



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIAGNÓSTICO Y MANEJO INTEGRADO DE
Squash leaf curl virus y *Sclerotium rolfsii*
EN *Cucurbita* spp.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO DÍAZ NÁJERA

BAJO LA DIRECCIÓN DE: Dr. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2017.



Instituto de Horticultura

La presente tesis titulada **DIAGNÓSTICO Y MANEJO INTEGRADO DE *Squash leaf curl virus* y *Sclerotium rolfsii* EN *Cucurbita* spp.** fue realizada por **José Francisco Díaz Nájera**, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

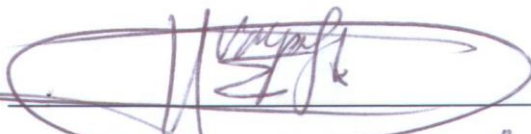
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



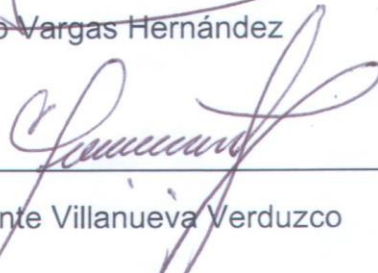
Dr. Jaime Sahagún Castellanos

CO-DIRECTOR:



Dr. Mateo Vargas Hernández

ASESOR:



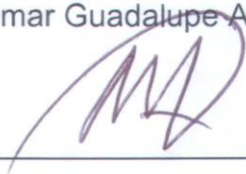
Dr. Clemente Villanueva Verduzco

ASESOR:



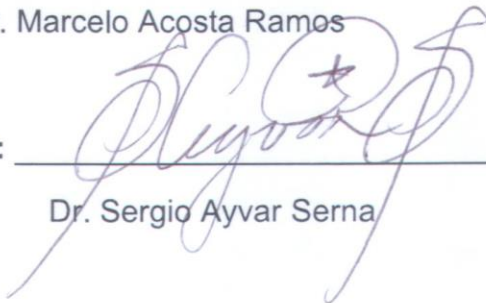
Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez

ASESOR:



Dr. Marcelo Acosta Ramos

LECTOR EXTERNO:



Dr. Sergio Ayvar Serna

Chapingo, Estado de México, diciembre de 2017.

DATOS BIOGRÁFICOS



José Francisco Díaz Nájera, es originario de Apipilulco, municipio de Cocula, zona norte del estado de Guerrero, nació el 28 de Agosto de 1988 en Iguala de la Independencia Gro., realizó sus estudios de nivel primaria en Apipilulco en la escuela “Mi patria es primero, Vicente Guerrero” (1994-2000), los estudios de secundaria los efectuó en el mismo lugar en la secundaria federal “Valentin Gómez Farias” (2000-2003), los estudios de bachillerato los llevó a cabo en el Centro de Bachilleratto Tecnológico Agropecuario 176-2 (2003-2006) de Apaxtla de Castrejón con sede en Cocula Gro., su licenciatura la cursó en el Centro de estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CEP-CSAEGRO) (2006-2011), los estudios de posgrado los realizó en la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, en el departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2012-2013). Los estudios de doctorado los llevó a cabo en el instituto de horticultura del departamento de fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en el posgrado en Horticultura (2014-2017).

DEDICATORIA

A Dios

A toda mi familia.

Especialmente a mi madre Anastacia la luz de mi vida.

Mis hermanas, María y Guadalupe mis verdaderos amigos.

A mis queridos sobrinos.

Los amo.

José Francisco

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, especialmente al **Departamento de Fitotecnia** y al programa de posgrado de **Horticultura**, por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica.

Al **Dr. Jaime Sahagún Castellanos**, por su distinguida y acertada dirección del presente trabajo, por el ejercicio inmortal de enseñar, por la confianza que depositó en mi persona, por su valiosa e incondicional orientación para mi formación académica y el buen consejo durante mis estudios de posgrado.

Al **Dr. Mateo Vargas Hernández**, por todo el apoyo sin fronteras y su valiosa dirección durante mis estudios de posgrado, por el ejercicio inmortal de enseñar, y tiempo dedicado al análisis de datos y trabajo de gabinete, su amistad y excelente calidad humana.

Al **Dr. Sergio Ayvar Serna** mi estimado amigo y mentor, por la nobleza que ocupa al ilustrarme, por su gran amistad sincera, por la confianza y por todo el apoyo brindado en la realización y conducción del trabajo de campo, por todos sus consejos, por compartir conmigo sus experiencias como investigador y sobre el cultivo de calabaza, por formar parte fundamental en mi formación académica, por ser mi líder mentor.

Al **Dr. Omar G. Alvarado Gómez**, por valiosa y distinguida colaboración para la realización del presente trabajo, por ser parte de mi consejo, por su invaluable amistad, por todo el apoyo incondicional brindado durante mi formación profesional, por todas sus atinadas sugerencias y aportaciones para la mejora del presente trabajo.

