altere en el futuro debido al cambio climático, incluido el aumento del dióxido de carbono atmosférico, el aumento de la temperatura, el déficit hídrico y los fenómenos meteorológicos extremos, que podrían aumentar la frecuencia y el incremento de los brotes de enfermedades (Jeger et al., 2023; Trebicki, 2020; Tsai et al., 2022). Sin embargo, en nuestro caso utilizamos el promedio anual de cada una de las variables en el año evaluado, por lo que esta información debe tomarse con reservas, ya que la utilización de información en fechas más precisas y de estaciones meteorológicas más cercanas a los sitios, podría reflejar relaciones con otras variables meteorológicas, aparte de la temperatura o unidades de calor acumuladas, y en distinto nivel.

Los resultados muestran que la incidencia de síntomas de GLD y/o GRBD con el año de la evaluación aumentando del 2021 al 2023, el sitio y el cultivar. Los sitios 1, 2 y 3, geográficamente más cercanos, tuvieron el mayor número de plantas sintomáticas, seguidos por el sitio 4. El sitio 5, donde el PHV estaba ausente, tuvo el menor número de casos en los tres monitoreos. El sitio 3 tuvo el mayor aumento en el total de casos nuevos y correspondió a la presencia del cultivar 'Nebbiolo' (estadísticamente más asociado con mayor porcentaje de plantas sintomáticas que 'Cabernet Sauvignon' o 'Merlot'). El aumento significativo de los síntomas en el sitio 3 podría explicarse por la alta carga de PHV registrada desde años anteriores, que pudo contribuir a la infección por GLRaVs, y se manifestó hasta 2023; ya que sabe que cuando los síntomas son evidentes, pueden observarse a veces cuatro a cinco años después del ingreso del virus al viñedo (Cieniewicz, Pethybridge, et al., 2017). Este efecto también se puede observar en el caso del sitio 1, donde los casos sintomáticos aumentaron con el tiempo, a pesar de que la infestación de PHV disminuyó para 2023. Se necesita un estudio más extenso para evaluar el impacto de los vectores en la transmisión de virus y sobre el efecto del cultivo de la vid a largo plazo.

La asociación entre plantas sintomáticas y cultivares en el estudio de incidencia contrastó con los resultados del trabajo de prevalencia, donde no se encontraron diferencias entre cultivares. Este resultado puede deberse a la gran diversidad de cultivares monitoreados en el análisis de prevalencia. Sin embargo, el monitoreo longitudinal (incidencia) de algunas cultivares, permitió encontrar diferencias entre cultivares. Es importante considerar que la sintomatología puede verse influenciada por la sensibilidad del cultivar de la planta a la infección. Chooi et al. (2022), observaron una amplia variabilidad en los síntomas foliares entre las regiones de estudio; los cultivares y genotipos de frutos rojos en los viñedos de Nueva Zelanda también se asociaron con la temporada de muestreo.

La mayoría de las investigaciones epidemiológicas sobre GLD y GRBD se centran en viñedos establecidos (como en nuestro caso). La incidencia reportada en algunos estudios varió según los bloques o regiones de estudio (Chooi et al., 2022; Flasco et al., 2023), similar a nuestros hallazgos que muestran un aumento anual promedio por sitio del 1.7% y 9% en 2022 y 2023, respectivamente; siendo la incidencia más baja de 0.7% en el sitio 1 durante el 2022 y la incidencia más alta de 25.19% en el sitio 3 durante el 2023. No evaluamos la edad de los viñedos, pero se ha encontrado que la incidencia relativa de GLRaVs podría diferir entre regiones y bloques de viñedos de diferente edad (Poojari et al., 2017).

Estudios epidemiológicos como este son el primer paso hacia el desarrollo de prácticas de manejo de virus, como se ha demostrado en muchas otras regiones productoras de vid (Achala et al., 2022; Almeida et al., 2013; Arnold et al., 2017; Cieniewicz et al., 2018; Cieniewicz, Pethybridge, et al., 2017; Cooper et al., 2018;

Dalton et al., 2019; Fuchs et al., 2009; Jones et al., 2015; Jooste et al., 2015; Liu et al., 2013; Martelli, 2017; Milkus y Goodman, 1999; Poojari et al., 2017; Rohrs et al., 2023). Algunas sugerencias de manejo incluyen el control de PHV, el descortezar y garantizar la plantación de material vegetal certificado libre de virus, prestando especial atención a las áreas de cultivos extensivos y alta presencia de PHV. Por lo que para Baja California se puede sugerir, atención prioritaria a localidades como El Porvenir, Francisco Zarco, San Antonio de las Minas y Valle de San Vicente.

Este estudio se suma a investigaciones recientes sobre virus de la vid en México, incluido el primer reporte de GRBV en el país (Gasperin-Bulbarela et al., 2019), revisiones de virus presentes en el país y sus implicaciones (Beltrán-Beache et al., 2021; Diaz-Lara, Aguilar-Molina, et al., 2023; Garcia-Resendiz y Carrillo-Tripp, 2022), y análisis metagenómicos en Querétaro que comunican la presencia de virus no reportados previamente en México (Diaz-Lara, Stevens, et al., 2023). Es importante señalar que aún se desconoce mucho y que el trabajo realizado hasta ahora no aborda el impacto de virus en la producción.

2.5 Conclusión

La implementación del diagnóstico basado en síntomas para evaluar la ocurrencia de GLD y/o GRBD en Baja California reveló que las plantas sintomáticas estuvieron presentes en el 92% de los sitios monitoreados, con una asociación positiva con la presencia de PHV y variables meteorológicas como la temperatura del suelo. Además, el análisis de incidencia demostró un aumento de casos a lo largo del tiempo, lo que también está asociado al cultivar estudiado. El diagnóstico molecular confirmó la utilidad del monitoreo visual como herramienta para identificar plantas con GLD y/o GRBD.

La amplia distribución de GLD y GRBD en Baja California exige más investigaciones para mitigar el impacto económico en el sector vitivinícola. La información generada en este trabajo es una herramienta para desarrollar y aplicar estrategias de manejo regional, principalmente para priorizar áreas que requieren especial atención en función de la presencia de factores que las hacen susceptibles a estas enfermedades. Se recomienda continuar con la evaluación espaciotemporal de enfermedades virales, la búsqueda y manejo de vectores, la transferencia de tecnologías, y los esfuerzos colaborativos con el sector productivo. Si no se toman medidas para reducir la propagación de GLD y GRBD en el corto plazo, la situación se convertirá en un desafío difícil de gestionar; los resultados aquí presentados sirven como base de referencia para implementar acciones.

Capítulo 3. Biogeografía del piojo harinoso de la vid y el grapevine leafroll-associated virus 3

3.1 Resumen

En este capítulo se desarrolla el segundo objetivo específico, que aborda la biogeografía del piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus*, PHV) y el grapevine leafroll-associated virus 3 (*Ampelovirus trivitis*, GLRaV-3). El PHV constituye un problema fitosanitario en diversas regiones vitícolas alrededor del mundo, afectando principalmente los cultivos de vid y actuando como vector de GLRaV-3, virus predominante del complejo causal de GLD. En México, el PHV fue identificado por primera vez en Sonora en el año 2000 y posteriormente en Baja California en 2014. Determinar el origen de esta plaga invasora y del GLRaV-3, podría contribuir a la optimización de su tratamiento y favorecer la implementación de estrategias de manejo agroecológico de plagas. Para esclarecer el origen de las poblaciones invasoras del PHV en Baja California, se muestrearon 16 sitios para PHV y 8 sitios para GLRaV-3.

Para PHV, las muestras se procesaron en 4 agrupados según su cercanía y/o de manera individual, y se procedió a secuenciar el ADN genómico correspondiente al espaciador de genes ribosomales nucleares transcrito interno (*its1*) y al citocromo oxidasa c uno mitocondrial (*co1*). Mientras que para el GLRaV-3, se secuenció el material genómico correspondiente a la proteína homóloga de choque térmico (*hsp70h*). Posteriormente, se llevó a cabo una comparación con secuencias de PHV registradas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Los análisis filogenéticos de *co1* e *its1* mediante el método de inferencia Bayesiana revelaron una estrecha concordancia con unas muestras provenientes de Estados Unidos, Sonora, Egipto e Israel (perteneciente al clado de Medio Oriente).

En el caso del GLRaV-3, las filogenias de *hsp70h*, mostraron a las muestras de Baja California relacionadas dentro del mismo clado con muestras de Estados Unidos, Nueva Zelanda, Alemania y Sudáfrica. Estos resultados teorizan sobre el origen de las poblaciones en cuestión. Para atender estos problemas fitosanitarios es necesario realizar una mirada en retrospectiva para analizar lo que se ha hecho en otras regiones del mundo con material genético compartido, haciendo uso de, por ejemplo, manejo integrado de plagas y aplicación de la agroecología.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Sitio de estudio

Con la intención de estudiar el origen geográfico y la diferenciación entre poblaciones del PHV y GLRaV-3 presente en Baja California, se visitaron 20 sitios (Figura 13). Las muestras colectadas se procesaron en grupos y/o de manera individual, como se especifica en el mapa. Todos los mapas fueron generados en QGIS 3.34.0 (QGIS Development Team, 2018).

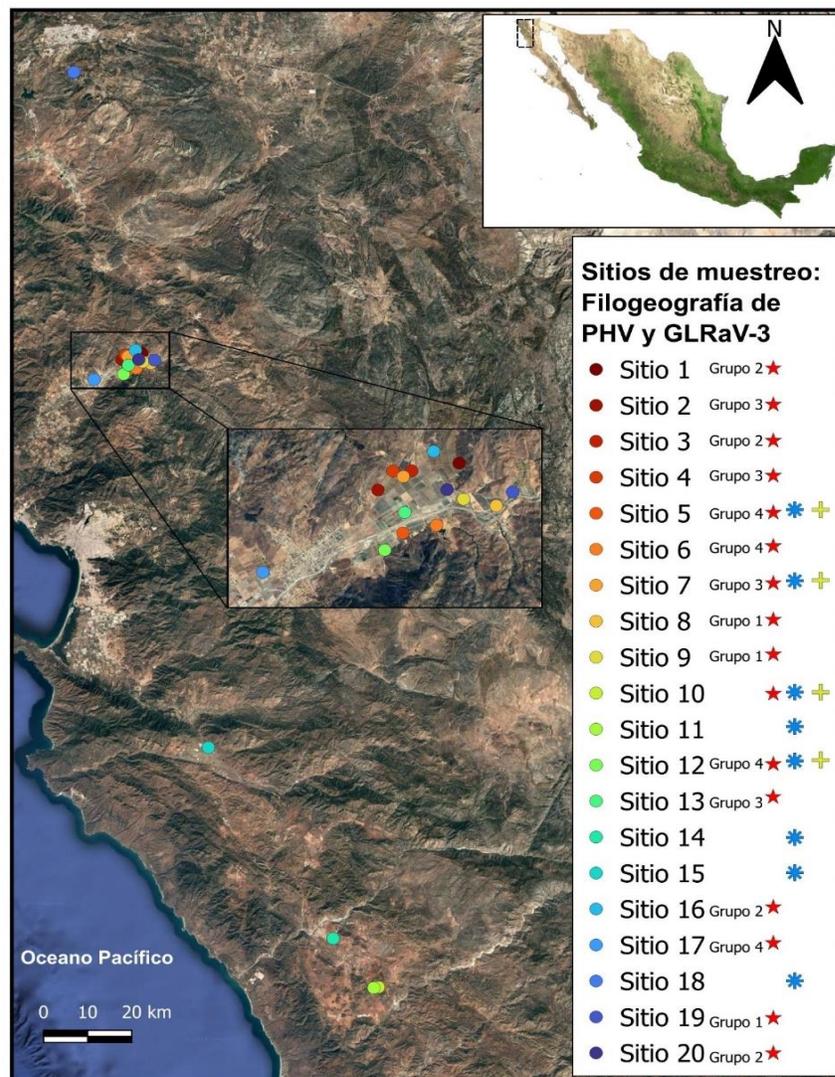


Figura 13. Mapa de sitios de muestreo para filogeografía del PHV y GLRaV-3. Grupo= sitios cuyas muestras fueron procesadas agrupadas para PHV. Estrella roja= sitios de estudio de PHV. Asterisco azul= sitios de estudio de GLRaV-3. Cruz amarilla= sitios con muestras procesadas de manera individual y para análisis de haplotipos.

3.2.2 Procesamiento de las muestras

Para el PHV se realizaron muestreos de manera dirigida, desde abril hasta septiembre de 2022. La toma de muestra consistió en la recolecta de individuos directo de la planta. Se descortezaron las plantas y posteriormente se tomaron los insectos con ayuda de un pincel o una aspiradora y se depositaron en un tubo Falcon de 50 mL. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Virología Agrícola y se limpiaron de impurezas o se guardaron a 4 °C hasta su uso. Posteriormente, las muestras se resguardaron en alcohol absoluto a 4°C. Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1990), con modificaciones, entre las que se incluyen la cantidad de tejido (menor en nuestro caso), uso de NaCl para remover polisacáridos y PVP para remover polifenoles. Las muestras agrupadas (= “pools”) contaron con insectos de tres o cuatro sitios por grupo. De los sitios en que se procesaron individualmente, se analizaron cinco individuos de cada sitio.

Las muestras de plantas de vid para análisis de GLRaV-3 se seleccionaron a partir de las que se utilizaron en los análisis moleculares del capítulo anterior. La cantidad de muestra por sitio se seleccionó conforme a disponibilidad. De los sitios 12 y 5 se utilizaron cuatro muestras de cada sitio; del sitio 7, siete muestras; y de los sitios 10, 11, 14, 15 y 18, una muestra de cada sitio.

Todos los propietarios de viñedos o sus representantes firmaron un formulario de consentimiento informado para participar en el proyecto. Para garantizar la confidencialidad de los datos, no se revela la identidad ni la ubicación exacta de los viñedos muestreados.

3.2.3 Análisis molecular y filogenético

Una vez realizada la extracción de ADN de PHV en pool o de individuos, se realizó la amplificación de los genes, visualización en gel de agarosa al 1.5% y purificación con el Zymoclean gel ADN recovery kit de Zymo research siguiendo las instrucciones del fabricante. Para conocer la diversidad genética y las relaciones filogeográficas se amplificó un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad c (*co1*) con los cebadores: Pat 5'-TCCAATGCACTAATCCATATTA-3' y Jerry 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3' (706 pb) (Simon et al., 1994), GK 5'-CAGGATTTGGTGCTATATCTC-3' y GF 5'-TAGGAGAATTATTTAATCAT-3' (Daane et al., 2018) y el espaciador de genes ribosomales nucleares transcrito interno 1 (*its1*) con los cebadores: CAS18sF1 5'-TACACACCGCCGTCGCTACTA-3' y 5p8sB2 5'-AACCTGCGGATTACACGACGA-3' (497 pb) (Ji et al., 2003). Los productos de PCR de los genes de interés se enviaron a secuenciar a Eton

Bioscience, Inc. San Diego, CA. Las secuencias se visualizaron en BioEdit 7.2 (Hall, 1999) para analizar la variación de nucleótidos, se editaron y alinearon en el programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, 1991). Se comparó el material genético de estas poblaciones con información disponible en la base de datos GenBank del NCBI y estudios previos (la información de las secuencias analizadas y los números de acceso a GenBank están el material suplementario de Daane et al., 2018). Se utilizaron muestras de otros ejemplares que eran morfológicamente distintos a *P. ficus* como grupos externos en los análisis (*Pseudococcus longispinus* y *Planococcus citri*). Para la obtención de los mejores modelos de sustitución nucleotídica se utilizó PartitionFinder 2 (Lanfear et al., 2011), determinando utilizar los modelos [TRN+I], [F81], [TRN] y [K81+I]. La elaboración de los árboles filogenéticos se llevó a cabo en MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011) con dos corridas de cuatro cadenas Markovianas de 50,000,000 generaciones, con frecuencia de almacenamiento cada 5,000 generaciones y con almacenamiento de las longitudes de las ramas. Por último, los árboles se visualizaron en FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2006). Se obtuvieron los árboles filogenéticos para *co1* e *its1*, y posteriormente se analizaron las secuencias concatenadas uniendo las matrices alineadas de ambos marcadores en BioEdit 7.2 (Hall, 1999).

Posterior a la obtención de ARN de las plantas de vid, se amplificó el gen viral de la proteína homóloga de choque térmico (*hsp70h*) con los cebadores LR3 5'-LC1F CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT-3' y LR3 5'-LC2R GTTGTCCTCCGGTACCAGATAT-3' (546 pb) (Turturo et al., 2005), se visualizaron los productos en gel de agarosa al 1.5% y se purificaron. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen, Corea. Las secuencias se visualizaron, editaron y alinearon en BioEdit 7.2. Se comparó el material genético de estas poblaciones con información disponible en GenBank y estudios previos (los números de acceso a GenBank de cada secuencia utilizada se encuentran en el Anexo O, Tabla 22). Para la obtención de los mejores modelos de sustitución nucleotídica se utilizó PartitionFinder 2 (Lanfear et al., 2011). La elaboración de los árboles filogenéticos se llevó a cabo en MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011) con dos corridas de cuatro cadenas Markovianas de 50,000,000 generaciones, con frecuencia de almacenamiento cada 5,000 generaciones y con almacenamiento de las longitudes de las ramas. Por último, los árboles se visualizaron en FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2006).

Los datos genéticos se organizaron en haplotipos (conjunto de variaciones de una secuencia o polimorfismos) muestreados en cada sitio (sitios 5, 7, 10 y 12) para *its1* en el caso del PHV y *hsp70h* para GLRaV-3 en plantas de vid. Se utilizó DnaSP v.6 (Rozas et al., 2017) para examinar los polimorfismos entre y dentro de los sitios. La relación genealógica y geográfica entre los haplotipos, se analizó utilizando el

algoritmo de unión de medias implementado en PopArt 1.7 (Bandelt et al., 1999). Todos los mapas fueron generados en QGIS 3.34.0 (QGIS Development Team, 2018).

3.3 Resultados

3.3.1 Amplificación de genes del piojo harinoso de la vid y del virus GLRaV-3

Se utilizaron los cebadores de *its1* y de *co1* específicos para el PHV (*Planococcus ficus*). Las muestras de los sitios visitados durante 2022 se agruparon en 4 pools. Se analizaron muestras de San Vicente, Sonora y de otras especies de piojo encontradas tanto en vid, como en otras plantas. Las muestras agrupadas se probaron con los distintos marcadores, en la Figura 14, se encuentran los productos de PCR de las muestras que se utilizaron para filogeografía, mostrando como ejemplo la amplificación del gen *its1*. Posteriormente, se procesaron las muestras individualmente para *its1*, dando un total de 20 muestras. En este caso la amplificación sólo se realizó con dicho marcador. En la figura 15, se muestran los amplicones en el gel de agarosa.

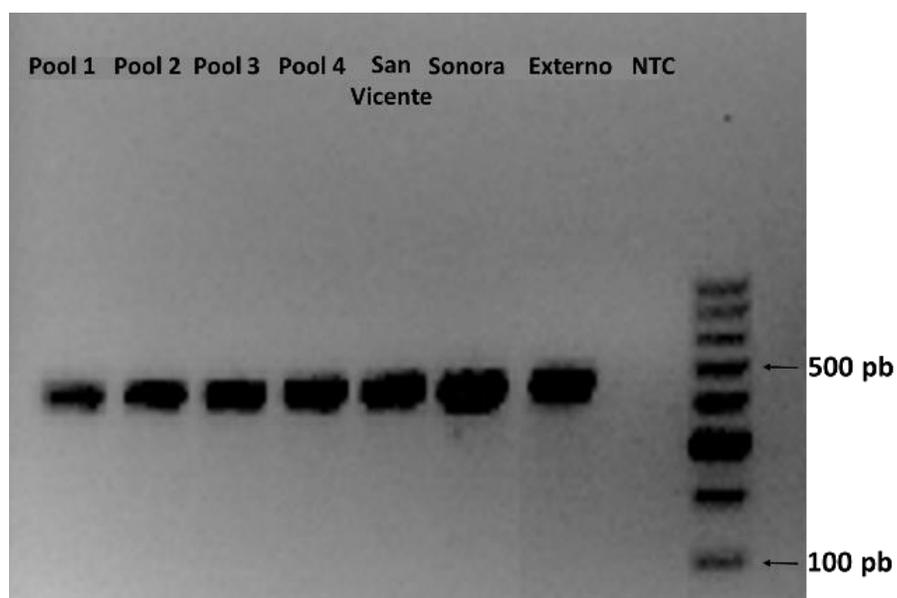


Figura 14. Productos de PCR del *its1* en muestras de PHV que se utilizaron para posteriores análisis de filogeografía (producto esperado 497 pb). Las fotografías de los gels fueron obtenidas en distintos ensayos y las imágenes fueron reconstruidas para esta figura. NTC= control sin plantilla. pb= pares de bases.