Al **Dr. Marcelo Acosta Ramos y Dr. Clemente Villanueva verduzco** por su y colaboración en este trabajo, por su esfuerzo, dedicación y tiempo brindados mismos que influyeron en la culminación del trabajo de investigación.

Al **Dr. Juan Martínez Solís** por todas las facilidades otorgadas durante mi estancia como estudiante para concluir con éxito mis estudios de posgrado.

A **Rogelio Deheza Méndez** y a la **Sra. Ma. de los Ángeles**, por su apoyo decidido y constante y su amistad.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la inestimable colaboración de las siguientes instituciones y entidades a las que deseamos expresar nuestro reconocimiento por la ayuda prestada:



Al CONACyT, por el apoyo económico brindado durante mis estudios de posgrado.



Al Instituto y coordinación de posgrado de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, por las facilidades otorgadas durante mis estudios de posgrado.



CSAEGRO

Al Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO), por las facilidades otorgadas para el establecimiento y desarrollo de mi investigación en su campo experimental.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo para el diagnóstico molecular.



Al laboratorio de diagnóstico Biociencia de Monterrey Nuevo León, por el apoyo para el diagnóstico molecular.

CONTENIDO

	Página
DATOS BIOGRÁFICOS.	iii
DEDICATORIAS.	iv
AGRADECIMIENTOS.	v
CONTENIDO.	vii
ÍNDICE DE FIGURAS EN EL TEXTO.	x
ÍNDICE DE CUADROS EN EL TEXTO.	xiii
RESUMEN GENERAL.	1
GENERAL ABSTRACT.	2
CAPÍTULO I. <i>Squash leaf curl virus</i> EN CALABAZA: DIAGNÓSTICO, DINÁMICA POBLACIONAL DEL VECTOR Y DISTRIBUCIÓN ESPACIO TEMPORAL DEL VIRUS.	3
RESUMEN.	4
INTRODUCCIÓN.	7
MATERIALES Y MÉTODOS.	10
Localización.	10
Detección del <i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV) y análisis filogenético.	10
Patogenicidad de SLCV.	11
Fluctuación poblacional de <i>B. tabaci</i> y análisis temporal de la severidad de SLCV.	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	13
Detección del SLCV y análisis filogenético.	13
Patogenicidad de SLCV.	15
Fluctuación poblacional de <i>B. tabaci</i> y análisis temporal de la severidad de SLCV.	17
CONCLUSIONES.	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	27
CAPÍTULO II. PRIMER REPORTE DE <i>Squash leaf curl virus</i> DETECTADO EN LA MALEZA <i>Proboscidea louisianica</i> EN MÉXICO. .	32
RESUMEN.	33
INTRODUCCIÓN.	35
MATERIALES Y MÉTODOS.	36
Colecta de material vegetal.	36
Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	36
Análisis filogenético.	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	37
Detección de begomovirus en <i>Proboscidea louisianica</i>	37

Análisis filogenético.	38
CONCLUSIONES.	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	42

CAPÍTULO III. DIAGNÓSTICO DE *Squash leaf curl virus* Y MANEJO INTEGRADO DE *Bemisia tabaci* EN *Cucurbita pepo*.

RESUMEN.	46
INTRODUCCIÓN.	48
MATERIALES Y MÉTODOS.	50
Sitio experimental.	50
Identificación morfológica de mosca blanca.	50
Detección, patogenicidad, análisis filogenético en vector y tejido vegetal de <i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV).	51
Manejo integrado en campo.	53
Material genético.	53
Insecticidas.	53
Tratamientos y diseño experimental.	53
Variables de estudio y análisis de datos.	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	56
Identificación morfológica de mosca blanca.	56
Detección del SLCV en el vector.	57
Patogenicidad.	57
Detección del SLCV en tejido vegetal.	57
Análisis filogenético.	58
Manejo integrado en campo.	60
Adultos y ninfas de <i>B. tabaci</i>	60
Porcentaje de reducción de moscas blancas (PRMB).	65
Porcentaje de incidencia y severidad del SLCV.	67
CONCLUSIONES.	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	79

CAPÍTULO IV. DIAGNÓSTICO Y MANEJO INTEGRADO DE LA PUDRICIÓN DE FRUTOS EN *Cucurbita argyrosperma* CAUSADA POR *Sclerotium rolfsii*.

RESUMEN.	88
INTRODUCCIÓN.	90
MATERIALES Y MÉTODOS.	91

Ensayo I. Control biológico <i>in vitro</i> del agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	93
Ensayo II. Control químico <i>in vitro</i> del agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	95
Ensayo III. Control integrado en campo del agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	96
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	98
Identificación morfológica.	98
Prueba de patogenicidad.	99
Identificación molecular.	99
Ensayo I. Control biológico <i>in vitro</i> de <i>Sclerotium rolfsii</i> agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	100
Ensayo II. Control químico <i>in vitro</i> de <i>Sclerotium rolfsii</i> , agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	103
Ensayo III. Control integrado en campo de <i>Sclerotium rolfsii</i> , agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	107
CONCLUSIONES.	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	114

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL TEXTO

Figura		Pág.
CAPÍTULO I.		
1	Localización del lote experimental y los afluentes de agua, Rio San Juan y Canal de agua de riego Las Juntas	10
2	Plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) naturalmente infectadas naturalmente con SLCV (a) mostrando un rizado severo de la hoja y (b) moteado clorótico.. . . .	12
3	Árbol filogenético obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio	14
4	Síntomas de SLCV. Hoja sana (izquierda) y plantas infectadas con <i>Squash leaf curl virus</i> (derecha).	16
5	Síntomas de SLCV. Planta sana (izquierda) y plantas infectadas con <i>Squash leaf curl virus</i> (derecha).	16
6	Número acumulado de mosquitas blancas en función del tipo de trampa.	18
7	Número de mosquitas blancas en función de la ubicación de las trampas.	19
8	Número de mosquitas blancas en función de la fecha de muestreo. .	19
9	Interrelación del porcentaje de severidad y la temperatura promedio en cada evaluación de la severidad del SLCV en plantas de calabaza var. Gray Zucchini, en diferentes evaluaciones en Cocula, Guerrero. Invierno de 2015.	21
10	Porcentaje de severidad del SLCV por cuadrante en plantas de calabaza var. Gray Zucchini, en diferentes evaluaciones en Cocula, Guerrero. Invierno de 2015.	22
11	Localización del lote experimental y los afluentes de agua, Rio San Juan y Canal de agua de riego Las Juntas.	23
12	Mapa de superficie de respuesta y plano de curvas de contorno o isolíneas, obtenidos mediante el método de kriging, de la dispersión y frecuencia de la distribución de severidad del SLCV en calabaza var. Gray Zucchini, Cocula, Guerrero. Invierno de 2015. Las áreas claras indican una menor intensidad de la severidad, mientras que las áreas oscuras señalan mayor severidad de la virosis. Cocula, Guerrero. Invierno, 2015.	24

Figura	CAPÍTULO II.	Pág.
1	(A) Hoja sana, (B, C y D) Síntomas de clorosis, deformación y mosaicos asociados con la infección por begomovirus en <i>Proboscidea louisianica</i>	39
2	Productos de amplificación de PCR de muestras de <i>Proboscidea louisianica</i> (1-6); testigo (plantas sanas) (7, 8 y 9); control positivo (10) y mpm (Marcador de peso molecular).	40
3	Árbol filogenético obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio.	40
CAPÍTULO III.		
1	Planta de calabaza (<i>C. pepo</i>) infectadas naturalmente con <i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV), mostrando un rizado severo de la hoja y moteado clorótico.	50
2	Características morfológicas de <i>Bemisia tabaci</i> , ninfa IV. A) Vista ventral B) Caracteres del Orificio vaciforme (Ov), seta caudal (SeC), língula (Li), opérculo (Op), surco caudal (SuC).	56
3	Síntomas de SLCV. Planta sana (superior izquierda) y plantas infectadas con <i>Squash leaf curl virus</i> (inferior izquierda, y superior e inferior derecha).	58
4	Árbol filogenético del SLCV en vector (A) y en tejido vegetal (B), obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio.	59
5	Porcentaje de reducción de moscas blancas <i>Bemisia tabaci</i> (PRMB) a través de genotipos, en los ciclos de cultivo 2014 y 2015, en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	66
6	Porcentaje de reducción de moscas blancas <i>Bemisia tabaci</i> (PRMB) a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015, genotipos y muestreos, en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	67

Figura	CAPÍTULO IV.	Pág.
1	<i>Sclerotium rolfsii</i> . A y B) Micelio, C y D) Fíbulas, E) Cultivo en PDA, F) Formación de esclerocios.	98
2	Prueba de patogenicidad. Fruto testigo (izquierda) y fruto inoculado (derecha).	99
3	Árbol filogenético obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Entre paréntesis, números de accesoión del GenBank. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio.	100
4	Inhibición de <i>Sclerotium rolfsii</i> para los diferentes tratamientos biológicos, en tres muestreos. T1=Testigo, T2= <i>Trichoderma fasciculatum</i> , T3= <i>T. virens</i> cepa G-41, T4= <i>T. reesei</i> , T5= <i>T. asperellum</i> cepa CSAEGro-1, T6= <i>T. asperellum</i> cepa CSAEGro-2, T7= <i>Trichoderma</i> sp. Santa Teresa.	102
5	Inhibición de <i>S. rolfsii</i> en los tratamientos del Ensayo II, en cuatro evaluaciones. T1= Testigo, T2= metalaxil, T3= pyraclostrobin, T4= tiofanato metílico, T5= quintozeno, T6= cyprodinil + fludioxonil, T7= procloraz.	105
6	Temperatura y precipitación de los ciclos de cultivo Primavera-Verano 2015 y 2016.	111