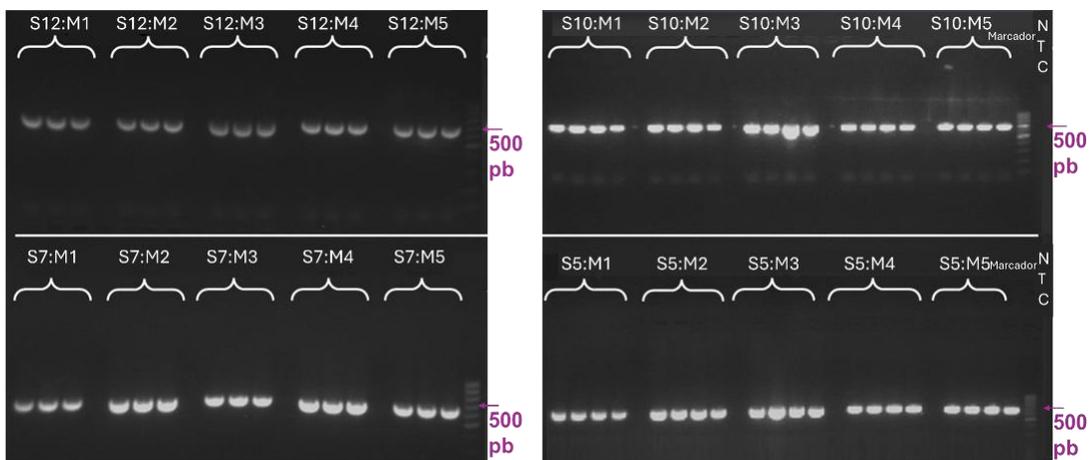


Figura 15. Amplicones de las muestras individuales de PHV con el marcador *its1* (producto esperado 497 pb). NTC= control sin plantilla. Pb= pares de bases. S= Sitio. M= Muestra

En la Figura 16, se muestran los amplicones en gel de agarosa de las muestras que se secuenciaron para el análisis de *hsp70h*.

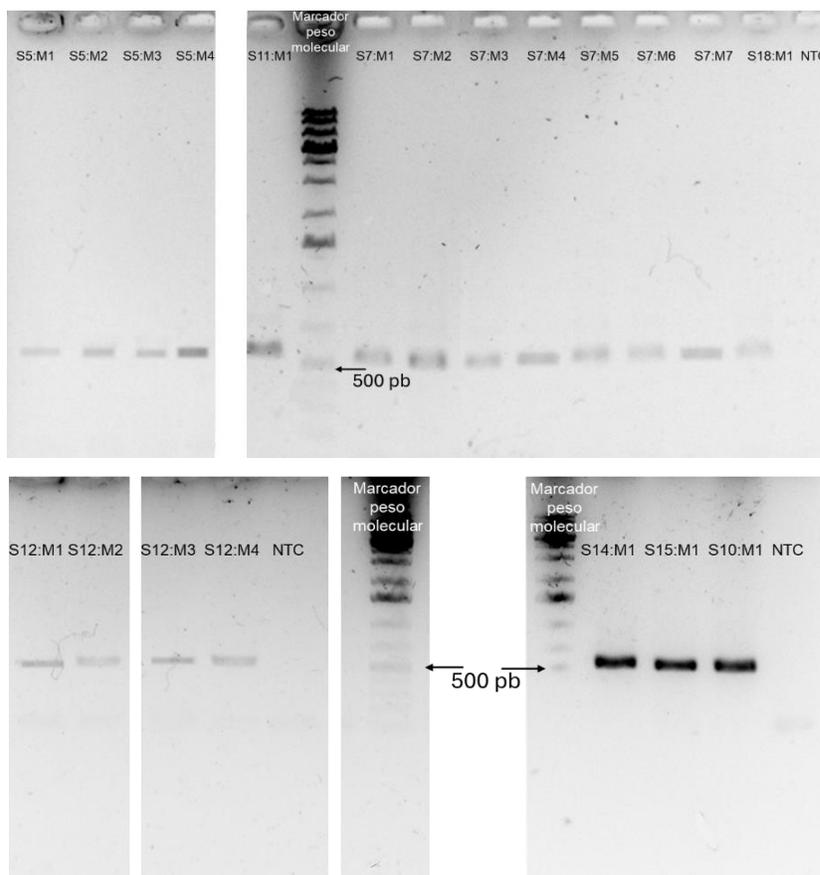


Figura 16. Amplicones de las muestras de vid/GLRaV-3 con el marcador *hsp70h* (producto esperado 546 pb). Las fotografías de los gels fueron obtenidas en distintos ensayos y las imágenes fueron reconstruidas para esta figura. NTC= control sin plantilla. pb= pares de bases. S= Sitio. M= Muestra.

3.3.2 Árboles filogenéticos

En los árboles filogenéticos del PHV se formaron dos clados principales: uno mediterráneo y uno de Medio Oriente (Figura 17). Sin embargo, el análisis del *its1*, agrupa a las muestras de Baja California con muestras de EUA e Israel, mientras que uno de los pools se inserta en un clado con EUA, Portugal, Italia y Francia.

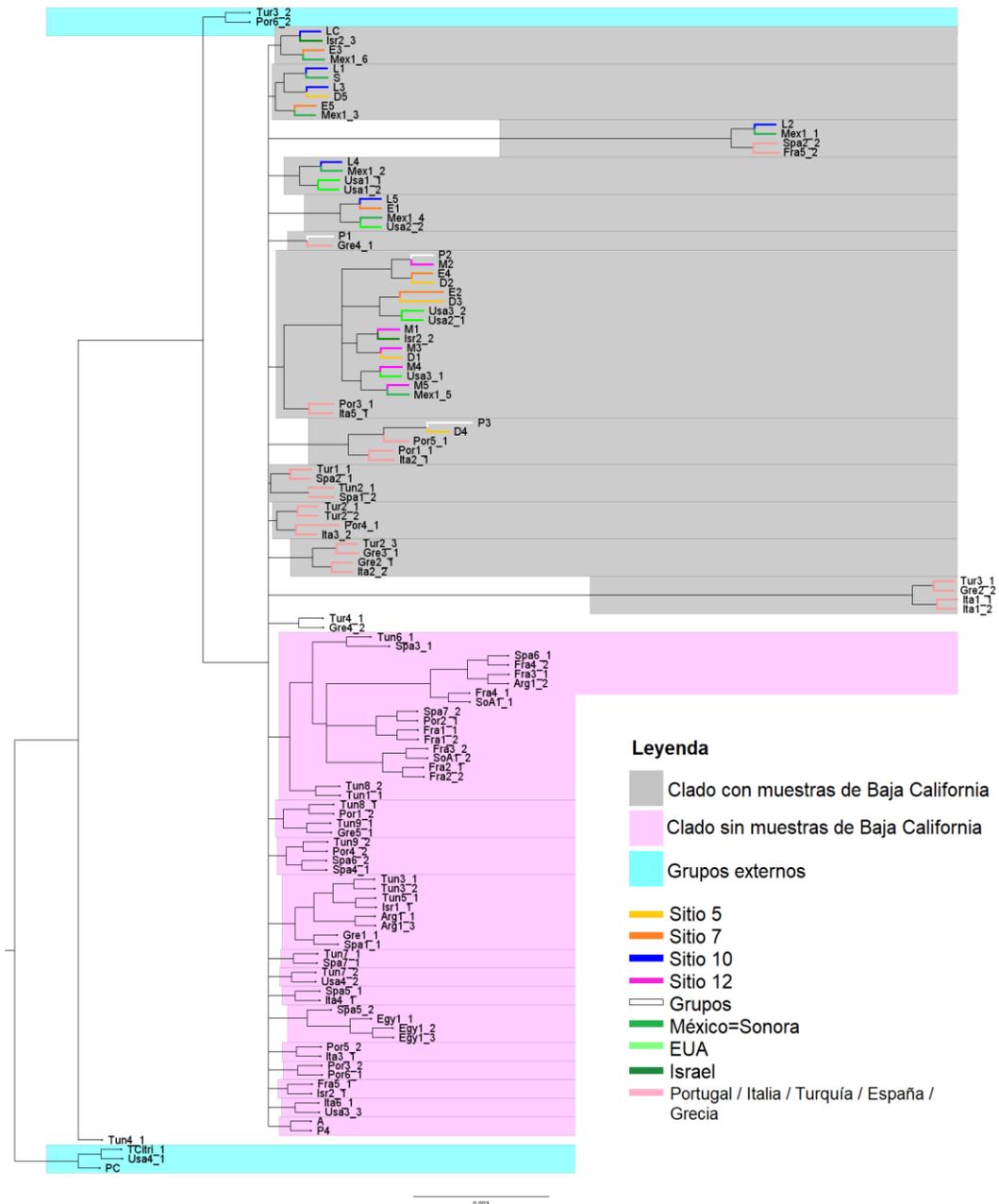


Figura 17. Árboles Bayesianos consenso de *its1* para poblaciones de PHV: *Planococcus ficus* (y grupos externos *Pl. citri*, *Ps. longispinus* y *Ps. viburni*) de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p > 0.9$) en los nodos. Las poblaciones de insectos se colectaron en Baja California y Sonora, México y se agruparon por ciudad más cercana y aislado analizado. Barra de escala, 0.003 sustituciones nucleotídicas por sitio en ambos árboles.

Por su parte las muestras de *co1* (Figura 18), muestran una agrupación más clara con Sonora y EUA, y Medio Oriente. Por lo que, los eventos de invasión de *P. ficus* en América del Norte, incluyendo Baja California, probablemente se originaron del grupo del Medio Oriente, ya que una secuencia de Israel está más estrechamente relacionada con California y México (Sonora y Baja California).

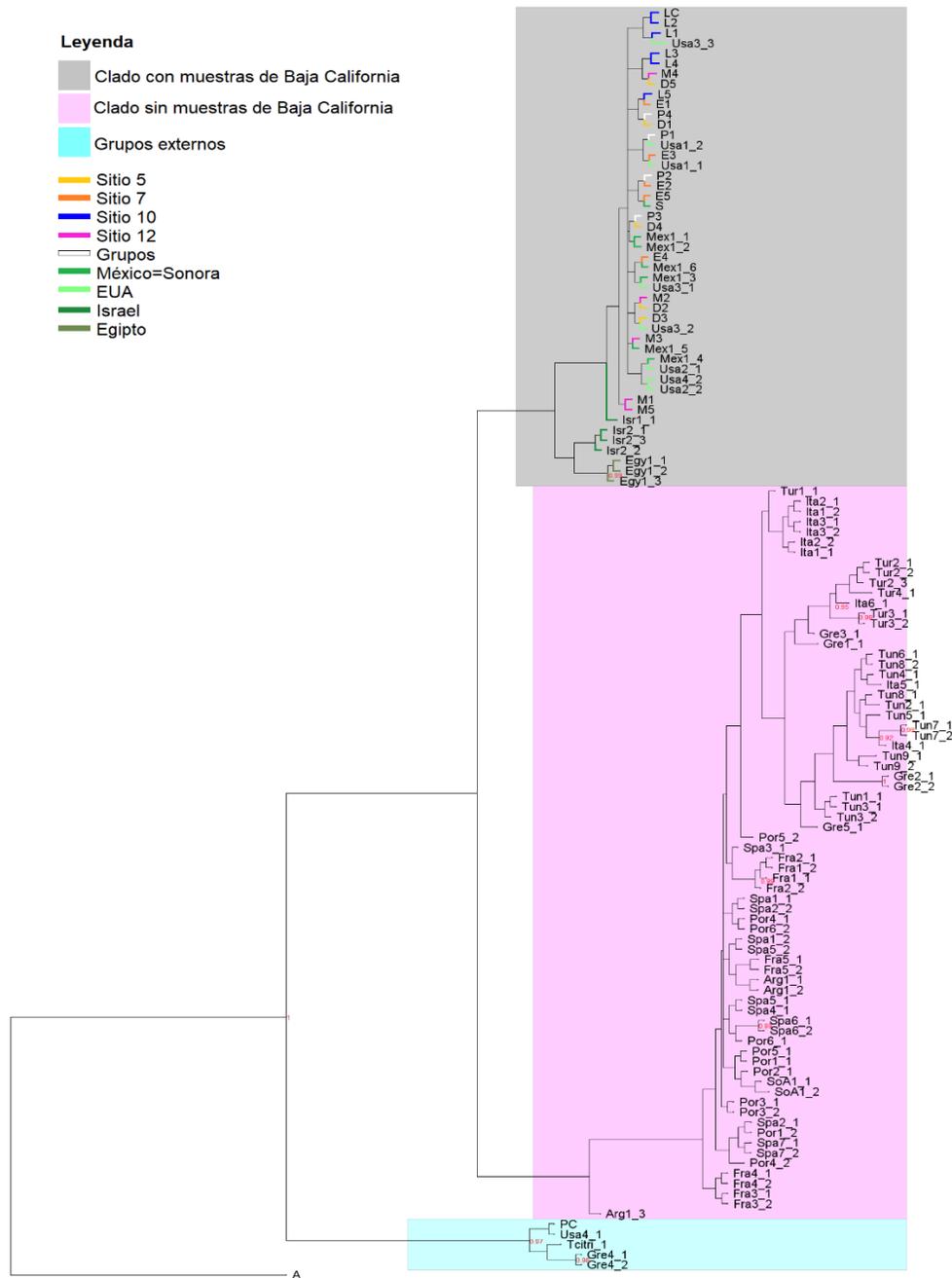


Figura 18. Árboles Bayesianos consenso de *co1* para poblaciones de PHV: *Planococcus ficus* (y grupos externos *Pl. citri*, *Ps. longispinus* y *Ps. viburni*) de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p > 0.9$) en los nodos. Las poblaciones de insectos se colectaron en Baja California y Sonora, México y se agruparon por ciudad más cercana y aislado analizado. Barra de escala, 0.003 sustituciones nucleotídicas por sitio en ambos árboles.

La Figura 19, muestra el árbol concatenado, que sustenta una mayor cercanía de las muestras de Baja California (tanto en individual como en pool), con muestras de EUA, Sonora, Egipto e Israel.

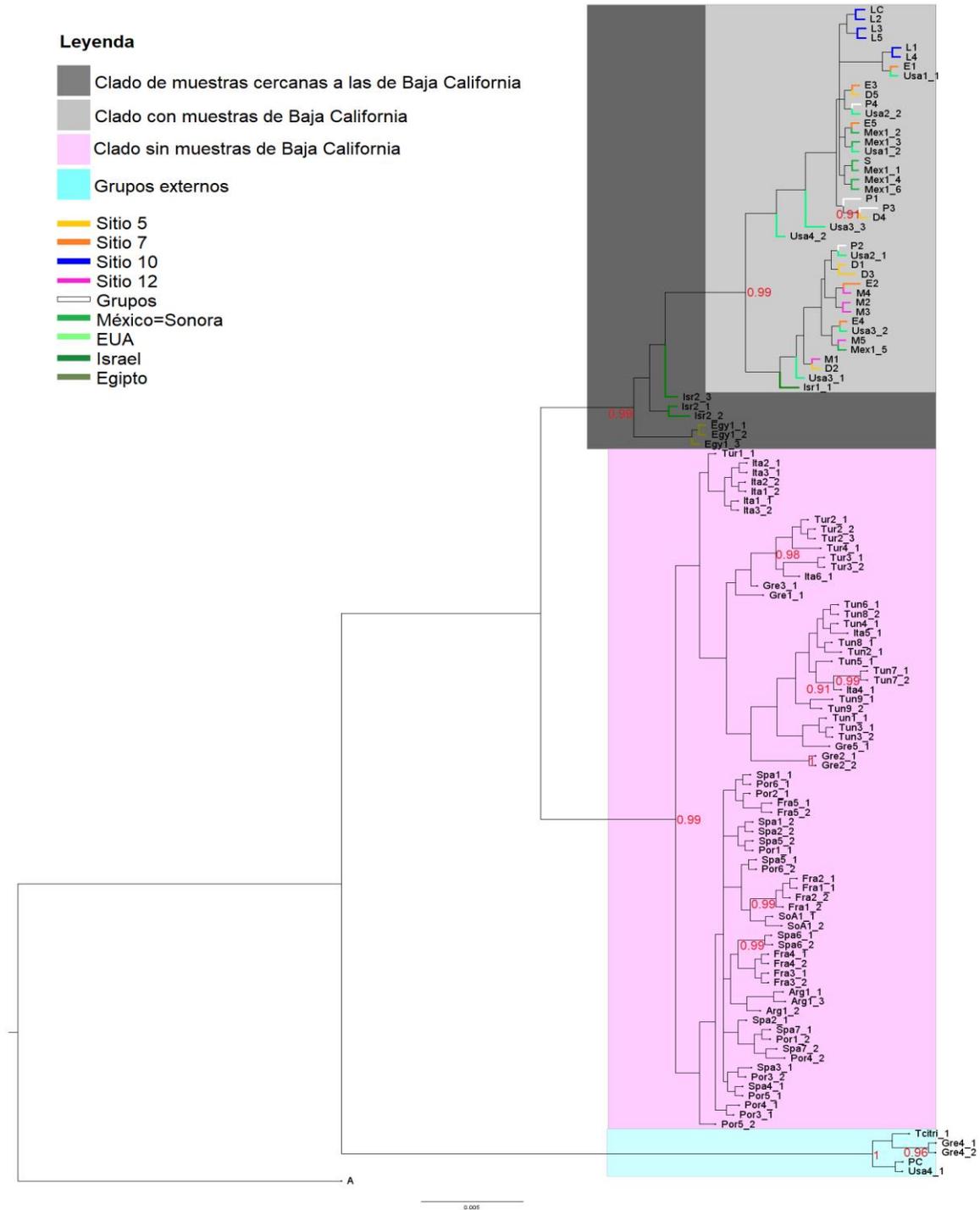


Figura 19. Árbol Bayesiano consenso para poblaciones de PHV de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p > 0.9$) en los nodos. Se utilizó el conjunto de datos *its1* y de *co1*; las poblaciones de insectos se colectaron en Baja California y Sonora, México y se agruparon por ciudad/país más cercana/o. Las ramas no mostradas en la leyenda representan secuencias de EUA, Israel, Túnez, Argentina, España, Francia, Sudáfrica, Portugal, Egipto, Italia, Turquía y Grecia. Barra de escala, 0.005 sustituciones nucleotídicas por sitio.

El árbol filogenético de GLRaV-3 mostró dos clados principales sin regiones geográficas específicas (Figura 20). Las muestras de Baja California se agruparon con muestras de Estados Unidos (específicamente California), Nueva Zelanda, Alemania y Sudáfrica.