ÍNDICE DE CUADROS EN EL TEXTO

Cuadro		Pág.
CAPÍTULO I.		
1	Comparación de medias del número de moscas blancas en tipo de trampa y fecha de muestreo.	18
CAPÍTULO III.		
1	Características de los insecticidas utilizados.	53
2	Tratamientos evaluados en condiciones de campo durante los ciclos 2014 y 2015, contra <i>Bemisia tabaci</i> en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	54
3	Análisis individual por año y genotipo, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del número de adultos (AMB) y ninfas (NMB) de <i>Bemisia tabaci</i> , en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	62
4	Análisis combinado a través de genotipos por año, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, sobre el número de adultos (AMB) y ninfas (NMB) de <i>Bemisia tabaci</i> , en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	63
5	Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015, genotipos y muestreos, sin incluir al tratamiento testigo, sobre el número de adultos (AMB) y ninfas (NMB) de <i>Bemisia tabaci</i> , en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	64
6	Análisis individual por año y genotipo, del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del porcentaje de control de <i>Bemisia tabaci</i> en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	65
7	Análisis individual por año y genotipo, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) del Squas leaf curl virus en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	69
8	Análisis combinado a través de genotipos por año, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) del Squas leaf curl virus en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	70
9	Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015 y genotipos, sin incluir al tratamiento testigo, del porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) del Squas leaf curl virus en el cultivo de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).	71

Cuadro	CAPÍTULO IV.	Pág.
1	Tratamientos biológicos evaluados “ <i>in vitro</i> ” contra el agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	94
2	Tratamientos químicos evaluados “ <i>in vitro</i> ” contra el agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.	95
3	Tratamientos evaluados en condiciones de campo contra el agente causal de la pudrición de frutos en calabaza: <i>Trichoderma</i> más fungicida.	97
4	Valores promedios del diámetro (cm) de la colonia de <i>Sclerotium rolfsii</i> , en el Ensayo I de antibiosis <i>in vitro</i> mediante la técnica del celofán.	101
5	Valores promedios del diámetro de la colonia de <i>Sclerotium rolfsii</i> , en el Ensayo II de efecto <i>in vitro</i> , usando fungicidas químicos.	104
6	Análisis combinado a través de los ciclos 2015 y 2016, de los tratamientos incluyendo cepas de <i>Trichoderma</i> spp., y fungicidas, sobre la obtención de frutos sanos, dañados y rendimiento de semilla, en el cultivo de calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i>).	108
7	Análisis de la estructura factorial sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2015 y 2016, cepas de <i>Trichoderma</i> spp., y fungicidas, sobre la obtención de frutos sanos, dañados y rendimiento de semilla, en el cultivo de calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i>).	112

RESUMEN GENERAL

DIAGNÓSTICO Y MANEJO INTEGRADO DE *Squash leaf curl virus* Y *Sclerotium rolfsii* EN *Cucurbita* spp.

El monitoreo y diagnóstico correcto de plagas y patógenos que causan enfermedades en plantas, son factores clave para diseñar y planificar un manejo integrado. Esta investigación tuvo como objetivos i) identificar la especie de mosca blanca vector de virus, ii) diagnosticar con técnicas moleculares, de patogenicidad y filogenia al virus asociado al rizado de la hoja de calabaza, al vector y a la maleza *Proboscidea louisianica*, iii) estudiar la transmisión y patogenicidad del virus en calabaza, iv) conocer la incidencia de mosca blanca en el cultivo, v) evaluar el efecto de diferentes grupos de insecticidas sobre mosca blanca, incidencia y severidad de virosis en los genotipos Depredador y Grey Zucchini en dos años de cultivo, vi) identificar al agente causal de la pudrición de frutos en calabaza, evaluar *in vitro* y en campo cepas de *Trichoderma* spp. y fungicidas durante dos ciclos consecutivos de cultivo. Los resultados del presente estudio fueron la identificación del vector de virus *Bemisia tabaci*. Los análisis moleculares y filogenia corroboraron que el begomovirus Squash leaf curl virus (SLCV) estuvo presente en *B. tabaci*, cultivo de calabaza y el reservorio natural *P. louisianica*. *B. tabaci* transmite SLCV el cual induce retraso del crecimiento y enrollamiento severo de hojas en calabaza. La incidencia de *B. tabaci* se manifestó durante toda la fenología del cultivo y se relacionó con la temperatura. Durante 2014 y 2015, en los genotipos Depredador y Grey Zucchini, la aplicación de insecticidas del grupo neonicotinoides, botánicos, aceites parafínicos, cetógenos y piretroides, solos y mezclados afectaron adultos y ninfas de *B. tabaci*, provocando menor incidencia y severidad de virosis. La morfología, patogenicidad y secuenciación, permitieron identificar a *Sclerotium rolfsii*, causante de pudrición de frutos de calabaza. *Trichoderma virens* G-41, *T. asperellum* CSAEGro-1, metalaxil, pyraclostrobin, quintozeno, cyprodinil + fludioxonil y procloraz, presentaron efecto fungicida *in vitro* sobre el patógeno. En campo, *T. asperellum* CSAEGro-1 + metalaxil y *T. asperellum* + cyprodinil + fludioxonil, protegieron la sanidad de frutos e incrementaron el rendimiento de semilla.

Palabras clave: *Cucurbita*, identificación, begomovirus, *Bemisia tabaci*, hongo, pudrición, control.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: José Francisco Díaz-Nájera.

Director de tesis: Dr. Jaime Sahagún-Castellanos.

GENERAL ABSTRACT

DIAGNOSIS AND INTEGRATED MANAGEMENT OF *Squash leaf curl virus* AND *Sclerotium rolfsii* IN *Cucurbita* spp.

The correct monitoring and diagnosis of pests and pathogens that cause diseases in plants are key factors to design and plan integrated management. This research aimed to i) identify the species of whitefly virus vector, ii) diagnose with molecular techniques, pathogenicity and phylogeny the virus associated with the curling of the pumpkin leaf, the vector and the weeds *Proboscidea louisianica*, iii) study the transmission and pathogenicity of the virus in pumpkin, iv) know the incidence of whitefly in the crop, v) evaluate the effect of different groups of insecticides on whitefly, incidence and severity of virosis in the genotypes Depredator and Gray Zucchini in two years of crop, vi) identify the causal agent of fruit rot in squash, evaluate *in vitro* and in field strains of *Trichoderma* spp. and fungicides during two consecutive cycles. The results of the present study was the identification of the *Bemisia tabaci* virus vector. Molecular analysis and phylogeny corroborated that the Squash leaf curl virus begomovirus (SLCV) was present in *B. tabaci*, pumpkin culture and the *P. louisianica* natural reservoir. *B. tabaci* transmits SLCV which induces growth retardation and severe leaf curl in pumpkin. The incidence of *B. tabaci* was manifested throughout the crop phenology and was related to temperature. During 2014 and 2015, in the genotypes Depredator and Gray Zucchini, the application of insecticides of the group neonicotinoides, botanicals, paraffinic oils, ketonols and pyrethroids, alone and mixed affected adults and nymphs of *B. tabaci*, causing lower incidence and severity of virosis. The morphology, pathogenicity and sequencing allowed identifying *Sclerotium rolfsii*, which causes rotting of pumpkin fruits. *Trichoderma virens* G-41, *T. asperellum* CSAEGro-1, metalaxyl, pyraclostrobin, quintozone, cyprodinil + fludioxonil and prochloraz, presented an *in vitro* fungicide effect on the pathogen. In the field, *T. asperellum* CSAEGro-1 + metalaxil and *T. asperellum* + cyprodinil + fludioxonil, protected fruit health and increased seed yield.

Keywords: *Cucurbita*, identification, begomovirus, *Bemisia tabaci*, fungus, rot, control.

Thesis: Doctor of Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: José Francisco Díaz-Nájera.

Advisor: Dr. Jaime Sahagún-Castellanos.

CAPÍTULO I.

SQUASH LEAF CURL VIRUS EN CALABAZA: DIAGNÓSTICO, DINÁMICA POBLACIONAL DEL VECTOR Y DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL VIRUS

CAPÍTULO I.

SQUASH LEAF CURL VIRUS EN CALABAZA: DIAGNÓSTICO, DINÁMICA POBLACIONAL DEL VECTOR Y DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL VIRUS

José F. Díaz-Nájera

RESUMEN

El género begomovirus causa pérdidas significativas en las cucurbitáceas. Es transmitido por la mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Genn. Para diseñar un plan de manejo de este insecto-vector es importante tener un diagnóstico preciso de los virus, y conocer la dinámica poblacional, espacial y temporal del vector para entender la incidencia y severidad de virosis en campo. Los objetivos del presente estudio fueron: i) conocer la etiología de la enfermedad del virus rizado de la hoja de calabaza, ii) estudiar la dinámica de población, comparando la efectividad de trampas amarillas pegajosas contra charolas amarillas y determinar el efecto del sitio de ubicación de las trampas, en el monitoreo de *B. tabaci* durante el ciclo de cultivo, y iii) estudiar la distribución espacio-temporal y severidad de virosis en calabaza. El presente estudio se realizó en un lote experimental de 2,880 m² cultivado con calabacita (*Cucurbita pepo* L.) var. Gray Zucchini, establecido en el campo experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Se colectaron muestras de hojas con síntomas de virosis para la extracción del ADN y realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los oligonucleótidos genéricos para begomovirus, y después de la secuenciación de productos de PCR, se realizó un análisis filogenético. También se llevó a cabo una prueba de transmisión del virus encontrado mediante mosquita blanca en calabacita en condiciones controladas. La dinámica poblacional de *B. tabaci* se determinó utilizando trampas amarilla pegajosa y charola amarilla con agua que se distribuyeron en el lote experimental. La severidad de virosis se midió con una escala visual basada en la sintomatología, y se obtuvo el porcentaje de severidad calculando el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). El