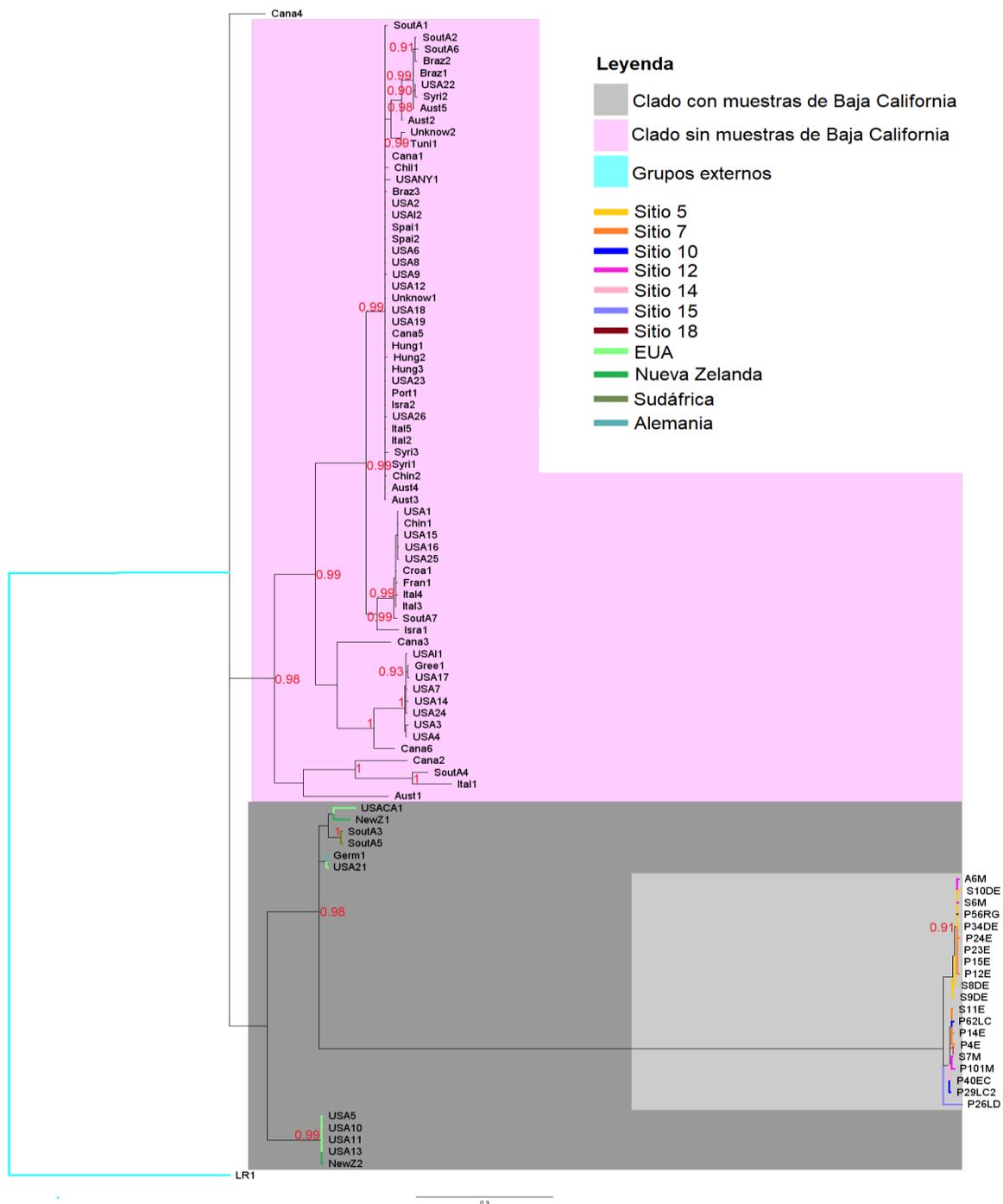


Figura 20. Árbol Bayesiano consenso de *hsp70h* de GLRaV-3 de Baja California con soportes de ramas mostrados como probabilidades posteriores ($p > 0.9$) en los nodos. Las muestras se agruparon por ciudad/país más cercana/o. Las ramas no mostradas en la leyenda representan secuencias de Australia, Austria, Brasil, Canadá, EUA, Chile, China, Croacia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Israel, Italia, Nueva Zelanda, Portugal, Sudáfrica, España, Túnez. Barra de escala, 0.3 sustituciones nucleotídicas por sitio.

3.3.3 Análisis de haplotipos

El gen *its1* consistió en ocho haplotipos en 497 pb para los cuatro sitios evaluados (Tabla 10). Se procesaron cinco muestras por sitio, para los sitios 5, 7, 10 y 12 del análisis de PHV (Figura 13). Se encontró un 2.84 de promedio de divergencias de nucleótidos en el sitio 5 (más divergente) y el número promedio de divergencias de nucleótidos por pares fue de 3.9 pb en todos haplotipos. La red *its1* Neighbor-Joining (Figura 21) muestra que los haplotipos 1-8, están presentes en los sitios de la localidad Francisco Zarco (sitios 5, 7 y 12) y en el sitio 10 de la localidad de San Vicente únicamente se encontró el haplotipo 6. Los haplotipos más divergentes fueron el 5 y 6 separado por cuatro y cinco mutaciones del resto, respectivamente.

Tabla 10. Variación de secuencias de *its1* (497 pb) de las muestras de PHV en Baja California. Para cada fila y columna, se muestra el número promedio de diferencias por pares, dentro (elemento diagonal) y entre los cuatro sitios (debajo de la diagonal).

<i>its1</i>	Sitio 12	Sitio 5	Sitio 7	Sitio 10
Sitio 12	0.35			
Sitio 5	2.16	2.84		
Sitio 7	4.68	4.6	2.31	
Sitio 10	5.8	4.6	1.6	0

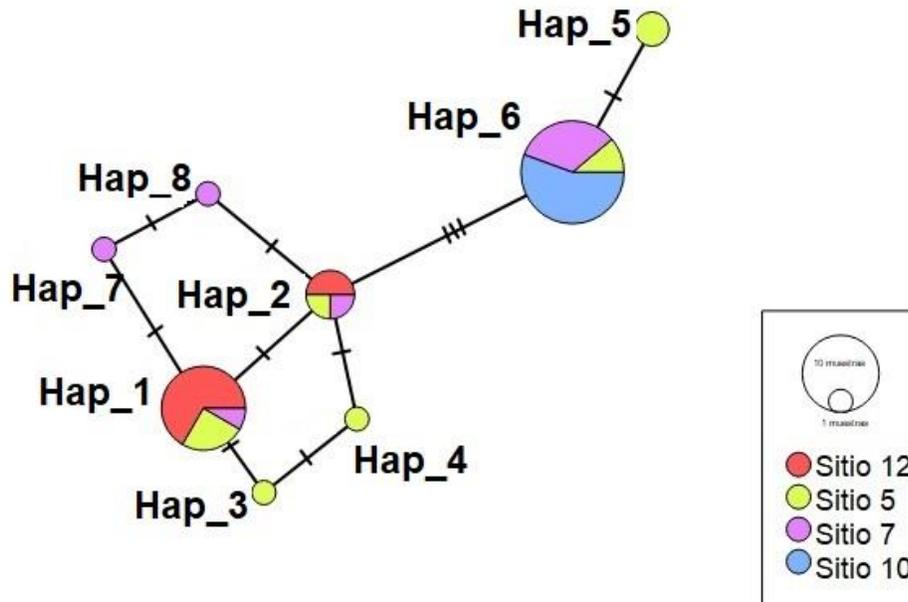


Figura 21. Red Neighbor-joining de haplotipos para la región *its1* de poblaciones de PHV recolectadas en sitios de las localidades Francisco Zarco (sitios 5, 7 y 12) y San Vicente (sitio 10). Cada círculo representa un haplotipo diferente y los tamaños corresponden al número de muestras por sitios que comparten ese haplotipo. Los colores indican el sitio de muestreo. La barra transversal en las líneas de conexión representa una sustitución. Hap= haplotipo.

La distribución geográfica de los haplotipos *its1* (Figura 22) muestra que el sitio con mayor cantidad de haplotipos fue el sitio 5 (seis haplotipos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6), seguido por el sitio 7 (cinco haplotipos: 1, 2, 6, 7 y 8), después el sitio 12 (dos haplotipos: 1 y 2) y finalmente el sitio 10 que solo tuvo 1 haplotipo (haplotipo 6). De los ocho haplotipos, el 3, 4 y 5 fueron exclusivos del sitio 5; mientras que los haplotipos 7 y 8 fueron exclusivos del sitio 7.

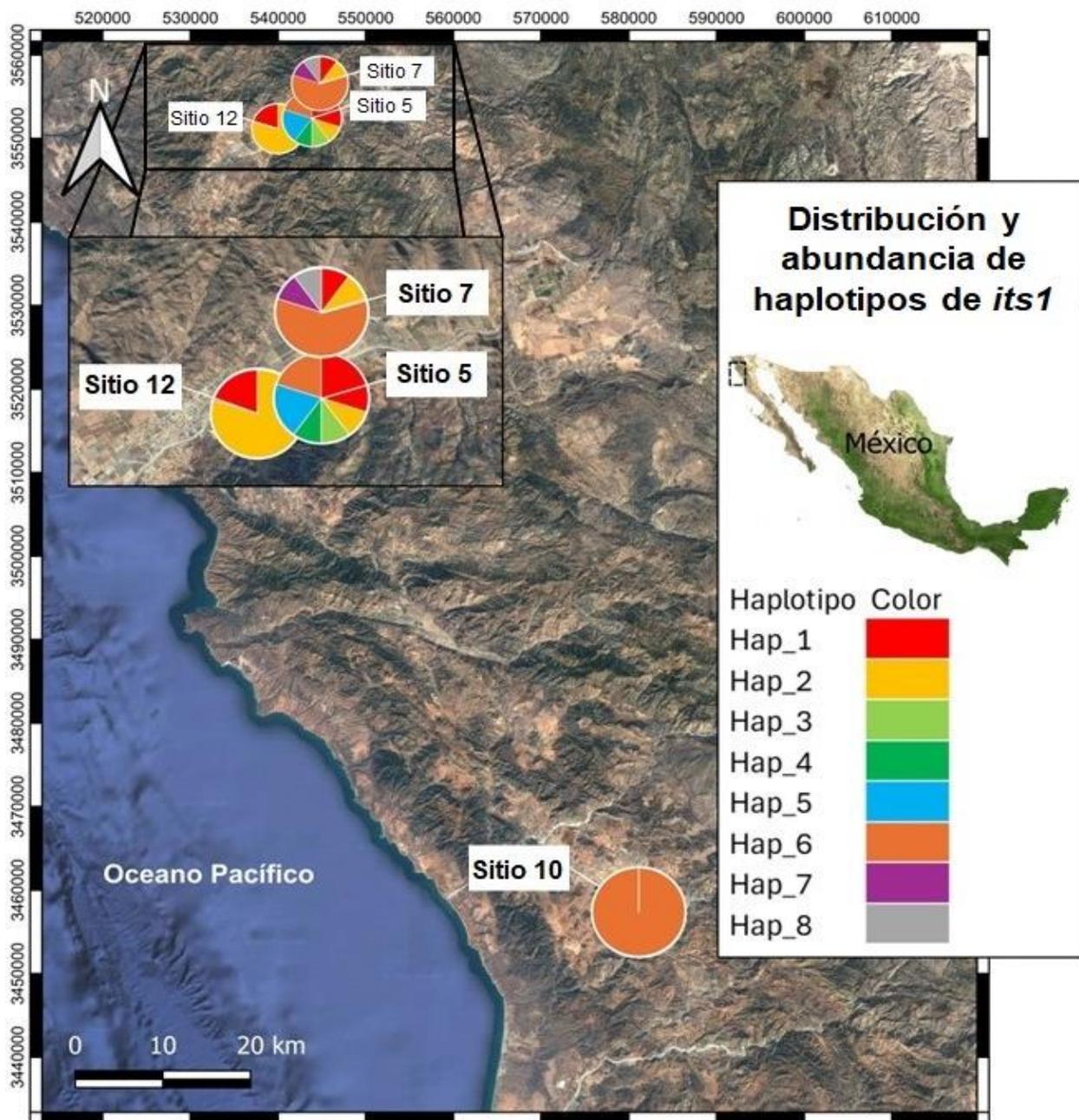


Figura 22. Distribución geográfica de los haplotipos *its1* de muestras de PHV colectadas en Baja California, México. Hap= haplotipo.

Para el virus GLRaV-3, analizado mediante el gen *hsp70h*, se seleccionaron muestras de los sitios 5 y 12 (cuatro muestras), sitio 7 (siete muestras) y sitio 10 (dos muestras). El marcador *hsp70h* tuvo mayor diversidad que *its1* para PHV, con catorce distintos haplotipos en los 546 pb de secuencia amplificada de plantas de vid de los cuatro sitios evaluados (Tabla 11). Las divergencias del sitio 12 (el más heterogéneo) fueron de 10.9 y número promedio de divergencias de nucleótidos por pares fue de 10.05 pb en todos los haplotipos. La red *hsp70h* Neighbor-Joining (Figura 23) muestra que los haplotipos 1-2 y 4-13, están presentes en los sitios de la localidad Francisco Zarco (sitios 5, 7 y 12) y los haplotipos 3 y 12, se encontraron en el sitio 10 de la localidad de San Vicente. Los haplotipos 1-2, 4-8, 10 y 13, se separan de los haplotipos 3, 9, 11-12 y 14 por 10 sustituciones de bases.

La distribución geográfica de los haplotipos *hsp70h* (Figura 24) muestra que el sitio con mayor cantidad de haplotipos fue el sitio 5 (seis haplotipos: 4, 5, 6, 7, 8 y 10), seguido por el sitio 12 (cinco haplotipos: 1, 2, 9, 10 y 11), después el sitio 7 (cuatro haplotipos: 3, 10, 13 y 14) y finalmente el sitio 10 que tuvo dos haplotipos (3 y 12). De los catorce haplotipos, los haplotipos 1, 2, 9 y 11 fueron exclusivos del sitio 12; los haplotipos 4, 5, 6, 7 y 8 del sitio 5, mientras que los haplotipos 13 y 14 fueron exclusivos del sitio 7; y el haplotipo 12 fue exclusivo del sitio 10.

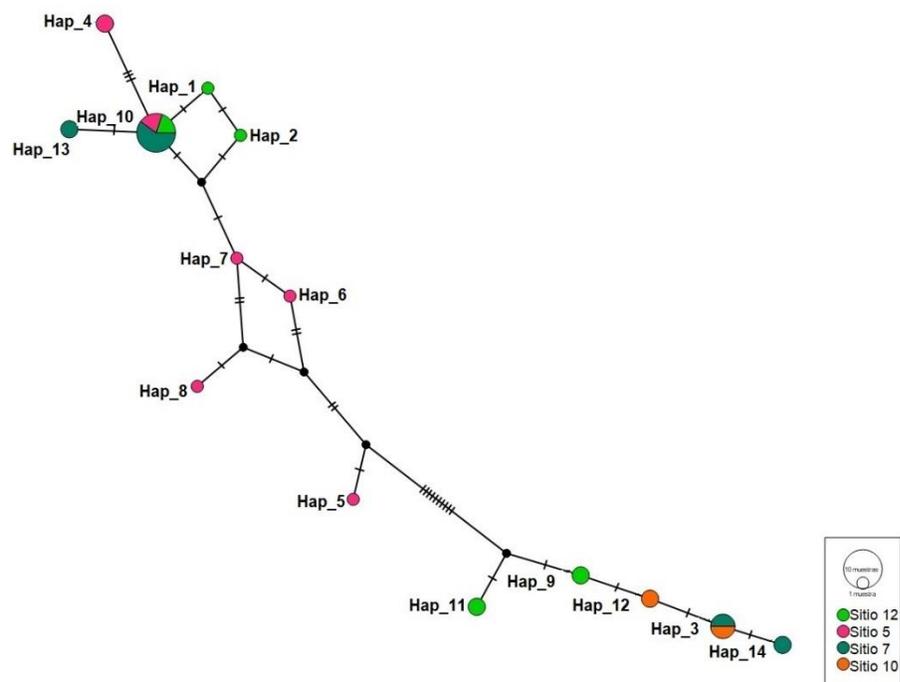


Figura 23. Red Neighbor-joining de haplotipos para la región *hsp70h* (GLRaV-3) de muestras de vid recolectadas en sitios de las localidades Francisco Zarco (sitios 5, 7 y 12) y San Vicente (sitio 10). Cada círculo representa un haplotipo diferente y los tamaños corresponden al número de muestras por sitios que comparten ese haplotipo. Los colores indican el sitio de muestreo. La barra transversal en las líneas de conexión representa una sustitución. Los puntos negros simbolizan haplotipos hipotéticos no muestreados en el conjunto de datos. Hap= haplotipo.

Tabla 11. Variación de secuencias de GLRaV-3 (546 pb de la región del gen *hsp70h*) en muestras de vid en Baja California. Para cada fila y columna, se muestra el número promedio de diferencias por pares, dentro (elemento diagonal) y entre los cuatro sitios (debajo de la diagonal).

<i>hsp70h</i>	Sitio 12	Sitio 5	Sitio 7	Sitio 10
Sitio 12	10.9			
Sitio 5	9.1	4.7		
Sitio 7	10.4	8.5	10.2	
Sitio 10	10.2	11	11.1	0.7

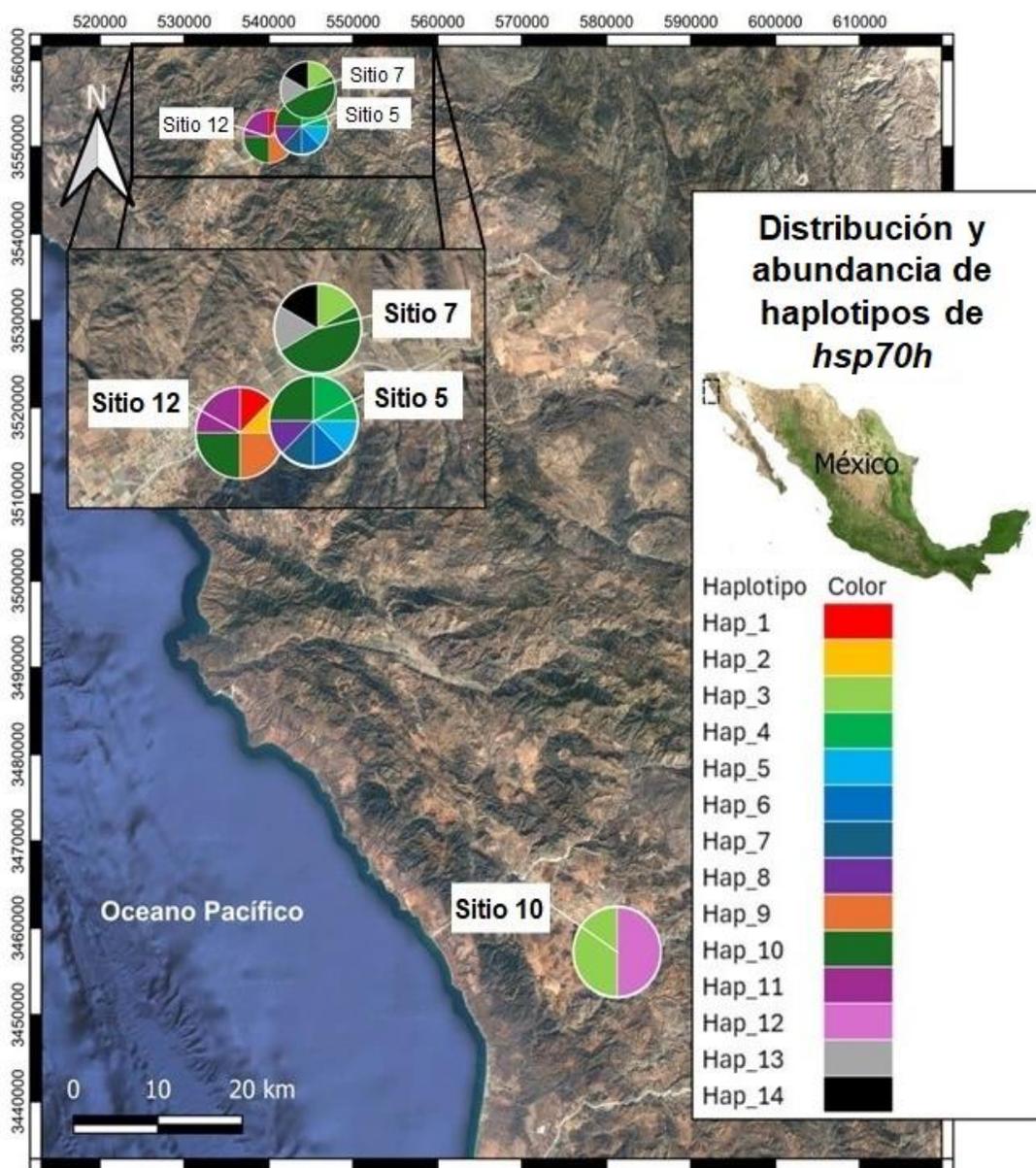


Figura 24. Distribución geográfica de los haplotipos *hsp70h* de GLRaV-3 de muestras de vid colectadas en Baja California, México. Hap= haplotipo.

3.4 Discusión

El estudio de la diversidad genética de los organismos y su distribución geográfica se utiliza para dilucidar el origen geográfico de las especies y su relación con poblaciones de otras regiones para la toma de decisiones de control. Para el estudio del origen de poblaciones invasoras de insectos plaga en la vid (cochinillas y escamas) se ha utilizado el gen *co1*, para distinguir entre poblaciones de *Coccidae* y *Pseudococcidae* (Cavaliere et al., 2008; Zhao et al., 2014). Asimismo, el concatenado de los genes *28S* y *co1*, sirvió para el estudio de la diversidad genética de *Coccidae*, mostrando patrones de distribución geográfica (Amouroux et al., 2017; Wang et al., 2015). Malausa et al. (2011), propusieron una serie de marcadores de ADN para distinguir entre especies crípticas de *Pseudococcidae*: dos regiones del gen *co1*, *28S-D2*, todo el locus del *its* y la región *rpS15-16s* de *Tremblaya princess*. Específicamente en *P. ficus* (PHV), se han utilizado el ADN genómico de *its1* y *co1*, para determinar el origen de poblaciones presentes en América del Norte (California y México), donde México estuvo representado por muestras del estado de Sonora (Daane et al., 2018).

En este estudio, los marcadores revelaron variaciones genéticas intraespecíficas, identificando un conjunto de taxones estrechamente relacionados y establecieron relaciones filogenéticas entre los taxones caracterizados. Las secuencias de *its1* y *co1* de PHV de Baja California formaron un clado exclusivo y se encontraron cercanas a las secuencias de América del Norte y Medio Oriente. Las poblaciones invasoras en América del Norte se alinearon con el grupo del Medio Oriente. Por lo que, los eventos de invasión de *P. ficus* en América del Norte probablemente se originaron del grupo del Medio Oriente, ya que un haplotipo de Israel está más estrechamente relacionado con los presentes en California y México (separados por una sola sustitución en la secuencia nucleotídica). Además, el haplotipo compartido por California y México sugiere que hubo un único evento de invasión en ambos sitios. Lo encontrado por este trabajo se suma a la información previa, ya que las muestras de Baja California procesadas tanto en grupos como de manera individual resultaron más cercanas a las muestras de Estados Unidos, Sonora (México), Israel y Egipto. Por su parte, los análisis de haplotipos de *its1* entre sitios muestreados en Baja California, mostraron una diversidad media de 2.84 pb, que es mayor a la reportada por Daane et al., (2018) de 1.8 pb. En los sitios de Francisco Zarco se encontraron 2 haplotipos compartidos entre los tres sitios, mientras que el sitio de San Vicente tuvo solo 1 haplotipo. Este hallazgo en San Vicente puede explicarse por una colonización reciente de la región o por el asilamiento genético del sitio respecto a los sitios de Francisco Zarco; también se debe considerar el tamaño reducido de muestras procesadas en estos análisis.

Al analizar nuestros resultados con la literatura, la ruta tentativa del PHV fue: 1) Israel (primer reporte en 1924: Bodenheimer (1924)), 2) Coachella Valley en California (1994: Gill (1994)) y 3) la Costa de Hermosillo Sonora (Fu-Castillo, 2005). La llegada a Baja California pudo ser de California o Hermosillo, sin embargo, se requieren estudios más detallados para diferenciar entre poblaciones. Lo anterior sugiere que la introducción de material infectado de California a México fue la fuente probable de los eventos de invasión. Estas conjeturas se obtienen a partir del análisis concatenado de las secuencias de *co1* e *its1*, ya que, al analizar las secuencias por separado, se observaron algunas discordancias en el agrupamiento de los grupos externos, probablemente por el pequeño tamaño de las secuencias o el manejo de los datos.

Los principales genes utilizados para evaluar la diversidad genética en las especies de GLRaVs son los que codifican para la *hsp70h*, proteína de la cápside (*cp*) y el duplicado 2 de la proteína de la cápside (*cpPd2*). En un estudio realizado por Elçia (2019), en Turquía, se realizó la secuenciación de los genes de *hsp70h*, el marco de lectura abierto 9 (*p24*), genes *cp* y *cpd2*, para conocer la variabilidad genómica de GLRaV-1 a GLRaV-9. La región genómica *cpd2* mostró mayor divergencia, mientras que *hsp70h* exhibió la menor divergencia genética. Sin embargo, los aislados no se correlacionaron con su región geográfica. El mismo comportamiento de falta de correlación entre origen geográfico y filogenia de aislados se ha observado en estudios en Estados Unidos, con muestras de California, New York y Washington, con las regiones genómicas mencionadas (Alabi et al., 2011) y en aislados de Portugal con *cp* (Esteves et al., 2013). Adicionalmente, en aislados de Toscani (Italia), con la región *cp* tanto con GLRaV-1 como GLRaV-3, no se observó correlación entre la distribución y el origen geográfico (Sabella et al., 2018).

En los análisis filogeográficos de aislados procedentes de New York, no se encontró relación entre la variabilidad genética de los virus GLRaV-1,-2 y -3, y el origen geográfico o genotipo de la planta (Fuchs et al., 2009). Además, al analizar la diversidad genética de la región de 4.7-kb en 3' terminal de GLRaV-3, no se observó ninguna estructura geográfica entre los aislados de Napa Valley, CA, encontrándose aislados pertenecientes a diferentes clados filogenéticos en distintos viñedos (Wang et al., 2011). Lo anterior sugiere que el transporte y uso de material vegetal infectado, y el cambio rápido del genoma viral ha sido importante en la diseminación de GLRaV-3. Alineaciones de nucleótidos del gen *hsp70h* en GLRaV-2 y GLRaV-3, mostraron que los aislados de GLRaV-2 de British Columbia se agruparon en un linaje, indicando una única variante de GLRaV-2; mientras que los aislados de GLRaV-3 se agruparon en varios linajes (Poojari et al., 2017). También con *hsp70h* se encontró heterogeneidad filogenética en aislados de GLRaV-3 de vides mediterráneas (Hancevic et al., 2021). En nuestro caso, se encontraron dos clados preponderantes y las muestras de Baja California se encontraron estrechamente relacionadas con

secuencias de Estados Unidos, Nueva Zelanda, Alemania y Sudáfrica. Los análisis de haplotipos de hsp70h entre sitios muestreados en Baja California, mostraron una diversidad media de 10.05 pb. En los sitios de Francisco Zarco se encontró un haplotipo compartido entre los tres sitios, mientras que el sitio de San Vicente tuvo solo 1 haplotipo exclusivo. Sin embargo, para encontrar más diferenciación a nivel regional, se sugiere la utilización de más marcadores y de preferencia la secuenciación del genoma completo.

3.5 Conclusión

Se llevaron a cabo análisis filogenéticos de PHV y GLRaV-3 integrando información geográfica. Las poblaciones invasoras de PHV de Baja California se alinearon con las muestras de Estados Unidos, Sonora y cercanamente con una muestra de Israel. Aunado a registros históricos, se sugiere que Israel es el origen de las poblaciones de PHV de Norteamérica. Para realizar un análisis de la diversidad genética, sería de ayuda realizar la búsqueda de marcadores específicos de la especie y de otras regiones genómicas, para hacer otro tipo de análisis filogenético. Para combatir a la plaga en las zonas presentes, es necesario realizar una mirada retrospectiva para analizar lo que se ha hecho en otras regiones del mundo, haciendo uso de, por ejemplo, manejo integrado de plagas y aplicación de la agroecología.

Respecto a los aislados de GLRaV-3 bajacalifornianos, los estudiados en este trabajo se relacionaron con variantes de Estados Unidos, Nueva Zelanda, Alemania y Sudáfrica. Esto proporciona información relevante para mejorar los diagnósticos y la vigilancia epidemiológica. Por último, se recomienda la secuenciación del genoma completo del virus tomando en cuenta más muestras y sitios para determinar la diversidad genética de manera más robusta.

Capítulo 4. Discusión y conclusiones generales

4.1 Discusión general y trabajo futuro

Este trabajo abordó el estudio de GLD y GRBD, así como de sus virus asociados y el vector de algunos GLRaVs, desde un aspecto epidemiológico y de filogeografía. El estudio epidemiológico se basó en el análisis por síntomas asociados a ambas enfermedades, mostrando ser muy efectivo (91% de sensibilidad). El análisis de prevalencia reveló que el 92% de los sitios visitados presentó plantas con síntomas de GLD y/o GRBD, con un promedio general de 20% de plantas sintomáticas por sitio; mientras que el PHV se identificó en 74 de los 121 sitios. La prevalencia mostró diferencias significativas entre localidades, siendo más afectadas Francisco Zarco, El Sauzal y Ejido Sánchez Taboada, aunque no se observaron variaciones asociadas al cultivar de vid. Por otro lado, se registró una baja ocurrencia de plantas sintomáticas en zonas como Real del Castillo, Ojos Negros, Tecate y Valle de las Palmas, caracterizadas por poca o nula presencia de PHV y por una ubicación lejos de zonas con alta densidad de viñedos. Además, los datos reflejan que la incidencia de síntomas de GLD y/o GRBD ha incrementado entre 2021 y 2023, influenciada por el sitio y el cultivar.

En este estudio, el diagnóstico visual basado en la sintomatología incluyó tanto a GLD como a GRBD indistintamente, ya que ambas enfermedades comparten síntomas, particularmente el enrojecimiento de las hojas. El seguimiento visual de los síntomas puede ser una herramienta valiosa para reducir costos, pero esta técnica debe utilizarse sólo como primer método de detección debido a su baja especificidad. La vigilancia epidemiológica como el caso de este estudio, destaca el monitoreo de síntomas como primer paso. Por este motivo, se puso a disposición de productores e interesados, el “Catálogo fotográfico de síntomas foliares asociados a GLRaVs y GRBV en vid”, que proporcionan ejemplos de imágenes de hojas sintomáticas y el diagnóstico molecular de las mismas (Anexo P, Figura 30). Si bien hemos encontrado que el diagnóstico por síntomas es efectivo como método preliminar, se sugiere: (1) Tener en cuenta que pueden no presentarse síntomas en algunos cultivares y estar infectados; si se presentan síntomas, se deberá corroborar la infección por diagnóstico molecular; y si no hay síntomas, pero se sospecha de la presencia de GLRaVs y/o GRBV, se sugiere monitorear las plantas a través del tiempo. (2) Agudizar la atención a la introducción de material vegetativo certificado y que, al confirmar la presencia de virus, lo ideal es la eliminación de plantas infectadas. (3) No descuidar el monitoreo constante de vectores y hormigas; en el caso de los GLRaVs, al PHV, y por parte de GRBV, al periquito tricornudo de la alfalfa.

Una vez reconocidas las regiones de atención prioritarias, se sugiere aplicar medidas de contención y protección contra enfermedades virales. Para ello, podemos tomar como ejemplo las medias de control aplicadas en otras regiones del mundo. En Sudáfrica se implementa el suministro de material de plantación saludable, sometiendo todos los cultivares o clones de vid a terapia de calor y propagación *in vitro* de la punta de meristemos, llevando a cabo vigilancia epidemiológica por diagnóstico de virus en viñedos cada cinco años; también se implementa la inspección visual de síntomas anualmente. Por su parte, Nueva Zelanda intenta priorizar la investigación sobre GLRaV-3 y la divulgación de la información, ahí propusieron identificar visualmente y mapear la presencia del GLRaV-3 en las vides de dos regiones, la eliminación de vides infectadas, prácticas de higiene, manejo de vectores y el reemplazo eventual de las vides. Por último, en California, Estados Unidos, para controlar la propagación de GLD, los productores de uva identifican las vides sintomáticas, documentan los cambios anuales en la incidencia de la enfermedad en los bloques de viñedos y eliminan las vides enfermas. Adicionalmente para el control de PHV, los productores dependen de una combinación de tácticas que incluyen insecticidas, interrupción del apareamiento, control biológico y manejo de algunas especies de hormigas para minimizar las poblaciones (Almeida et al., 2013).

La filogeografía nos permitió predecir el origen del PHV en Baja California. Esta información, puede ayudar a prevenir su movimiento a otras regiones vitivinícolas, donde actualmente no se encuentra, o ayudar en la búsqueda de enemigos naturales que evolucionaron con la plaga invasora, que serían los más adecuados para el control biológico (Daane et al., 2018). En Baja California, es recomendable aplicar tratamientos dirigidos, por ejemplo, control biológico, utilizados previamente en regiones con presencia de PHV. Al respecto, encontramos que las poblaciones invasoras de PHV en Baja California mostraron afinidad genética con muestras provenientes de Estados Unidos, Sonora y, de manera cercana, con una muestra de Israel. Asimismo, uno de los ejemplos de enemigo natural más importante para el PHV es la avispa parasitoide *Anagyrus pseudococci*, utilizada en viñedos de California infestados por el PHV, por lo que se plantea como una alternativa al uso de pesticidas (Daane et al., 2008).

Respecto a los aislados de GLRaV-3, es conocido que los virus de ARN tienen una alta tasa de mutación y, como consecuencia, una amplia diversidad genética. En el caso de GLRaV-3, la diversidad genética global no se comprende por completo, principalmente debido a la falta de datos geográficos de secuencias reportadas. Para abordar esta brecha de información, se sugiere caracterizar variantes genéticamente diversas de GLRaV-3 para expandir las bases de datos de secuencias (Diaz-Lara et al., 2018). La principal utilidad de esta información es la identificación de variantes (de preferencia por región geográfica) para evitar su introducción y propagación a otras zonas; asimismo, hacer pública la información obtenida en

bases de datos internacionales. Aunque la principal herramienta es la prevención, y los estudios centrados en la erradicación de virus son pocos, una vez identificados los virus presentes en una región, la inducción de embriogénesis somática directa y recurrente a partir de cultivo de los filamentos de estambres, es un método efectivo para la eliminación de GLRaV-3, GVA y GRSPaV (Bouamama-Gzara et al., 2017).

Por último, se recomienda continuar con evaluaciones espaciotemporales de GLD y/o GRBD, monitoreo de vectores y colaboración con el sector productivo. La adopción temprana de medidas para mitigar la propagación es esencial para evitar desafíos mayores, utilizando estos hallazgos como base para la planificación estratégica en el sector vitícola.

4.2 Conclusión general

Este estudio abordó la comprensión de las enfermedades del enrollamiento de la hoja de la vid (GLD) y la mancha roja de la vid (GRBD), los virus asociados (GLRaVs y GRBV) y el papel del piojo harinoso de la vid (PHV, *Planococcus ficus*) en Baja California, logrando evaluar la prevalencia e incidencia de GLD y GRBD, además de explorar la filogeografía del GLRaV-3 y su vector (el PHV) en los principales valles vitícolas de la región. Se confirmó la efectividad del diagnóstico basado en síntomas como herramienta preliminar para detectar GLD y GRBD en Baja California, donde se encontraron plantas sintomáticas en el 92% de los 121 sitios monitoreados, asociadas con la presencia de PHV. Además, se encontró un aumento en la incidencia de estas enfermedades a lo largo del tiempo.

La amplia distribución de GLD y GRBD subraya la urgencia de implementar estrategias de manejo regional priorizando áreas vulnerables. Los resultados filogenéticos sugieren que las poblaciones de PHV en Baja California tienen origen en Israel, lo que ofrece un marco para diseñar medidas de control basadas en experiencias internacionales, como el manejo integrado de plagas y la agroecología.

Literatura citada

- Achala, K., Deshields, J. B., Levin, A. D., Hilton, R., & Rijal, J. (2022). Epidemiology of Grapevine Red Blotch Disease Progression in Southern Oregon Vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, *73*(2), 116–124. <https://doi.org/10.5344/ajev.2022.21031>
- Adiputra, J., Kesoju, S. R., & Rayapati, N. A. (2018). The Relative Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 3 and Grapevine red blotch virus in Washington State Vineyards. *Plant Disease*, *102*(11), 2129–2135. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1962-RE>
- AGRICULTURA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural), & SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2024). Panorama Agroalimentario: La ruta de la Transformación Agroalimentaria 2018-2024 [Informe técnico Panorama Agroalimentario Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural].
- Agriculture Victoria. (2022, September). Grapevine Red Blotch Detections. Victoria State Government, September, 2022. Consultado el día 06 de febrero de 2025. <https://agriculture.vic.gov.au/biosecurity/moving-plants-and-plant-products/biosecurity-updates/grapevine-red-blotch-virus-detections>.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Daubert, S., Koonin, E. V., & Rowhani, A. (2012). Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Research*, *163*(1), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.018>
- Alabi, O. J., Casassa, L. F., Gutha, L. R., Larsen, R. C., Henick-Kling, T., Harbertson, J. F., & Naidu, R. A. (2016). Impacts of grapevine leafroll disease on fruit yield and grape and wine chemistry in a wine grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *PLoS ONE*, *11*(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149666>
- Alabi, O. J., Rwahnih, M. Al, Karthikeyan, G., Poojari, S., Fuchs, M., Rowhani, A., & Naidu, R. A. (2011). Grapevine leafroll-associated virus 1 occurs as genetically diverse populations. *Phytopathology*, *101*(12), 1446–1456. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-11-0114>
- Almeida, R. P. P., Daane, K. M., Bell, V. A., Blaisdell, G. K., Cooper, M. L., Herrbach, E., & Pietersen, G. (2013). Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*, *4*(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094>
- Amouroux, P., Crochard, D., Germain, J. F., Correa, M., Ampuero, J., Groussier, G., Kreiter, P., Malausa, T., & Zaviezo, T. (2017). Genetic diversity of armored scales (Hemiptera: Diaspididae) and soft scales (Hemiptera: Coccidae) in Chile. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01997-6>
- Aou-Ouad, H. El, Montero, R., Baraza, E., & Bota, J. (2022). Recovering Ancient Grapevine Cultivars in the Balearic Islands: Sanitary Status Evaluation and Virus Elimination. *Plants*, *11*(13), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants11131754>
- 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*(MAR2016), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>

- Arnold, K., Golino, D. A., & McRoberts, N. (2017). A synoptic analysis of the temporal and spatial aspects of grapevine leafroll disease in a historic napa vineyard and experimental vine blocks. *Phytopathology*, *107*(4), 418–426. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0235-R>
- Atallah, S. S., Gómez, M. I., Fuchs, M. F., & Martinson, T. E. (2012). Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. *American Society for Enology and Viticulture*, *1*, 73–79. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11055>
- Bandelt, H.J., Forster, P., & Rhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Barrass, I. C., Jerie, P., & Ward, S. A. (1994). Aerial dispersal of first- and second-instar longtailed mealybug, *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti) (Pseudococcidae: Hemiptera). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *34*(8), 1205–1208. <https://doi.org/10.1071/EA9941205>
- Bazelet, C. (2018). Pest fact sheet: Grapevine mealybug *Planococcus ficus*. IPM. <https://www.sun.ac.za/english/faculty/agri/conservation-ecology/ipm/Documents/Planococcus%20ficus%20ENG.pdf>
- Becerra, V., Gonzales, M., Herrera, M., & Miano, J. (2006). Dinámica poblacional de *Planococcus ficus*. *Revista FCA UNCuyo*, *38*(1), 1–6. Archivo PDF.
- Bekris, F., Vasileiadis, S., Papadopoulou, E., Samaras, A., Testempasis, S., Gkizi, D., Tavlaki, G., Tzima, A., Paplomatas, E., Markakis, E., Karaoglanidis, G., Papadopoulou, K. K., & Karpouzias, D. G. (2021). Grapevine wood microbiome analysis identifies key fungal pathogens and potential interactions with the bacterial community implicated in grapevine trunk disease appearance. *Environmental Microbiome*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00390-1>
- Bell, V. A., Blouin, A. G., Cohen, D., Hedderley, D. I., Oosthuizen, T., Spreeth, N., Lester, P. J., & Pietersen, G. (2017). Visual symptom identification of grapevine leafroll-associated virus 3 in red berry cultivars supports virus management by roguing. *Journal of Plant Pathology*, *99*(2), 477–482. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3877>
- Beltrán-Beache, M., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Landeros-Flores, J., Castro-del Angel, 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*, 1–10. <https://www.revista.cba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/3672>
- Bertazzon, N., Migliaro, D., Rossa, A., Filippin, L., Casarin, S., Giust, M., Brancadoro, L., Crespan, M., & Angelini, E. (2021). Grapevine red blotch virus is sporadically present in a germplasm collection in Northern Italy. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *128*(4), 1115–1119. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00468-5>
- Blanco-Ulate, B., Hopfer, H., Figueroa-Balderas, R., Ye, Z., Rivero, R. M., Albacete, A., Pérez-Alfocea, F., Koyama, R., Anderson, M. M., Smith, R. J., Ebeler, S. E., & Cantu, D. (2017). Red blotch disease alters grape berry development and metabolism by interfering with the transcriptional and hormonal regulation of ripening. *Journal of Experimental Botany*, *68*(5), 1225–1238. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw506>
- Bodenheimer, F. (1924). The Coccidae of Palestine. First report on this family. *Agricultural Experiment*

Station Bulletin, 1, Zionist Organization Institute of Agriculture and Natural History. Archivo PDF.