análisis de PCR, la secuenciación y la filogenia, revelaron que las muestras de hojas con síntomas de virosis obtenidas en el Valle de Cocula, Guerrero México, estaban infectados con el Squash Leaf Curl Virus (SLCV) (accesión KX620945.1 DAAV-1). Éste es transmitido por *B. tabaci* e induce retraso grave del crecimiento y severo enrollamiento de hojas de las plantas de calabaza. El tipo de trampa y la fecha de muestreo influyen en la dinámica poblacional de *B. tabaci*. La trampa pegajosa fue más efectiva que la de charola con agua, para medir la fluctuación poblacional del vector. El sitio de ubicación de la trampa no influyó en el monitoreo del insecto. La incidencia de *B. tabaci* se manifestó en todas las etapas fenológicas del cultivo y se relacionó con la temperatura. La severidad de SLCV exhibió una tendencia creciente y se asoció con la temperatura.

Palabras clave: *Geminivirus*, *Cucurbita pepo*, *Bemisia tabaci*, severidad.

SQUASH LEAF CURL VIRUS IN PUMPKIN: DIAGNOSIS, VECTOR POPULATION DYNAMICS AND SPACE-TEMPORAL DISTRIBUTION OF VIRUS

José F. Díaz-Nájera

ABSTRACT

The genus begomovirus causes significant losses in cucurbits. It is transmitted by the white fly, *Bemisia tabaci* Genn. To design a management plan for this insect-vector it is important to have an accurate diagnosis of the viruses, and to know the population, spatial and temporal dynamics of the vector to understand the incidence and severity of virus in the field. The objectives of the present study were: i) to know the etiology of the curly virus disease of the zucchini leaf, ii) to define the population dynamics, comparing the effectiveness of sticky yellow traps against yellow trays and to determine the effect of the site of location of the traps, in the monitoring of *B. tabaci* during the cultivation cycle, and iii) studying the spatio-temporal distribution and severity of virosis in squash. The present study was carried out in an experimental plot of 2,880 m² cultivated with zucchini (*Cucurbita pepo* L.) var. Gray Zucchini, established in the experimental field of the Higher Agricultural College of the of Guerrero State. Leaf samples with virosis symptoms were collected for DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR), with the generic oligonucleotides for begomovirus, and after the sequencing of PCR products, a phylogenetic analysis was performed. A test for the transmission of the virus found by whitefly in zucchini under controlled conditions was also carried out. The population dynamics of *B. tabaci* was determined using sticky yellow traps and yellow tray with water which were distributed in the experimental lot. The severity of virosis was measured with a visual scale based on the symptomatology, and the percentage of severity was obtained by calculating the area under the curve of the progress of the disease (ABCPE). PCR analysis, sequencing and phylogeny, revealed that leaf samples with symptoms of virosis obtained in the Cocula Valley, Guerrero, Mexico, were infected with the Squash Leaf Curl Virus (SLCV) (accession KX620945.1 DAAV-

1). It is transmitted by *B. tabaci* and induces severe growth decrease and severe leaf curl of pumpkin plants. The type of trap and the date of sampling influence the population dynamics of *B. tabaci*. The sticky trap was more effective than the tray with water, to measure the population fluctuation of the vector. The location site of the trap did not influence the monitoring of the insect. The incidence of *B. tabaci* was manifested in all the phenological stages of the crop and was related to temperature. The severity of SLCV exhibited an increasing trend and was associated with temperature.

Key words: Geminivirus, *Cucurbita pepo*, *Bemisia tabaci*, severity.

INTRODUCCIÓN

La familia *Cucurbitaceae* comprende muchos cultivos, incluidos pepinos, calabazas, luffas, melones y sandías (Pessarakli, 2016). Las calabacines y calabazas (*Cucurbita* spp. fam. *Cucurbitaceae*) son las principales especies hortícolas que se cultivan desde regiones frescas hasta tropicales. La especie *Cucurbita pepo* es de las más ampliamente cultivadas, tiene un alto impacto económico y se consume principalmente como verdura fresca porque el fruto es de alto valor nutritivo. Además en algunos lugares se aprovecha para decoración. Las semillas se consumen en algunas regiones y producen aceite que es altamente valorado en Europa central (Paris *et al.*, 2012; Paris y Maynard, 2008). Existen plagas y enfermedades que afectan significativamente el rendimiento y la calidad del fruto de calabaza. Entre estas enfermedades, las virales son las más importantes, porque causan fuertes pérdidas económicas. Hay más de 35 virus que se han identificado en plantas de la familia *Cucurbitaceae* (Ozaslan *et al.*, 2006).

Los geminivirus (familia *Geminiviridae*) son virus con un genoma de ADN monocatenario circular encapsulado dentro de partículas isométricas herméticas. Se agrupan en los géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulovirus*, *Curtovirus*,

Eragrovirus, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topucovirus* y *Turncurtovirus*. Los criterios de delimitación incluyen el vector, el rango del huésped y la organización del genoma (Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2017).