- Bouamama-Gzara, B., Selmi, I., Chebil, S., Melki, I., Mliki, A., Ghorbel, A., Carra, A., Carimi, F., & Mahfoudhi, N. (2017). Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian Cultivar by somatic embryogenesis and characterization of the somaclones using ampelographic descriptors. *Plant Pathology Journal*, *33*(6), 561–571. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0122>
- Bowen, P., Bogdanoff, C., Poojari, S., Usher, K., Lowery, T., & Úrbez-Torres, J. R. (2020). Effects of Grapevine Red Blotch Disease on Cabernet franc Vine Physiology, Bud Hardiness, and Fruit and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, *71*(4), 308 LP – 318. <https://doi.org/10.5344/ajev.2020.20011>
- Cabaleiro, C., Pesqueira, A. M., & Segura, A. (2022). Planococcus ficus and the spread of grapevine leafroll disease in vineyards: a 30-year-long case study in north-West Spain. *European Journal of Plant Pathology*, *163*(3), 733–747. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02513-x>
- Cavaliere, V., Mazzeo, G., Tropea, G., Buonocore, E., & Russo, A. (2008). Identification of Planococcus ficus and Planococcus citri (Hemiptera: Pseudococcidae) by PCR-RFLP of COI gene (Hemiptera : Pseudococcidae) by PCR-RFLP of COI gene. *Zootaxa*, *68*(May), 65–68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1816.1.6>
- CESVBC (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California). (2018). Programa de trabajo de la campaña contro piojo harinoso de la vid, a operar con recursos del programa de sanidad e inocuidad agroalimentaria. Informe técnico 2018, componente de sanidad federalizado, subcomponente de sanidad vegetal, en el estado Baja California, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California.
- CESVBC (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California), SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural), SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad), & SEDAGRO (Secretaría de Desarrollo Agropecuario). (2019). Programa de trabajo específico de la campaña contra plagas de la vid a operar con recursos del programa de sanidad e inocuidad agroalimentaria 2019. [Informe técnico 2019, componente de campañas fitozoosanitarias, en el estado de Baja California, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California].
- Chooi, K. M., Bell, V. A., Blouin, A. G., Cohen, D., Mundy, D., Henshall, W., & MacDiarmid, R. M. (2022). Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 Genotype Influences Foliar Symptom Development in New Zealand Vineyards. *Viruses*, *Vol. 14*, Issue 7. <https://doi.org/10.3390/v14071348>
- Cieniewicz, E., & Fuchs, M. (2014). Grapevine Red Blotch Disease. New York State Integrated Pest Management Program, 2. www.nysipm.cornell.edu/factsheets/grapes/diseases/gv_red_blotch.pdf
- 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., Perry, K., & Fuchs, M. (2017). Grapevine Red Blotch: Molecular Biology of the Virus and Management of the Disease. En B Meng, G. Martelli, & M. Fuchs (Eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_14
- Cieniewicz, E., Pethybridge, S., Gorny, A., Madden, L., McLane, H., Perry, K., & 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., Thompson, J., McLane, H., Perry, K., Dangl, G., Corbett, Q., Martinson, T., Wise, A., Wallis, A., O'Connell, J., Dunst, R., Cox, K., & Fuchs, M. (2018). Prevalence and genetic diversity of grabloviruses in free-living vitis spp. *Plant Disease*, 102(11), 2308–2316. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-18-0496-re>
- Cocco, A., Pacheco da Silva, V. C., Benelli, G., Botton, M., Lucchi, A., & Lentini, A. (2020). Sustainable management of the vine mealybug in organic vineyards. *Journal of Pest Science (Vol. 94, Issue 2)*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01305-8>
- Cola, G., Failla, O., Maghradze, D., Megrelidze, L., & Mariani, L. (2017). Grapevine phenology and climate change in Georgia. *International Journal of Biometeorology*, 61(4), 761–773. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1241-9>
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2023). Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero San Vicente (0214). Estado de Baja California Informe Técnico, Issue 0214, Comisión Nacional del Agua.
- Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (2000). Dynamic of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 131–135. Archivo PDF.
- Cooper, M. L., Daugherty, M. P., Jeske, D. R., Almeida, R. P. P., & Daane, K. M. (2018). Incidence of grapevine leafroll disease: Effects of grape mealybug (*pseudococcus maritimus*) abundance and pathogen supply. *Journal of Economic Entomology*, 111(4), 1542–1550. <https://doi.org/10.1093/jee/toy124>
- Cui, Z. H., Bi, W. L., Hao, X. Y., Li, P. M., Duan, Y., Walker, M. A., Xu, Y., & Wang, Q. C. (2017). Drought stress enhances up-regulation of anthocyanin biosynthesis in Grapevine leafroll-associated virus 3-infected in vitro grapevine (*Vitis Vinifera*) leaves. *Plant Disease*, 101(9), 1606–1615. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0104-RE>
- Daane, K., Almeida, R., Bell, V., Walker, J., Botton, M., Fallahzadeh, M., Mani, M., Miano, J. L., Sforza, R., & Walton, Vaughn, Zaviezo, T. (2012). Biology and Management of Mealybugs in Vineyards. En *Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches, And Future Directions* (pp. 309–338). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7>
- Daane, K. M., Triapitsyn, S. V., Walton, V. M., Glenn, Y. Y., Haviland, D. R., Bentley, W. J., Godfrey, K. E., & Wunderlich, L. R. (2008). Vineyard managers and researchers seek sustainable solutions for mealybugs, a changing pest complex. *California Agriculture*, 62(4), 167–176. [DOI:10.3733/ca.v062n04p167](https://doi.org/10.3733/ca.v062n04p167)
- Daane, K., Middleton, M. C., Sforza, R. F. H., Kamps-Hughes, N., Watson, G. W., Almeida, R. P. P., Correa, M. C. G., Downie, D. A., & Walton, V. M. (2018). Determining the geographic origin of invasive populations of the mealybug *Planococcus ficus* based on molecular genetic analysis. *PLoS ONE*, 13(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193852>
- Dalton, D. T., Hilton, R. J., Kaiser, C., Daane, K. M., Sudarshana, M. R., Vo, J., Zalom, F. G., Buser, J. Z., & Walton, V. M. (2019). Spatial associations of vines infected with grapevine red blotch virus in oregon vineyards. *Plant Disease*, 103(7), 1507–1514. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1306-RE>

- Dalton, D., Walton, V., Daane, K., Kaiser, C., Hilton, R., & Brewer, L. (2014). Distribution and monitoring of grape mealybug: A key vector of grapevine leafroll disease in Oregon. Oregon State University Extension, 1–4. <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/47545/em9092.pdf>
- Diaz-Lara, A., Aguilar-Molina, V. H., Monjarás-Barrera, J. I., Vončina, D., Erickson, T. M., & Al Rwahnih, M. (2023). 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., Klaassen, V., Stevens, K., Sudarshana, M. R., Rowhani, A., Maree, H. J., Chooi, K. M., Blouin, A. G., Habili, N., Song, Y., Aram, K., Arnold, K., Cooper, M. L., Wunderlich, L., Battany, M. C., Bettiga, L. J., Smith, R. J., Bester, R., Xiao, H., ... Rwahnih, M. Al. (2018). Characterization of grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants and application towards RT-qPCR assay design. *PLoS ONE*, *13*(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208862>
- 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. (2023). High-Throughput Sequencing of Grapevine in Mexico Reveals a High Incidence of Viruses including a New Member of the Genus *Enamovirus*. *Viruses*, *15*(7). <https://doi.org/10.3390/v15071561>
- Donda, B. P., Kesoju, S. R., Arnold, K., McRoberts, N., & Naidu, R. A. (2023). Spatio-Temporal Spread of Grapevine Leafroll Disease in Washington State Vineyards. *Plant Disease*, *107*(5), 1471–1480. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0939-RE>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*(3), 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
- Elçia, E. (2019). Genomic variability and recombination analysis of grapevine leafroll-associated virus-1 isolates from Turkey. *Tarım Bilimleri Dergisi*, *25*(3), 319–327. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.402162>
- Esteves, F., Teixeira Santos, M., Eiras-Dias, J. E., & Fonseca, F. (2013). Molecular data mining to improve antibody-based detection of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). *Journal of Virological Methods*, *194*(1–2), 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.004>
- Flasco, M., Hoyle, V., Cieniewicz, & Fuchs, M. (2023). Transmission of Grapevine Red Blotch Virus: A Virologist's Perspective of the Literature and a Few Recommendations. *American Society for Enology and Viticulture*, *74*, 1–18. <https://10.5344/ajev.2023.23020>
- Flasco, M., Hoyle, V., Cieniewicz, E., Roy, B., McLane, H., Perry, K., 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>
- Flasco, M. T., Cieniewicz, E. J., Pethybridge, S. J., & Fuchs, M. F. (2023). Distinct Red Blotch Disease Epidemiological Dynamics in Two Nearby Vineyards. *Viruses*, *15*(5). <https://doi.org/10.3390/v15051184>
- Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, *14*(6), 635–649. <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>

- Fu-Castillo, A. (2005). Los Piojos Harinosos de la Vid. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro técn, 2005, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
- Fú-Castillo, A. A., Márquez-Cervantes, J. A., Grageda-Grageda, J., Osorio-Acosta, G., Miranda-Blanco, J. L., & Martínez-Díaz, G. (2002). Manejo integrado del piojo harinoso de la vid (p. 16). <https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Fu-Castillo-2002-IPM-vine-mealybug.pdf>
- Fuchs, M., Martinson, T. E., Loeb, G. M., & Hoch, H. C. (2009). Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyards in New York. *Plant Disease*, *93*(4), 395–401. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-4-0395>
- Fuchs, Marc. (2023). K1. Grapevine virology highlights: 2018-2023. *Proceedings of the 20th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, *4*(1), 18–26. <https://icvg.org/data/ICVG20Abstracts.pdf>.
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, *19*(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- García-Resendiz, K. G., & Carrillo-Tripp, J. (2022). Grapevine viruses in Mexico: studies and reports. *Agro Productividad*, 103–111. <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/2109>
- Gasparin-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. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1227-PDN>
- Geiger, C. A., & Daane, K. M. (2001). Seasonal movement and distribution of the grape mealybug (Homoptera: Pseudococcidae): Developing a sampling program for San Joaquin valley vineyards. *Journal of Economic Entomology*, *94*(1), 291–301. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.1.291>
- Gene Codes Corporation. (1991). Sequencher TM (Version 4.1.4).
- Gill, R. (1994). Vine mealybug. California Plant Pest and Disease Report. California Department of Food and Agriculture. Sacramento, California, USA.
- González-Andrade, S. (2015). Cadena de valor económico del vino de Baja California, México. *16*, 163–193. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-69612015000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. (Nucl. Acids. Symp. Ser.; pp. 41:95-98).
- Hancevic, K., Saldarelli, P., Carija, M., Cerni, S., Zdunic, G., Mucalo, A., & Radic, T. (2021). Predominance and Diversity of GLRaV-3 in Native Vines of Mediterranean Croatia. *Plants*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10010017>
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (2024). Master Species Lists. The Master Species List: A Spreadsheet of Current Taxonomy. Consultado el día 06 de febrero de 2025. <https://ictv.global/msl>

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2016). Conociendo Baja California. Reporte Técnico, Sexta Edición, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/producto_s/estudios/conociendo/702825217785.pdf
- Ito, T., & Nakaune, R. (2016). Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Archives of Virology*, *161*(9), 2555–2559. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2914-8>
- Jeger, M. J., Fereres, A., Malmstrom, C. E., Mauck, K. E., & Wintermantel, W. M. (2023). Epidemiology and Management of Plant Viruses Under a Changing Climate. *Phytopathology*, *113*(9), 1620–1621. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-23-0262-V>
- Ji, Y. J., Zhang, D. X., & He, L. J. (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, *3*(4), 581–585. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00519.x>
- Jones, T. J., Rayapati, N. A., & Nita, M. (2015). Occurrence of Grapevine leafroll associated virus-2, -3 and Grapevine fleck virus in Virginia, U.S.A., and factors affecting virus infected vines. *European Journal of Plant Pathology*, *142*(2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0605-z>
- Jooste, A. E. C., Molenaar, N., Maree, H. J., Bester, R., Morey, L., de Koker, W. C., & Burger, J. T. (2015). Identification and distribution of multiple virus infections in Grapevine leafroll diseased vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, *142*(2), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0620-0>
- Kishan, G., Kumar, R., Sharma, S. K., Srivastava, N., Gupta, N., Kumar, A., & Baranwal, V. K. (2024). Trouble-free detection of grapevine leafroll-associated virus-3 employing reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *131*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00791-z>
- Krenz, B, Thompson, J. R., McLane, H. L., & M Fuchs, K. L. P. (2014). Grapevine red blotch-associated virus Is Widespread in the United States. *Phytopathology*, *104*(11), 1232-40. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-14-0053-R>
- Krenz, Björn, Fuchs, M., & Thompson, J. R. (2023). Grapevine red blotch disease: A comprehensive Q&A guide. *PLOS Pathogens*, *19*(10), e1011671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011671>
- Lanfear, R., Frandsen, P., & Calcott, B. (2011). PartitionFinder2 (No. 2).
- Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., & Lemaire, O. (2012). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology*, *102*(7), 717–723. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-11-0289>
- Lim, S., D. Igori, F., & Zhao, J. S. Moon, I.-S. Cho, and G.-S. C. (2016). First Report of Grapevine red blotch-associated virus on Grapevine in Korea. *DISEASE NOTES*, *100*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0283-PDN>
- Liu, M. H., Li, M. J., Qi, H. H., Guo, R., Liu, X. M., Wang, Q., & Cheng, Y. Q. (2013). Occurrence of grapevine leafroll-associated viruses in China. *Plant Disease*, *97*(10), 1339–1345. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0048-RE>

- 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. <https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- Luna, F., Debat, H., Moyano, S., Zavallo, D., Asurmendi, S., & Gomez-Talquenca, S. (2019). First report of grapevine red blotch virus infecting grapevine in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, *101*(4), 1239. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00298-3>
- Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J., Ris, N., Prado, E., Botton, M., Vanlerberghe-Masutti, F., Sforza, R., Cruaud, C., Couloux, A., & Kreiter, P. (2011). DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*, *135*(1–2), 142–155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01495.x>
- Maree, H. J., Almeida, R. P. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., Fuchs, M. F., Golino, D. A., Jooste, A. E. C., Martelli, G. P., Naidu, R. A., Rowhani, A., Saldarelli, P., & Burger, J. T. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, *4*(APR), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082>
- Martelli, G. (2017). An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases They Cause. En *An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases*. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (Baozhong Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino, & M. Fuchs (eds.); pp. 31–46). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_2
- Martelli, G. P. (2014). Fleck complex. *Journal of Plant Pathology*, *96*(1 SUPPL.), 51–70. <https://doi.org/10.4454/jpp.v96i1sup.3143>
- Martínez-Lüscher, J., Plank, C. M., Brillante, L., Cooper, M. L., Smith, R. J., Al-Rwahnih, M., Yu, R., Oberholster, A., Girardello, R., & Kurtural, S. K. (2019). Grapevine Red Blotch Virus May Reduce Carbon Translocation Leading to Impaired Grape Berry Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(9), 2437–2448. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05555>
- Milkus, B. N., & Goodman, R. N. (1999). A Survey of Missouri Vineyards for the Presence of Five Grape Viruses. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*(1), 133 LP – 134. <https://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.1.133>
- Mostert, I., Bester, R., Burger, J. T., & Maree, H. J. (2023). Investigating Protein – Protein Interactions Between Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 and *Vitis vinifera*. *Pythopathology*, *113*(10). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-23-0107-R>
- Mullins, M., Bouquet, A., & Williams, L. (1998). The growing of grapes. In *Biology of grapevine* (pp. 4–12). En *Biology of the Grapevine*. https://books.google.com.mx/books?id=wnNvmRjfxgQC&dq=Biology+of+the+grapevine+1998+Mullins&source=gbs_navlinks_s
- Nimmo-Bell. (2006). The economic effects and financial impact of GLRaV-3. Reporte Nimmo-Bell 379 Publication, Report for New Zealand Winegrowers, Auckland, New Zealand. Archivo PDF.
- OEIDRUS, (Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable). (2011). Estudio sustentable sobre producción de uva en Baja California. Reporte 2011, Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable, Baja California. Archivo PDF.

- Ohmart, C. P., & Matthiasson, S. K. (2006). Manejo de Plagas. Reporte 1994, 34. Archivo PDF.
- OIV (International Organisation of Vine and Wine). (2016). Estadística por país. Ficha País. [Página Web, Consultado el 05 de febrero de 2025]. <http://www.oiv.int/es/statistiques/>
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D., & Rowhani, A. (2007). Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods*, *141*(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>
- Over de Linden, A. J., & Chamberlain, E. E. (1970). Effect of grapevine leafroll virus on vine growth and fruit yield and quality. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, *13*(3), 689–698. <https://doi.org/10.1080/00288233.1970.10421616>
- Perrone, I., Chitarra, W., Boccacci, P., & Gambino, G. (2017). Grapevine–virus–environment interactions: an intriguing puzzle to solve. *New Phytologist*, *213*(3), 983–987. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14271>
- Poojari, S, Boulé, J., DeLury, Lowery, D., Rott, M., Schmidt, A., & Úrbez-Torres, J. (2017). Epidemiology and genetic diversity of grapevine leafroll-associated viruses in British Columbia. *Plant Disease*, *101*(12), 2088–2097. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0497-RE>
- Poojari, Sudarsana, Alabi, O. J., & Naidu, R. A. (2013). Molecular characterization and impacts of a strain of Grapevine leafroll-associated virus 2 causing asymptomatic infection in a wine grape cultivar. *Virology Journal*, *10*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-324>
- QGIS Development Team. (2018). QGIS Geographic Information System (3.40.2). <https://www.qgis.org>
- Rambaut, A. (2006). FigTree (1.4.4).
- Rayapati, N., O’Neal, S., & Walsh, D. (2008). Grapevine leafroll disease. Washington State University Extension, 1–18. <https://s3.wp.wsu.edu/uploads/sites/2056/2023/05/Grapevine-Disease.pdf>
- Rayapati, N., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., & Martelli, G. (2014). Grapevine Leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*, *98*(9), 1172–1185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0880-FE>
- Reynard, J. S., Brodard, J., Dubuis, N., Zufferey, V., Schumpp, O., Schaerer, S., & Gugerli, P. (2018). Grapevine red blotch virus: Absence in Swiss vineyards and analysis of potential detrimental effect on viticultural performance. *Plant Disease*, *102*(3), 651–655. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1069-RE>
- Ricketts, K. D., Gomez, M. I., Atallah, S. S., Fuchs, M. F., Martinson, T. E., Battany, M. C., Bettiga, L. J., Cooper, M. L., Verdegaal, P. S., & Smith, R. J. (2015). Reducing the Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease in California: Identifying Optimal Disease Management Strategies. *American Journal of Enology and Viticulture*, *66*(2), 138 LP – 147. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14106>
- Ricketts, K. D., Gómez, M. I., Fuchs, M. F., Martinson, T. E., Smith, R. J., Cooper, M. L., Moyer, M. M., & Wise, A. (2017). Mitigating the Economic Impact of Grapevine Red Blotch: Optimizing Disease Management Strategies in U.S. Vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, *68*(1), 127 LP – 135. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16009>

- Rohrs, J. K., Fendell-Hummel, H. G., Macdonald, S. L., & Cooper, M. L. (2023). Best Practices for Monitoring Visual Symptoms of Grapevine Red Blotch Disease in Black-Fruited Winegrape Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 74(2), 1–12. <https://doi.org/10.5344/ajev.2023.23044>
- Ronquist, F., Huelsenbech, J., & Teslenko, M. (2011). MrBayes (3.2).
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. ., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP (No. v6; pp. 34:3299-3302).
- RStudio Team. (2024). RStudio (2024.04.2). <http://www.rstudio.com/>
- Ruiz-Corral, J. A. , Garcia, G. M., Acuña, I. J. G., López, H. E. F., Ojeda, G. R., Trejo, C. O., Murphy, K. F. B., & Parra, R. A. M. (2013). Requerimientos agroecologicos de los cultivos. Manual Técnico, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.
- Rumbaugh, A. C., Girardello, R. C., Cooper, M. L., Plank, C., Kurtural, S. K., & Oberholster, A. (2021). Impact of Rootstock and Season on Red Blotch Disease Expression in Cabernet Sauvignon (V. vinifera). *Plants (Vol. 10, Issue 8)*. <https://doi.org/10.3390/plants10081583>
- Sabella, E., Pierro, R., Luvisi, A., Panattoni, A., D’Onofrio, C., Scalabrelli, G., Nutricati, E., Aprile, A., De Bellis, L., & Materazzi, A. (2018). Phylogenetic analysis of viruses in tuscan vitis vinifera sylvestris (Gmeli) hegi. *PLoS ONE*, 13(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200875>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2017). UVA Mexicana. Reporte Técnico, Planeación agrícola nacional. 2017-2030. In Planeación agrícola nacional. 2017-2030. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Herranz, M. C., Minafra, A., Myrta, A., & Pallás, V. (2004). Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 77–84. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:25778035>
- Sandez-Salas, O. M. (2021). Evaluación comparativa de RT-PCR punto final, RT-PCR en tiempo real y RT-LAMP en el diagnóstico del virus GLRaV-3 asociado al enrollamiento de la hoja en plantas de vid [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3646>
- SEFOA (Secretaría de Fomento Agropecuario). (2015). Panorama general de “Valle de Guadalupe” Baja California. Reporte Técnico, 2015, Secretaría de Fomento Agropecuario.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad). (2019). Complejo de virus de la hoja enrollada de la vid (Grapevine leafroll- associated virus 1, Grapevine leafroll- associated virus 2, Grapevine leafroll- associated virus 3). Ficha Técnica no. 75, 1–18, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2020). Avance de Siembras y Cosechas Resumen por cultivo. Reporte Técnico, año agrícola 2019, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do
- SIMARBC (Sistema de Información para el Manejo de Agua de Riego de Baja California), & AGRICULTURA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2024). Sistema de Información de Manejo del Agua de

- Riego en Baja California. Estaciones. Consultado el 06 de febrero de 2025, de <https://www.simarbc.gob.mx/ingresar>
- Simon, C., Frati, F., Backenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Song, Y., Hanner, R. H., & Meng, B. (2022). Transcriptomic Analyses of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 Infection in Leaves and Berries of 'Cabernet Franc.' *Viruses*, 14(8), 1–22. <https://doi.org/10.3390/v14081831>
- SPA (Secretaría de Protección al Medio Ambiente de Baja California). (2016). Programa ambiental estratégico de la región vitivinícola del Valle de Guadalupe, Municipio de Ensenada, B.C., México. Reporte Técnico, 2016, Gobierno del estado de Baja California.
- 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>
- Trebicki, P. (2020). Climate change and plant virus epidemiology. *Virus Research*, 286, 198059. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198059>
- Tsai, C. W., Rowhani, A., Golino, D. A., Daane, K. M., & Almeida, R. P. P. (2010). Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology*, 100(8), 830–834. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-8-0830>
- Tsai, W. A., Brosnan, C. A., Mitter, N., & Dietzgen, R. G. (2022). Perspectives on plant virus diseases in a climate change scenario of elevated temperatures. *Stress Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00058-x>
- Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., & Martelli, G. (2005). Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *Journal of General Virology*, 86, 217–224. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80395-0>
- Vaughan, J. G., & Geissler, C. A. (2009). The New Oxford Book of Food Plants. In *Taxon* (Vol. 47, Issue 1). <https://doi.org/10.2307/1224074>
- Venegas Cardoso, F. R., & García López, J. (2005). Study of some pedogenetic processes in Ojos Negros Valley, Baja California, Mexico. *Investigaciones Geográficas*, 57, 53–67. <https://www.scielo.org.mx/pdf/igeo/n57/n57a5.pdf>
- Vieux, P. D. le, & Malan, A. P. (2013). An Overview of the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*) in South African Vineyards and the Use of Entomopathogenic Nematodes as Potential Biocontrol Agent. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(1), 108–118. <https://doi.org/10.21548/34-1-1086>
- Vincent, C., Isaacs, R., Bostonian, N., & Lasnier, J. (2012). Principles of Arthropod Pest Management in Vineyards. In *Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches, and Future Directions* (pp. 309–338). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7>
- Volpe, M. L., Talquenca, S. G., Engel, E. a, & Gracia, O. (2010). Incidence of Grapevine Leafroll Associated

- Viruses -1, -2, and-3 in Mendoza vineyards. *European Journal of Plant Pathology, Tropical Plant Pathology*, 35, 6. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000600007>
- Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J., & Valkonen, J. P. T. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Science*, 181(4), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.008>
- Walton, V. (2003). Degree Day Estimation as a Warning Tool for Outbreaks of Grapevine Mealybug in Vineyards. Reporte Técnico, Elle versión. https://www.ipw.co.za/content/pdfs/literature/eng/Degree_Day_Estimation_as_a_Warning_Tool_for_Outbreaks.pdf
- Walton, V.M., & Pringle, K. L. (2004). Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), a Key Pest in South African vineyards. A Review. *South African Journal of Entology & Viticulture*, 25(2). <https://doi.org/10.21548/25-2-2140>
- Walton, Vaughn M. (2003). Development of an integrated pest management system for vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret), in vineyards in the Western Cape Province, South Africa. [Tesis de Doctorado, University of Stellenbosch].
- Wang, J., Sharma, A. M., Duffy, S., & Almeida, R. P. P. (2011). Genetic diversity in the 3' terminal 4.7-kb region of grapevine leafroll-associated virus 3. *Phytopathology*, 101(4), 445–450. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-10-0173>
- Wang, X. B., Deng, J., Zhang, J. T., Zhou, Q. S., Zhang, Y. Z., & Wu, S. A. (2015). DNA barcoding of common soft scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) in China. *Bulletin of Entomological Research*, 105(5), 545–554. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000413>
- Wang, Y. M., Ostendorf, B., & Pagay, V. (2023). Detecting Grapevine Virus Infections in Red and White Winegrape Canopies Using Proximal Hyperspectral Sensing. In *Sensors* (Vol. 23, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/s23052851>
- Waterworth, R. A., Wright, I. M., & Millar, J. G. (2011). Reproductive Biology of Three Cosmopolitan Mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) Species, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni*, and *Planococcus ficus*. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(2), 249–260. <https://doi.org/10.1603/an10139>
- Xiao, H., Shabanian, M., Moore, C., Li, C., & Meng, B. (2018). Survey for major viruses in commercial *Vitis vinifera* wine grapes in Ontario. *Virology Journal*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1036-1>
- Yepes, L. M., Cieniewicz, E., Krenz, B., McLane, H., Thompson, J. R., Perry, K. L., & Fuchs, M. (2018). Causative role of grapevine red blotch virus in red blotch disease. *Phytopathology*, 108(7), 902–909. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0419-R>
- Zhao, J., Watson, G. W., Sun, Y., Tan, Y., Xiao, L., & Bai, L. (2014). Phenotypic variation and identification of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) in China. *Zootaxa*, 3802(1), 109–121. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3802.1.9>

Anexos

Anexo A.

Tabla 12. Eficiencia de extracciones de ARN de peciols de vid comparando dos tiempos en PowerLyzer.

Muestra	5 ciclos		10 ciclos	
	[ng/ μ L]	A260/280	[ng/ μ L]	A260/280
1	35.4	2.00	46.5	2.03
2	69.7	1.49	74.5	1.83
3	36.5	1.98	51.5	1.85
4	27.7	1.70	39.8	1.91

Anexo B.

Tabla 13. Eficiencia de extracciones de ARN de peciolas de vid comparando perlas de cerámica o de vidrio en PowerLyzer.

Muestra	Cerámica		Vidrio	
	[ng/μL]	A260/280	[ng/μL]	A260/280
1	571.6	1.26	293.2	1.18
1	388.5	1.29	272.1	1.22
2	615.4	1.16	446.1	1.00
2	567.2	1.18	345.0	1.11

Anexo C.

Tabla 14. Eficiencia de extracciones de ARN de peciolas de vid comparando cantidad de lavados de cloroformo.

Muestra	3 lavados con cloroformo		4 lavados con cloroformo	
	[ng/ μ L]	A260/280	[ng/ μ L]	A260/280
1	68.6	1.56	31.8	1.99
2	113.8	1.31	52.3	1.95
3	120.6	1.10	48.3	1.92
4	158.8	1.10	78.1	1.92
5	155.3	1.23	86.2	2.02
6	120.4	1.20	53.4	2.01
7	78.3	1.28	40.1	2.07
8	152.2	1.00	63.9	1,89
9	182.0	1.45	109.2	2.00
10	131.6	1.45	109.5	2.04
11	105.2	1.57	51.2	2.02
12	167.4	1.34	56.9	1.98

Anexo D.

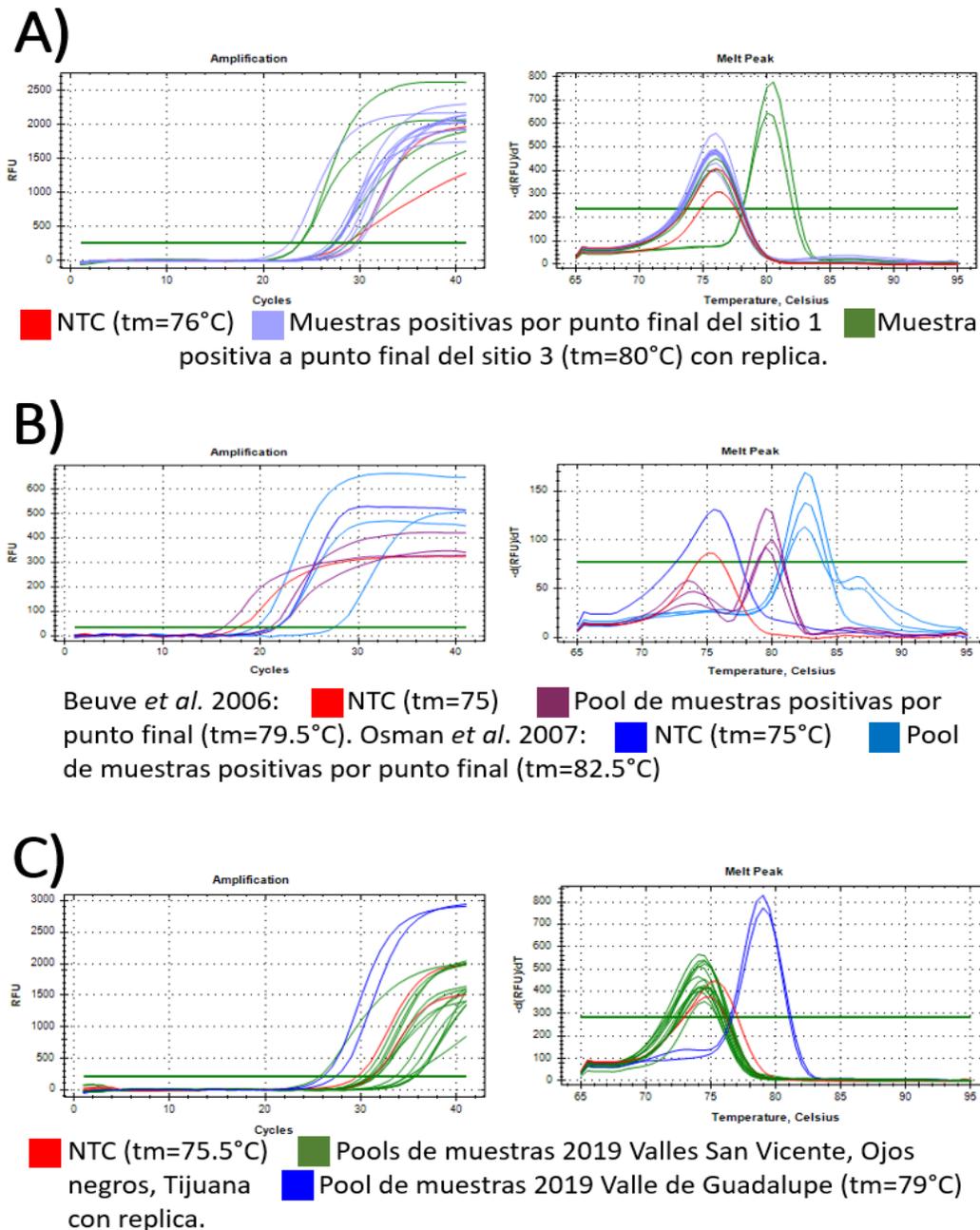


Figura 25. Curvas de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de GLRaV-1, -2 y -4. Prueba de cebadores para GLRaVs con la técnica RT-PCR en tiempo real. En todos los paneles la imagen de la izquierda corresponde a curvas de amplificación y la de la derecha las curvas de disociación que muestra valores superiores a 79°C en muestras aparentemente positivas a los virus probados. A: Análisis de cebadores *hsp70h* de Osman *et al.* (2007) para GLRaV-1 con muestras de campo del 2020 positivas por punto final. B: Análisis de los cebadores P19qt-P24qt de Beuve *et al.* (2007) y 198 F + 290 R de Osman *et al.* (2007) para GLRaV-2 pools de muestras de muestras del 2020 positivas por punto final. C: Análisis de cebadores *hsp* de Osman *et al.* (2007) para GLRaV-4, pools de muestras del 2019 sin diagnóstico previo. Las muestras diagnosticadas previamente por PCR punto final para GLRaV-1 y GLRaV-2 se utilizaron los primers de Gambino y Gribaudo, (2006).

Anexo E.

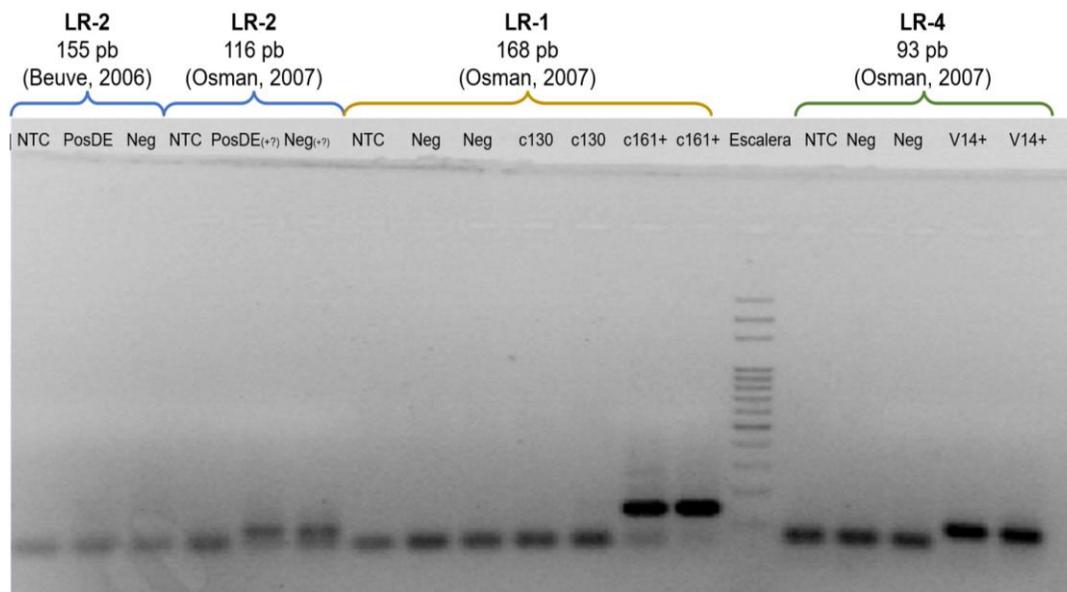


Figura 26. Confirmación de amplificación específica de los cebadores para GLRaV-1, -2 y -4 mediante electroforesis en gel de agarosa. Muestras representativas (NTC, positivas y negativas) probadas por PCR en tiempo real. Para cada juego de cebadores se indica el tamaño esperado en pares de bases (pb).

Anexo F.

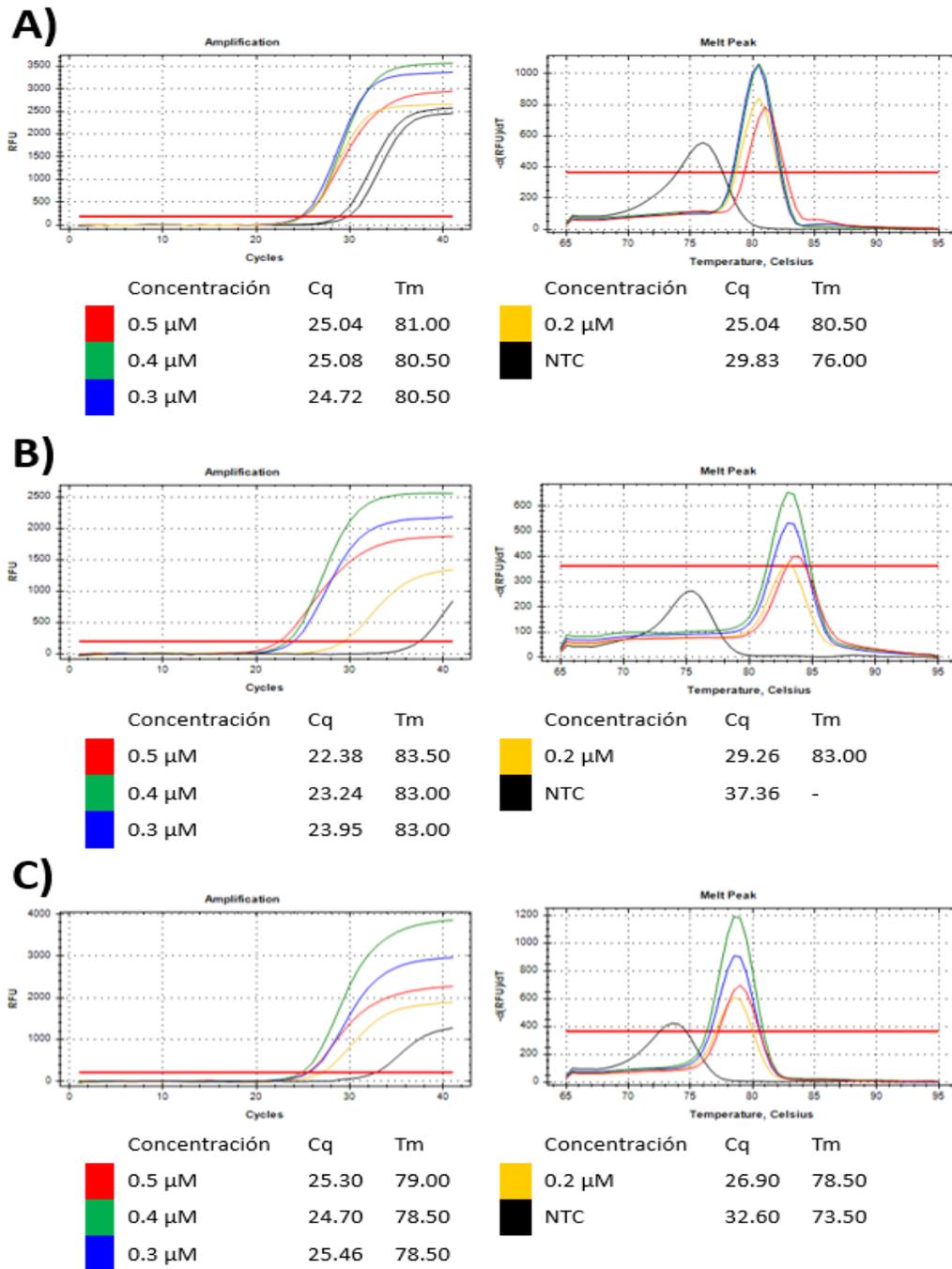
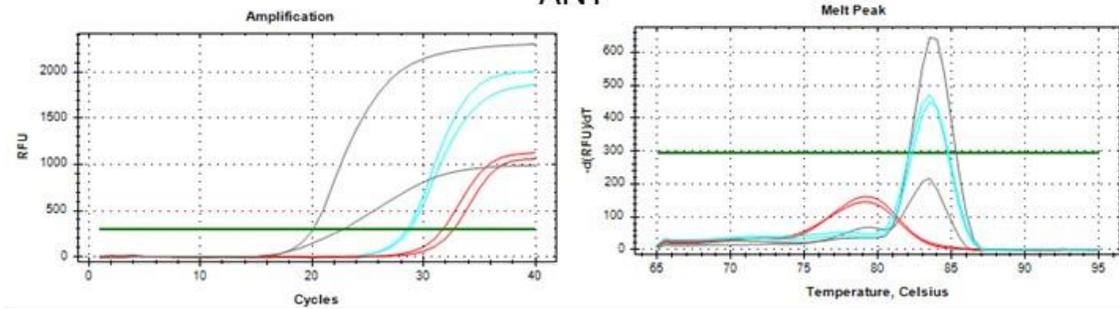


Figura 27. Prueba de concentraciones de primers para GLRaV-1, -2 y -4. Prueba de distintas concentraciones de cebadores para GLRaVs con la técnica RT-PCR en tiempo real. En todos los paneles la imagen de la izquierda corresponde a curvas de amplificación y la de la derecha las curvas de disociación que muestra valores superiores a 79°C en muestras positivas a los virus probados. En todos los casos las muestras se probaron por duplicado y se incluyó un NTC para cada concentración. En las gráficas solo se muestra uno de los duplicados y un ejemplo de NTC. A: Análisis de cebadores *hsp70h* de Osman *et al.* (2007) para GLRaV-1 con controles positivos. B: Análisis de los cebadores 198 F + 290 R de Osman *et al.* (2007) para GLRaV-2 con controles positivos. C: Análisis de cebadores HSP de Osman *et al.* (2007) para GLRaV-4 con controles positivos.