Los miembros del género begomovirus, transmitidos por mosquitas blancas, tienen genomas con componentes simples o bipartitos (ADNs A y B) e infectan plantas dicotiledóneas. El ADN A codifica la proteína de la cubierta (AV1), así como las proteínas requeridas para la replicación (AC1), la regulación de genes (AC2) y la mejora de la replicación (AC3). El ADN B es esencial para la producción de síntomas de enfermedades, pero no tiene ningún papel en la replicación del ADN (Rosen *et al.*, 2015). Los dos productos génicos (BV1 y BC1) codificados por este componente están involucrados en la propagación del virus en toda la planta, la producción de síntomas y el rango de hospedantes (Ramesh *et al.*, 2017).

Durante las tres décadas más recientes, numerosos begomovirus transmitidos por mosca blanca han emergido como patógenos devastadores, particularmente en trópicos y subtrópicos. Causan enormes pérdidas económicas y amenazan la producción en diversos cultivos (Al-Musa *et al.*, 2008). La enfermedad del rizado foliar de la calabaza (SLCV) se observó por primera vez en calabaza en California durante 1977 y 1978 y, al mismo tiempo, en cultivos de calabaza en Búfalo, Arizona (Flock y Mayhew, 1981; Rosemeyer *et al.*, 1986).

La incidencia de SLCV estaba restringida a América Central y América del Norte; sin embargo, en 2003, se realizó el primer registro de su aparición en el hemisferio occidental, más precisamente, fue en Israel, donde causó epidemias severas y su incidencia fue cerca de 100 % (Antignus *et al.*, 2003). Posteriormente, Idris *et al.* (2006) informaron que SLCV-EG causó síntomas severos en los cultivos de calabaza en Egipto. Después, agricultores en el valle del Jordán observaron síntomas parecidos a los provocados por geminivirus en plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) (Al-Musa *et al.*, 2008). Recientemente, el SLCV se reportó en Palestina por Ali-Shtayeh *et al.* (2014) por causar daños en

plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*), sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) y pepino (*Cucumis sativus* L.).

Las actividades de monitoreo y vigilancia han jugado un papel clave para el manejo de begomovirus, porque a medida que se identifican las áreas recién afectadas, se facilita la focalización de las medidas de control. Asimismo sirven para determinar los patrones de propagación de enfermedades y predecir las áreas que podrían ser afectadas en el futuro (Szyniszewska *et al.*, 2017). Como la mayoría de los insectos, *B. tabaci* se agrupa tanto en hojas individuales como en las plantas en todas las etapas del cultivo (Naranjo, 1996). Para determinar la agregación y comportamiento de las poblaciones de *B. tabaci* dentro de los campos de cultivo, se necesita comprender con precisión la dinámica espacial y temporal del insecto (Naranjo *et al.*, 2010; Polston *et al.*, 1996). Es importante determinar la estructura espacial y temporal de las poblaciones de plagas y estudiar los patrones espaciales para una mejor comprensión de la dinámica de las plagas y definir los planes de muestreo (Naranjo, 1996). Debido a la importancia de *B. tabaci* y la transmisión del SLCV como factores limitantes en la producción comercial de calabaza, es necesario comprender mejor la dinámica de población y la severidad del virus SLCV.

Por lo anteriormente descrito, la presente investigación tuvo como objetivos: i) investigar la etiología de la enfermedad provocada por el virus rizado de la hoja de calabaza, ii) conocer la dinámica de la población, la efectividad de trampas amarillas pegajosas en relación a charolas amarillas y determinar el efecto del sitio de ubicación de las trampas, en el monitoreo de *B. tabaci* durante el ciclo de cultivo, y iii) estudiar la distribución espacio-temporal y severidad de virosis en calabaza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

EL presente estudio se realizó en un lote experimental cultivado con calabacín var. Gray Zucchini, establecido en el Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro), en el municipio de Cocula, Guerrero, en la zona Norte del Estado, localizado entre las coordenadas 18°26'27.20" latitud Norte y -99°65'07.98" longitud Oeste, a 635 msnm (Díaz *et al.*, 2015). El lote experimental tuvo en ambos extremos afluentes de agua, el Río San Juan y el Canal de agua de riego Las Juntas (Figura 1).



Figura 1. Localización del lote experimental y los afluentes de agua, Río San Juan y Canal de agua de riego Las Juntas.

Detección del Squash leaf curl virus (SLCV) y análisis filogenético

Se colectaron muestras de hojas sintomáticas de calabaza para la detección e identificación del virus (Figura 2). De las hojas de calabacín se extrajo el DNA con el DNeasy Plant Kit (QIAGEN®). Los oligonucleótidos degenerados prV324

(5-gccyatrtaayagraagccmag-3') y CoPR (5-gangsatghgtrcadgcatata-3') se utilizaron para detectar begomovirus en general y SLCV en particular en las hojas sintomáticas; estos cebadores se unen al DNA de begomovirus y amplifican fragmentos de aproximadamente 576 pb (Wyatt y Brown, 1996; Zhang *et al.*, 2008). Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo un programa con una temperatura inicial de 94 °C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C 60 seg, 50 °C 45 seg, y 72 °C 45 seg; con una temperatura de extensión final de 72°C por 6 min. Para la amplificación del DNA se utilizó un termociclador Thermo™ (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y la visualización de los productos amplificados se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % a 62 volts por 5 minutos seguido de 100 volts por 40 minutos, y se observó en un transiluminador de luz UV^{MR} (Labnet, Edison, NJ). Se secuenciaron muestras representativas de los productos de PCR, y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank.

Las secuencias consenso se editaron y ensamblaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004). En el análisis evolutivo, todas las secuencias consenso se alinearon con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las reconstrucciones filogenéticas de los datos se realizaron con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting, opción de búsqueda (nivel=1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones) y los espacios faltantes se consideraron como deleciones completas.

Para calcular los valores de confianza de los clados del árbol, se realizó una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). La secuencia obtenida se depositó en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Patogenicidad de SLCV

La prueba de transmisión de virus por mosquita blanca (*B. tabaci*) en calabacita se realizó en el periodo febrero-marzo del 2015. Se efectuó en condiciones controladas utilizando jaulas preparadas con dos vasos de poliestireno expandido

de 1 litro de capacidad, con ventanas cubiertas con tela de organza. La colecta de mosquita blanca se llevó a cabo mediante un succionador bucal en un lote de calabacita con síndromes virales, el 15 de marzo. Para conocer la patogenicidad del virus se introdujeron 30 mosquitas blancas por jaula, las cuales contenían una planta de calabacita var. Gray Zucchini. En cinco jaulas se introdujeron mosquitas blancas y dos se dejaron como testigo. Se llevaron a cabo revisiones periódicas durante 21 días para detectar la posible aparición de síntomas virales. De muestras de hojas con el síndrome de virosis obtenidas de las jaulas, se extrajo y amplificó DNA usando los iniciadores degenerados prV324/CoPR.



Figura 2. Plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) naturalmente infectadas naturalmente con SLCV (a) mostrando un rizado severo de la hoja y (b) moteado clorótico.

Fluctuación poblacional de *B. tabaci* y análisis temporal de la severidad de SLCV

Para medir la dinámica poblacional de la mosquita blanca y estudiar la distribución espacial de la severidad de SLCV, se estableció un cultivo de

calabacín var. Gray Zucchini en 2,880 m², se realizó un censo de 20 cuadrantes con 10 surcos y 20 plantas por surco.

Para estudiar la dinámica poblacional de *B. tabaci* se distribuyeron trampas en el cultivo en los cuatro puntos cardinales y en el centro del lote mediante el diseño experimental de bloques completos al azar con dos repeticiones. Las trampas tenían las características siguientes: a) Trampa amarilla pegajosa. Se preparó con un soporte metálico de 1 m de altura y 1 cm de diámetro, provisto de una lámina de 18 × 24 cm y b) Trampa de charola amarilla con agua. Se utilizó una charola de 17 y 12 cm de diámetros superior e inferior, y 10 cm de profundidad, con capacidad de almacenar 1 L de agua. Las trampas se inspeccionaron cada cuatro días. Se contabilizó el número de insectos adultos de áfidos, moscas blancas y trips. Los datos de estas variables se analizaron con el programa estadístico SAS 9.4 (SAS, 2016).

Para evaluar la severidad de virosis, se utilizó la escala de Van Der Plank (1963); se realizaron cinco evaluaciones a intervalos de ocho días. Los datos de porcentaje de severidad se analizaron en un programa de análisis de área bajo la curva (ABCPE) (Campbell y Madden, 1990), para determinar el efecto que genera este problema fitopatológico durante todo el ciclo de cultivo de calabacita y comparar la epidemia de la virosis. El análisis de los datos incluyó mapas de la distribución espacial, como superficies de respuesta y curvas de contornos (isolíneas) obtenidos mediante el método de interpolación kriging, usando el programa estadístico SAS 9.4 (SAS, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección del SLCV y análisis filogenético

Se observaron síntomas severos de enrollamiento de la hoja de calabaza y los análisis de PCR y secuenciación revelaron que las muestras de hojas con síntomas de virosis obtenidas en el Valle de Cocula, Guerrero México, estaban infectados con SLCV.

La secuencia del genoma del virus obtenida en el presente trabajo fue depositada en el Banco de Genes (Genbank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (accesión KX620945.1 DAAV-1). El-DougDoug *et al.* (2009) identificaron al SLCV en *Cucurbita pepo* var. *eskandrani*, utilizando los mismos primers que en la presente investigación, reportaron que los DNA amplificados tuvieron una talla de 480 pb. El análisis filogenético mostró que el SLCV encontrado en Guerrero, México estuvo estrechamente relacionado con las accesiones de SLCV encontradas en El Cairo (DQ285019) y El Valle Imperial de California (USA) (DQ285016) con valor bootstrap del 96 %; además estas accesiones de origen americano y la de Medio Oriente, se diferenciaron del grupo de accesiones asiáticas (AM260206, EU47910 y EFQ99774) (74 %) (Figura 3).