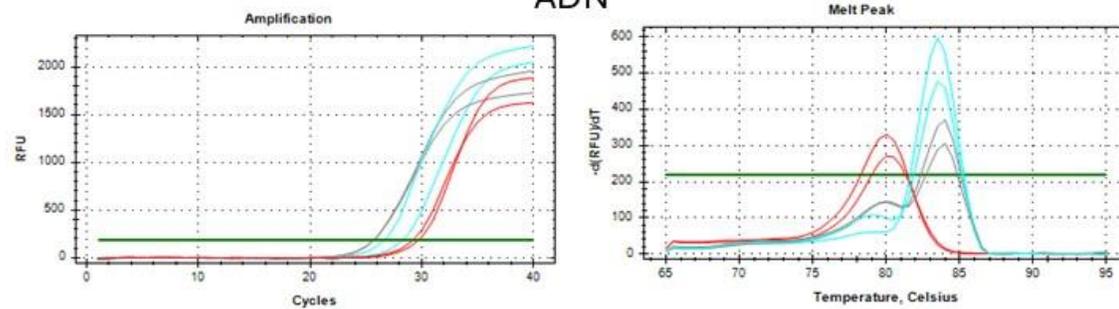
Anexo G.

A) Ejemplo 1

ANT

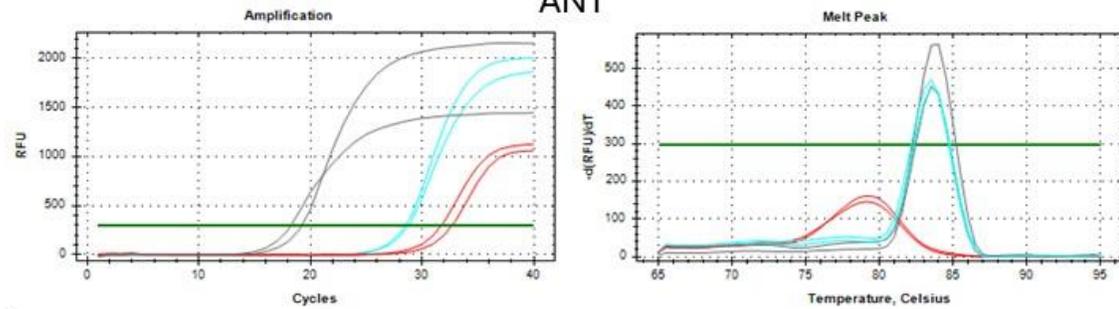


ADN



B) Ejemplo 2

ANT



ADN

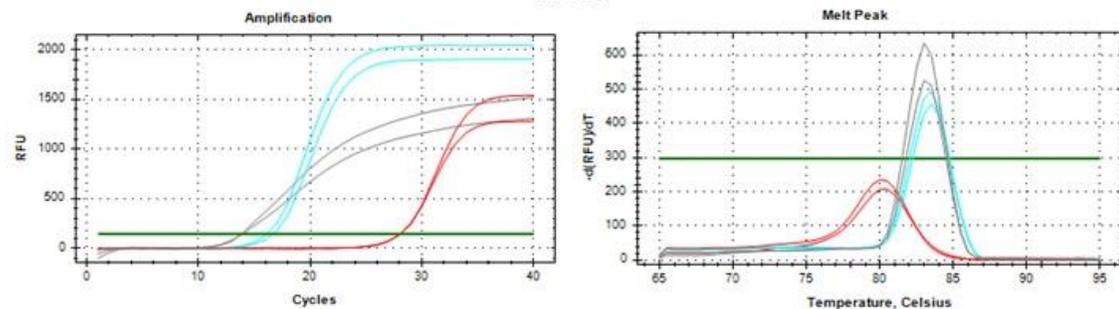


Figura 28. Prueba de ácidos nucleicos totales y ADN para la detección de GRBV por PCR en tiempo real. A-B: Ejemplos de muestras positivas a GRBV y controles (positivo y negativo). En todos los casos las muestras se probaron por duplicado. A: Ejemplo 1. B: Ejemplo 2. Izquierda: curvas de amplificación. Derecha: Curvas de fusión. Gris: muestra problema. Rojo: control sin plantilla (control negativo). Azul celeste: control positivo (plásmido). ANT: ácidos nucleicos totales. ADN: ácido desoxirribonucleico.

Anexo H.

Tabla 15. Análisis de Chi cuadrada para la asociación entre el diagnóstico por síntomas y el diagnóstico molecular.

<pre>tablaVisualvsMolecular <- table (correlacion\$Molecular, correlacion\$Visual) print(tablaVisualvsMolecular)</pre>		
	Asymptomatic	Symptomatic
Negative	43	39
Positive	10	98
<pre>chi2_testcorrelacion <- chisq.test(tablaVisualvsMolecular) Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction data: tablaVisualvsMolecular X-squared = 41.087, df = 1, p-value = 1.456e-10</pre>		

Anexo I.

Tabla 16. Resultados estadísticos de la asociación de la prevalencia con localidad, cultivar e infestación por PHV.

Analysis of variance (ANOVA): Locality				
modelo_anova3 <- aov(Sintomatica ~ Localidad, data = prevalencia1)				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value Pr(>F)
Localidad	8	10119	1264.9	2.628 0.0112 *
Residuals	112	53918	481.4	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
tukey_test3 <- TukeyHSD(modelo_anova3) Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level				
Fit: aov(formula = Sintomatica ~ Localidad, data = prevalencia1)\$Localidad				
	diff	lwr	upr	p adj
FZ-EP	9.6723016	-10.20817165	29.552775	0.8345711
ON-EP	-19.1246762	-44.09314572	5.843793	0.2820939
Otra-EP	-1.1651290	-27.18340743	24.853149	1.0000000
PG-EP	-16.7167514	-53.40503431	19.971532	0.8791648
SAM-EP	7.0824938	-11.42186154	25.586849	0.9525744
ST-EP	7.3695985	-25.87437173	40.613569	0.9986862
SV-EP	-3.6727355	-27.74824565	20.402775	0.9999177
T-EP	-19.6610333	-52.90500350	13.582937	0.6349450
ON-FZ	-28.7969778	-55.91307867	-1.680877	0.0284807
Otra-FZ	-10.8374306	-38.92317910	17.248318	0.9503171
PG-FZ	-26.3890530	-64.57135988	11.793254	0.4217561
SAM-FZ	-2.5898078	-23.90340963	18.723794	0.9999857
ST-FZ	-2.3027031	-37.18851701	32.583111	0.9999999
SV-FZ	-13.3450371	-39.64120879	12.951135	0.7999701
T-FZ	-29.3333348	-64.21914879	5.552479	0.1746025
Otra-ON	17.9595472	-13.93089841	49.849993	0.6941302
PG-ON	2.4079248	-38.65397738	43.469827	1.0000000
SAM-ON	26.2071700	0.08321786	52.331122	0.0486217
ST-ON	26.4942748	-11.52165965	64.510209	0.4099987
SV-ON	15.4519407	-14.87428389	45.778165	0.7964403
T-ON	-0.5363570	-38.55229142	37.479577	1.0000000
PG-Otra	-15.5516224	-57.26020851	26.156964	0.9592419
SAM-Otra	8.2476228	-18.88146158	35.376707	0.9884864
ST-Otra	8.5347275	-30.17880513	47.248260	0.9987374
SV-Otra	-2.5076065	-33.70386015	28.688647	0.9999994
T-Otra	-18.4959042	-57.20943690	20.217628	0.8480170
SAM-PG	23.7992452	-13.68497162	61.283462	0.5408922
ST-PG	24.0863499	-22.47347076	70.646171	0.7826458
SV-PG	13.0440159	-27.48110636	53.569138	0.9833835
T-PG	-2.9442818	-49.50410254	43.615539	0.9999999
ST-SAM	0.2871047	-33.83324061	34.407450	1.0000000
SV-SAM	-10.7552293	-36.02708315	14.516625	0.9148325
T-SAM	-26.7435270	-60.86387239	7.376818	0.2533376
SV-ST	-11.0423341	-48.47783842	26.393170	0.9905523
T-ST	-27.0306318	-70.92765169	16.866388	0.5824431
T-SV	-15.9882977	-53.42380209	21.447207	0.9132276

Continuación Tabla 16. Resultados estadísticos de la asociación de la prevalencia con localidad, cultivar e infestación por PHV.

ANOVA: Cultivar				
modelo_anova4 <- aov(Sintomatica ~ Cultivar, data = prevalencia1)				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value Pr(>F)
Variedad	6	2059	343.1	0.631 0.705
Residuals	114	61979	543.7	
tukey_test4 <- TukeyHSD(modelo_anova4) Tukey multiple comparisons of mean 95% family-wise confidence level Fit: aov(formula = Sintomatica ~ Cultivar, data = prevalencia1)\$Variedad				
	diff	lwr	upr	p adj
Desconocida-Cabernet sauvignon	-6.4306973	-38.019340	25.15795	0.9963515
Grenache-Cabernet sauvignon	-3.1682399	-34.756883	28.42040	0.9999371
Merlot-Cabernet sauvignon	4.0718518	-18.466837	26.61054	0.9981224
Nebbiolo-Cabernet sauvignon	3.6695576	-19.957408	27.29652	0.9992025
Otra-Cabernet sauvignon	-2.2789474	-20.097345	15.53945	0.9997394
Tempranillo-Cabernet sauvignon	8.3599407	-12.937118	29.65700	0.9009351
Grenache-Desconocida	3.2624574	-37.145870	43.67079	0.9999825
Merlot-Desconocida	10.5025491	-23.305483	44.31058	0.9665056
Nebbiolo-Desconocida	10.1002549	-24.442821	44.64333	0.9752046
Otra-Desconocida	4.1517499	-26.710620	35.01412	0.9996508
Tempranillo-Desconocida	14.7906379	-18.202623	47.78390	0.8288035
Merlot-Grenache	7.2400916	-26.567941	41.04812	0.9951830
Nebbiolo-Grenache	6.8377975	-27.705278	41.38087	0.9968747
Otra-Grenache	0.8892925	-29.973078	31.75166	1.0000000
Tempranillo-Grenache	11.5281805	-21.465081	44.52144	0.9412563
Nebbiolo-Merlot	-0.4022942	-26.923497	26.11891	1.0000000
Otra-Merlot	-6.3507992	-27.859774	15.15818	0.9739615
Tempranillo-Merlot	4.2880889	-20.180369	28.75655	0.9984175
Otra-Nebbiolo	-5.9485050	-28.595293	16.69828	0.9856722
Tempranillo-Nebbiolo	4.6903830	-20.784044	30.16481	0.9979117
Tempranillo-Otra	10.6388880	-9.565276	30.84305	0.6948961
ANOVA: Vine mealybug infestation				
modelo_anova1 <- aov(Sintomatica ~ Infestacion, data = prevalencia1)				
summary(modelo_anova1):				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value Pr(>F)
Infestacion	1	6084	6084	12.49 0.000583 ***
Residuals	119	57953	487	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

Anexo J.

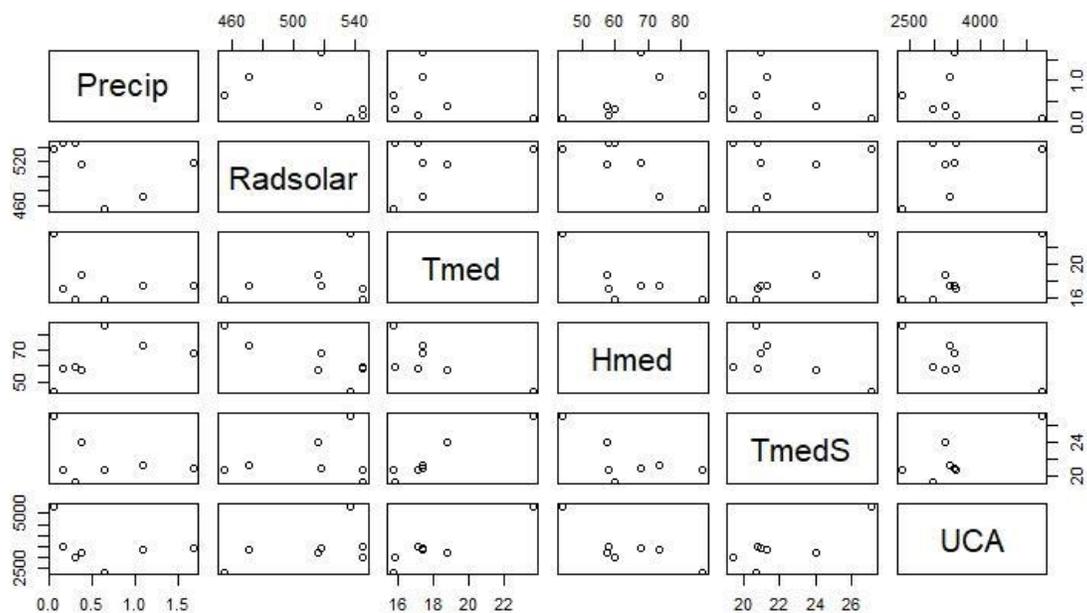


Figura 29. Diagramas de dispersión y matriz de dispersión de variables meteorológicas para prevalencia. Precip = Precipitación (mm). Radsolar = Radiación Solar (Cal/cm²). Tmed = Temperatura Ambiental promedio (°C). Hmed = Humedad relativa promedio (%). TmedS = Temperatura promedio del suelo (°C). UCA = Unidades de calor acumuladas.

Anexo K.

Tabla 17. Regresión múltiple de variables meteorológicas para prevalencia.

lm(formula = Sintomatica ~ Precip + Radsolar + Hmed + Tmed + TmedS + UCA, data = datos)				
Residuals:				
Min	1Q	Median	3Q	Max
-27.498	-16.056	-2.968	6.272	72.702
Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)*
(Intercept)	491.14044	461.77558	1.064	0.289762
Precip	-4.10088	14.85111	-0.276	0.782946
Radsolar	-0.56932	0.51336	-1.109	0.269758
Hmed	-1.46808	1.65135	-0.889	0.375867
Tmed	-145.74348	38.38606	-3.797	0.000237 ***
TmedS	82.13797	22.21895	3.697	0.000337 ***
UCA	0.20886	0.05523	3.781	0.000250 ***

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 | Residual standard error: 21.97 on 114 degrees of freedom | Multiple R-squared: 0.141, Adjusted R-squared: 0.09575 | F-statistic: 3.118 on 6 and 114 DF, p-value: 0.007257 | Sintomatica = Symptomatic plants to GLD and/or GRBD | Precip = Precipitación | Radsolar = Radiación Solar | Hmed = Humedad promedio | Tmed = Temperatura promedio | TmedS = Temperatura promedio del suelo | UCA = Unidades de calor acumuladas

Anexo L.

Tabla 18. Modelo lineal general para incidencia.

glm(formula = Clave ~ Ano2022 + Ano2023 + CultivarN + CultivarM + Sitio2 + Sitio3 + Sitio4 + Sitio5 + PHVNo, family = binomial, data = data)				
Deviance Residuals:				
Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.4939	-0.8334	0.3021	0.5157	2.2132

Coefficients: (1 not defined because of singularities)				
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)*
(Intercept)	2.37086	0.05074	46.729	< 2e-16 ***
Ano2022	0.10489	0.03463	3.029	0.00246 **
Ano2023	0.69317	0.03464	20.008	< 2e-16 ***
VariedadN	0.57755	0.10061	5.741	9.44e-09 ***
VariedadM	-0.91645	0.0799	-11.573	< 2e-16 ***
Sitio2	-0.42036	0.06285	-6.689	2.25e-11 ***
Sitio	-2.84520	0.0536	-53.023	< 2e-16 ***
Sitio4	-3.93237	0.11488	-34.230	< 2e-16 ***
Sitio5	-3.8130	0.05883	-64.813	< 2e-16 ***
PHVNo	NA	NA	NA	NA

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1) | Null deviance: 45376 on 33149 degrees of freedom | Residual deviance: 31145 on 33141 degrees of freedom | AIC: 31163 | Number of Fisher Scoring iterations: 5 | Clave= classification as 0 (asymptomatic to GLD and/or GRBD) or 1 (symptomatic to GLD and/or GRBD) | Ano2022 = year 2022 | Ano2023 = year 2023 | CultivarN = cv. Nebbiolo | CultivarM = cv. Merlot | Sitio2 = Site 2 | Sitio3 = Site 3 | Sitio4 = Site 4 | Sitio5 = Site 5 | PHVNo = without presence of vine mealybug

Anexo M.

Tabla 19. Modelo de regresión lineal de incidencia de GLD y/o GRDB y PHV.

<code>modelo_manova <- manova(cbind(mealybug, incidence) ~ site + year, data)</code>						
	Df	Pillai	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Site	4	0.765	2.97	8	24	0.019 *
Year	2	0.423	1.45			
Linear regression						
Call: <code>lm(formula = Data\$Incidence ~ Data\$mealybug)</code>						
Residuals:						
	1	2	3	4	5	
	11.930	1.109	-15.339	1.244	1.056	
Coefficients*:						
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)		
(Intercept)	20.5438	8.3028	2.474	0.0897.		
Data\$mealybug	2.5757	0.4807	5.359	0.0127 *		

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1. Residual standard error: 11.28 on 3 degrees of freedom. Multiple R-squared: 0.9054, Adjusted R-squared: 0.8739. F-statistic: 28.72 on 1 and 3 DF, p-value: 0.01272

Anexo N.

Tabla 20. Resumen de muestras probadas para GLRaVs y GRBV por RT-PCR punto final y por RT-PCR en tiempo real.

Muestra	RT-PCR punto final (al menos un GLRaV)	RT-PCR en tiempo real (GLRaV-3)			PCR en tiempo real (GRBV)			Síntomas a GLD
		Diagnóstico	Ct	Tm	Diagnóstico	Ct	Tm	
Muestra 1	Negativa	Positiva	29.92	83.50	NA	NA	NA	Sí
Muestra 2	Negativa	Positiva	31.57	83.50	NA	NA	NA	Sí
Muestra 3	Negativa	Negativa	N/A	Ninguna	NA	NA	NA	Sí
Muestra 4	Negativa	Positiva	31.57	83.50	NA	NA	NA	Sí
Muestra 5	Negativa	Positiva	32.67	83.50	NA	NA	NA	Sí
Muestra 6	Negativa	Positiva	31.88	83.50	NA	NA	NA	Sí
Muestra 7	Negativa	Positiva	32.69	83.50	Positiva	18.69	83.00	Sí
Muestra 8	Negativa	Negativa	N/A	Ninguna	Negativa	N/A	Ninguna	Sí
Muestra 9	Negativa	Positiva	35.09	83.50	Positiva	21.13	83.00	Sí
Muestra 10	Negativa	Positiva	33.40	83.00	Positiva	18.53	83.00	Sí
Muestra 11	Negativa	Positiva	31.18	83.50	Positiva	20.63	83.50	Sí
Muestra 12 (control negativo campo GLRaV-3)	Negativa	Negativa	N/A	Ninguna	Negativa	N/A	Ninguna	No
Muestra 13	Positiva	Positiva	20.97	83.50	NA	NA	NA	Sí
NTC GLRaV-3	Negativa	Negativa	N/A	Ninguna	NA	NA	NA	NA
Plásmido MSSq2 (control positivo GLRaV-3)	Positiva	Positiva	19.63	83.50	NA	NA	NA	NA
NTC GRBV	NA	NA	NA	NA	Negativa	29.71	80.00	NA
Control negativo GRBV campo	NA	NA	NA	NA	Negativa	30.37	79.50	NA
Control positivo GRBV campo	NA	NA	NA	NA	Positiva	20.76	83.50	NA
Plásmido LVRG-3A (control positivo GRBV)	NA	NA	NA	NA	Positiva	15.09	83.50	NA

Anexo Ñ.

Tabla 21. Resumen de grupos 2021 probados para GLRaVs y GRBV por RT-PCR en tiempo real.

Sitio	Pool	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GRBV
1	1	-	+	+	-	-
	2	-	+	+	-	-
	3	-	+	+	-	-
	4	-	+	+	-	-
2	17	-	+	+	-	-
	18	-	+	+	-	-
	19	-	+	+	-	-
	20	-	+	+	-	-
3	5	-	+	+	-	-
	6	-	+	+	-	-
	7	-	+	+	-	-
	8	-	-	+	-	-
4	9	-	+	+	-	-
	10	-	+	+	-	-
	11	-	-	+	-	+
	12	-	-	-	-	-
5	13	-	+	+	-	+
	14	-	+	-	-	-
	15	-	+	-	-	+
	16	-	+	-	-	+
Total		0/20	17/20	16/20	0/20	4/20

Anexo O.

Tabla 22. Listado del número de acceso a GenBank y país de origen de las secuencias incluidas en el análisis de GLRaV-3.

Aislado GLRaV-3	Número de acceso a GenBank	Nombre	País
GLRaV3m-139	JX266782	Aust1	Australia
NA	AJ748510	Aust2	Austria
NA	AJ748511	Aust3	Austria
NA	AJ748512	Aust4	Austria
NA	AJ748513	Aust5	Austria
GLRaV3-ISAB-BR	KX701860	Braz1	Brasil
GLRaV3-TC-BR	KX756668	Braz2	Brasil
GLRaV3-TRAJ-BR	KX756669	Braz3	Brasil
GLRaV3-3138-07	JX559645	Cana1	Canadá
GLRaV3-8415A	KY073323	Cana2	Canadá
GLRaV3-8415B	KY073324	Cana3	Canadá
GLRaV3-Vdl	MK032068	Cana4	Canadá
GLRaV3-Kat255	MH521108	Cana5	Canadá
GLRaV3-Kat255b	MH521109	Can6	Canadá
GLRaV3-CI-766	EU344893	Chil1	Chile
GLRaV3-LN	JQ423939	Chin1	China
NA	AJ748514	Chin2	China
GLRaV3-VB-108	MF991951	Croa1	Croacia
GLRaV3-Gor259	MH521104	Fran1	Francia
GLRaV3-Gre233	MH521105	Germ1	Alemania
GLRaV3-Rod96	KY707825	Gree1	Grecia
GLRaV3-Kis24	MH521110	Hung1	Hungría
GLRaV3-Kis252	MH521111	Hung2	Hungría
GLRaV3-LN3204	MH521112	Hung3	Hungría
GLRaV3-ISR	KJ174518	Isra1	Israel
NA	AJ748524	Isra2	Israel
GLRaV3-NdA121	KY707826	Ital1	Italia
NA	AJ748518	Ital2	Italia
NA	AJ748519	Ital3	Italia
NA	AJ748520	Ital4	Italia
NA	AJ748521	Ital5	Italia
GLRaV3-NZ-1	JX220900	NewZ1	Nueva Zelanda
GLRaV3-NZ2	JX220899	NewZ2	Nueva Zelanda
GLRaV3-Tou260	MH521119	Port1	Portugal
GLRaV3-621	GQ352631	SoutA1	Sudáfrica
GLRaV3-623	GQ352632	SoutA2	Sudáfrica
GLRaV3-GH11	JQ655295	SoutA3	Sudáfrica
GLRaV3-GH24	KM058745	SoutA4	Sudáfrica
GLRaV3-GH30	JQ655296	SoutA5	Sudáfrica

GLRaV3-GP18	EU259806	SoutA6	Sudáfrica
GLRaV3-PL-20	GQ352633	SoutA7	Sudáfrica
GLRaV3-AU173	MH521088	Spai1	España
GLRaV3-BHA172	MH521089	Spai2	España
NA	AJ748515	Syri1	España
NA	AJ748516	Syri2	España
NA	AJ748517	Syri3	España
NA	AJ748522	Tuni1	Túnez
GLRaV3-I-LR101	KY886362	USA1	EUA
GLRaV3-WA-MR	GU983863	USA2	EUA
GLRaV3-Pro95	KY707824	USA3	EUA
GLRaV3-Trc138	KY764333	USA4	EUA
GLRaV3-Trc139	KY764332	USA5	EUA
GLRaV3-Bla223	MH521090	USA6	EUA
GLRaV3-Cab248	MH521091	USA7	EUA
GLRaV3-Cha103	MH521092	USA8	EUA
GLRaV3-Cha106	MH521093	USA9	EUA
GLRaV3-Cha137	MH521094	USA10	EUA
GLRaV3-Cha138	MH521095	USA11	EUA
GLRaV3-Cha138b	MH521096	USA12	EUA
GLRaV3-Cha141	MH521097	USA13	EUA
GLRaV3-Cha246	MH521098	USA14	EUA
GLRaV3-Cha246b	MH521099	USA15	EUA
GLRaV3-Cha247	MH521100	USA16	EUA
GLRaV3-245	MH521103	USA17	EUA
GLRaV3-Ita218	MH521106	USA18	EUA
GLRaV3-Ita219	MH521107	USA19	EUA
GLRaV3-Mar239	MH521114	USA21	USA
GLRaV3-Mer240	MH521115	USA22	EUA
GLRaV3-Pin244	MH521116	USA23	EUA
GLRaV3-Pin244b	MH521117	USA24	EUA
GLRaV3-Pin249	MH521118	USA25	EUA
NA	AJ748523	USA26	EUA
GLRaV3-ID45	MH796136	USAI1	EUA: Idaho
GLRaV3-ID46	MH796135	USAI2	EUA: Idaho
GLRaV3-CA7246	JQ796828	USACA1	EUA: California
GLRaV3-NY1	AF037268	USANY1	EUA: Nueva York
GLRaV3-Dk256	MH521101	USA27	EUA
GLRaV3-185	MH521102	USA28	EUA

Anexo P.

Catálogo fotográfico de síntomas foliares asociados a los virus GLRaVs y GRBV en vid (Versión extendida)

Elaborado por: Karen García Reséndiz,
Carolina Lazcano García y Jimena
Carrillo Tripp



Figura 30. Catálogo fotográfico de síntomas foliares asociados a los virus GLRaVs y GRBV en vid y QR de acceso.

Anexo Q.



Figura 31. Captura de pantalla del artículo de revisión: Grapevine virus in Mexico: studies and reports

doi: <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i4.2109>

Anexo R.

1 **Article Type**
 2 Research Report
 3

4 **Article Title**
 5 Epidemiological Surveillance of Grapevine Leafroll and Red Blotch Diseases in Baja California,
 6 Mexico
 7

8 **Author Names(s)**
 9 Karen G. García-Reséndiz¹, Gabriela Moyano-Briones², Pedro López-Simancas², José Ramón Úrbez-
 10 Torres³, Rufina Hernández-Martínez¹ and Jimena Carrillo-Tripp^{1*}
 11

12 |
 13

14 **Acknowledgments/Author disclosures**
 15 This work was supported by funds granted to JCT [CONAHCYT (FOP02-2021-4 Grant 316602),
 16 CICESE institutional project (683210)], and to CESVBC (SADERBC, Proyecto de Manejo Fitosanitario
 17 de la Vid). We express our gratitude to CONAHCYT for the doctoral scholarship awarded to KGGR.
 18 We thank all the grape growers participating in this research and our collaborators from CESVBC and
 19 CICESE, as well as the undergraduate students for their assistance in developing our research on
 20 grapevine viruses. We thank F.S. Ceccarelli and M.A. Alonso for their valuable input during the
 21 development of this work. We also thank M. Rosas for verifying the statistical analyses. Thanks to the
 22 reviewers for their valuable input to improve the manuscript.
 23

24 **Short version of title**
 25 Grapevine leafroll and red blotch in BC, Mexico
 26

27 **Abstract**
 28 **Background and goals.** In Baja California, Mexico, the occurrence of grapevine leafroll (GLD) and red
 29 blotch (GRBD) diseases and the presence of the vine mealybug (vector of some grapevine leafroll-
 30 associated viruses), have been recognized. In this work, an epidemiological study was conducted to
 31 determine the prevalence and incidence of symptomatic plants associated with both diseases.
 32 **Methods and key findings.** Randomly selected vineyards were surveyed to determine GLD and GRBD
 33 prevalence based on symptom evaluation in quadrats of 1,000 grapevines. Results showed that 92% of
 34 the sites had symptomatic plants, with an average prevalence of 20% (minimum = 0 and maximum =
 35 92%). The main variables positively associated with disease prevalence were the percentage of vine
 36 mealybug-infested plants per site, soil temperature, and accumulated heat units; and negatively
 37 associated with ambient temperature. Disease incidence determined during three growing seasons (2021-
 38 2023) in quadrats of 2,500 grapevines in five vineyards revealed an average increase of 1.7% and 9% in
 39 2022 and 2023, respectively. One site with absence of vine mealybug showed the lowest percentage of
 40 symptomatic plants. 'Cabernet Sauvignon' and 'Nebbiolo' showed more symptomatic plants than
 41 'Merlot'. Virus infection in 137 symptomatic and 53 asymptomatic grapevines was tested by real-time
 42 PCR for grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, and
 43 grapevine red blotch virus (GRBV). The diagnosis based on symptoms had a sensitivity of 90% and a
 44 specificity of 52% with respect to real-time PCR results.
 45 **Conclusions and significance.** The presence and widespread distribution of GLD and GRBD
 46 underscore the need to implement regional management programs in Baja California vineyards.
 47 **Key words:** Grapevine leafroll disease, grapevine red blotch disease, grapevine leafroll-associated
 48 viruses, grapevine red blotch virus, visual diagnosis, vine mealybug

Figura 32. Artículo de reporte de investigación: Epidemiological Surveillance of Grapevine Leafroll and Red Blotch Diseases in Baja California, Mexico. Al momento de la publicación de la tesis, el artículo estaba aceptado y en proceso de publicación en la American Journal of Enology and Viticulture.

Anexo S.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

Analytical sensitivity of molecular techniques used for the detection of grapevine leafroll virus 3 (GLRaV-3), a comparative evaluation

Sández-Salas Odett Mariana*¹; García-Reséndiz Karen G. *¹; Carrillo-Tripp Jimena¹

¹Departamento de Microbiología. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Carretera Ensenada-Tijuana No.3918, Zona Playitas, Ensenada, Baja California, México, C.P. 22860.

*equal contribution

Correspondence: jcarrillo@cicese.mx

ABSTRACT

Grapevine leafroll disease (GLD) is one of the significant viral grapevine diseases, causing a substantial economic impact on this crop. GLD impairs the vines' general growth and vigor and decreases the berries' quality, with estimated global yield reductions of around 50%. GLD is caused by one or more grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs), GLRaV-3 being the most destructive and globally widespread. Sensitive and accurate diagnostics of GLRaV-3 are needed to prevent the introduction of infected vines to new vineyards and replace the infected ones. To that end, the effectiveness of different diagnostic techniques for the molecular detection of GLRaV-3 should be evaluated. This work compared the analytical sensitivity of loop-mediated amplification (LAMP), end-point PCR (epPCR), real-time quantitative PCR (qPCR), and digital PCR (dPCR) techniques for diagnosing GLRaV-3. The most sensitive techniques were dPCR and LAMP. These two methodologies require extreme

Figura 33. Artículo: Analytical sensitivity of molecular techniques used for the detection of grapevine leafroll virus 3 (GLRaV-3), a comparative evaluation. Al momento de la publicación de la tesis, el artículo estaba sometido y en proceso de revisión en la Archives of Phytopathology and Plant Protection.

Anexo T.

Article

Deep Learning-Based System for Early Symptoms Recognition of Grapevine Red Blotch and Leafroll Diseases and its Implementation on Edge Computing Devices

Carolina Lazcano-García¹, Karen Guadalupe García-Resendiz², Jimena Carrillo-Tripp², Everardo Inzunza-Gonzalez¹, Enrique Efrén García-Guerrero¹, David Cervantes-Vasquez¹, Jorge Galarza-Falfan¹, Cesar Alberto Lopez-Mercado¹, and Oscar Adrian Aguirre-Castro^{1*}

¹ Facultad de Ingeniería Arquitectura y Diseño, Universidad Autónoma de Baja California, Carr. Tijuana-Ensenada No. 3917, Ensenada 22860, Baja California,

² Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), Departamento de Microbiología, Baja California 22860, Mexico.

* Correspondence: oscar.aguirre@uabc.edu.mx;

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: In recent years, the agriculture sector has undergone a significant digital transformation, integrating artificial intelligence (AI) technologies to harness and analyze the growing volume of data from diverse sources. Machine learning (ML), a powerful branch of AI, has emerged as an essential tool for developing knowledge-based agricultural systems. Grapevine red blotch disease (GRBD) and grapevine leafroll disease (GLD) are viral infections that severely impact grapevine productivity and longevity, leading to considerable economic losses worldwide. Conventional diagnostic methods for these diseases are costly and time-consuming. To address this, ML-based technologies have been increasingly adopted by researchers for early detection by analyzing foliar symptoms linked to viral infections. This study focuses on detecting GRBD and GLD symptoms using Convolutional Neural Networks (CNNs) in computer vision. YOLOv5 outperformed other deep learning (DL) models tested, such as YOLOv3, YOLOv8, and ResNet-50, achieving 95.36% Precision, 95.77% Recall, and an F1-Score of 95.56%. These metrics underscore the model's effectiveness in accurately classifying grapevine leaves with and without GRBD and/or GLD symptoms. Furthermore, benchmarking was performed with two edge computer devices, with Jetson NANO obtaining the best cost-benefit performance. The findings support YOLOv5 as a reliable tool for early diagnosis, offering potential economic benefits for large-scale agricultural monitoring.

Keywords: grapevine; red blotch disease; leafroll disease; preventive diagnosis; artificial intelligence; computer vision; CNN; deep learning; ResNet; YOLO

Citation: Lazcano-García, C.; García-Resendiz, K. G.; Carrillo-Tripp, J.; Inzunza-Gonzalez, E.; García-Guerrero, E. E.; Cervantes-Vasquez, D.; Galarza-Falfan, J.; Lopez-Mercado C. A.; Aguirre-Castro, O. A. Deep Learning-Based System for Early Symptoms Recognition of Grapevine Red Blotch and Leafroll Diseases and its Implementation on Edge Computing Devices. *AgriEngineering* 2025, 1, 1–25. <https://doi.org/>

1. Introduction

In recent years, the agricultural sector has undergone a significant digital transforma-

Figura 34. Artículo: Deep Learning-Based System for Early Symptoms Recognition of Grapevine Red Blotch and Leafroll Diseases and its Implementation on Edge Computing Devices. Al momento de la publicación de la tesis, el artículo estaba sometido y en proceso de revisión en la revista *AgriEngineering*.

Anexo U.

Mendeley Data Find Research Data My Data ? KG

[Back to draft](#) You are previewing this dataset

Grapevine Virus and Symptom Database (GVS-DB)

Published: 28 January 2025 | Version 1 | Reserved DOI: 10.17632/wkbd3wsjpi.1
Contributors: Karen García, Jimena Carrillo Tripp

 **Embargo: 31 March 2025, 12:00 AM UTC**
This dataset will be made public in 62 days

This is a preview of the embargoed dataset.
As you are the owner, you can preview the dataset as it would appear after the embargo has lifted.

[Preview dataset](#)

What does under embargo mean?

When publishing a dataset, a user may choose to defer the date at which the data becomes available (for example, so that it is available at the same time as an associated article). This means that the description and files of that dataset are not publicly available until the embargo date is reached. Meanwhile, some other information about the dataset - such as the contributors, title, citation and associated articles become available immediately, prior to the embargo.

Draft version

Version 1 (Draft)

 Embargo date: 31 March 2025 (62 days)

Published: Draft

Reserved DOI: 10.17632/wkbd3wsjpi.1

Cite this dataset

García, Karen; Carrillo Tripp, Jimena (2025), "Grapevine Virus and Symptom Database (GVS-DB)", Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/wkbd3wsjpi.1

*DOI is reserved but not active

[Copy to clipboard](#)

Digital Commons
Data

[Home](#) | [About](#) | [Accessibility Statement](#) | [Archive Policy](#) | [File Formats](#) | [API Docs](#) | [OAI](#) | [Mission](#)
[Terms of Use](#) | [Privacy Policy](#) | [Help](#)

All content on this site: Copyright © 2025 Elsevier Inc, its licensors, and contributors. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training and similar technologies. For all open access content, the Creative Commons licensing terms apply.

Figura 35. Base de datos: Grapevine Virus and Symptom Database. doi: <https://doi.org/10.17632/wkbd3wsjpi.1>

Anexo V.

Tabla 23. Lista de abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza, por sus siglas en inglés
ANT	Ácidos nucleicos totales
CL	Nivel de confianza, por sus siglas en inglés
<i>co1</i>	Citocromo oxidasa c uno mitocondrial
CP	Proteína de la cápside, por sus siglas en inglés
cv.	Cultivar
gl	Grados de libertad
GLD	Enfermedad del enrollamiento de la hoja de la vid, por sus siglas en inglés
GLM	Modelo lineal generalizado, por sus siglas en inglés
GLRaV-1	Grapevine leafroll-associated virus 1
GLRaV-2	Grapevine leafroll-associated virus 2
GLRaV-3	Grapevine leafroll-associated virus 3
GLRaV-4	Grapevine leafroll-associated virus 4
GLRaVs	Virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid, por sus siglas en inglés
GRBD	Enfermedad de la mancha roja de la vid, por sus siglas en inglés
GRBV	Grapevine red blotch virus
GRSPaV	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus
GVA	Grapevine virus A
Hap	Haplotipo
<i>hsp70</i>	Proteína homóloga de choque térmico de 70 KDa, por sus siglas en inglés
IC	Intervalo de confianza, por sus siglas en inglés
<i>its1</i>	Espaciador transcrito interno 1, por sus siglas en inglés
<i>LAMP</i>	Amplificación isotérmica mediada en bucle, por sus siglas en inglés
MANOVA	Análisis multivariante de varianza, por sus siglas en inglés
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
NTC	Control sin plantilla, por sus siglas en inglés
p	Valor de probabilidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
PHV	Piojo harinoso de la vid
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, por sus siglas en inglés
RFU	Unidades relativas de fluorescencia, por sus siglas en inglés
RPA	Amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa, por sus siglas en inglés
RT	Transcripción inversa, por sus siglas en inglés
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, por sus siglas en inglés
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo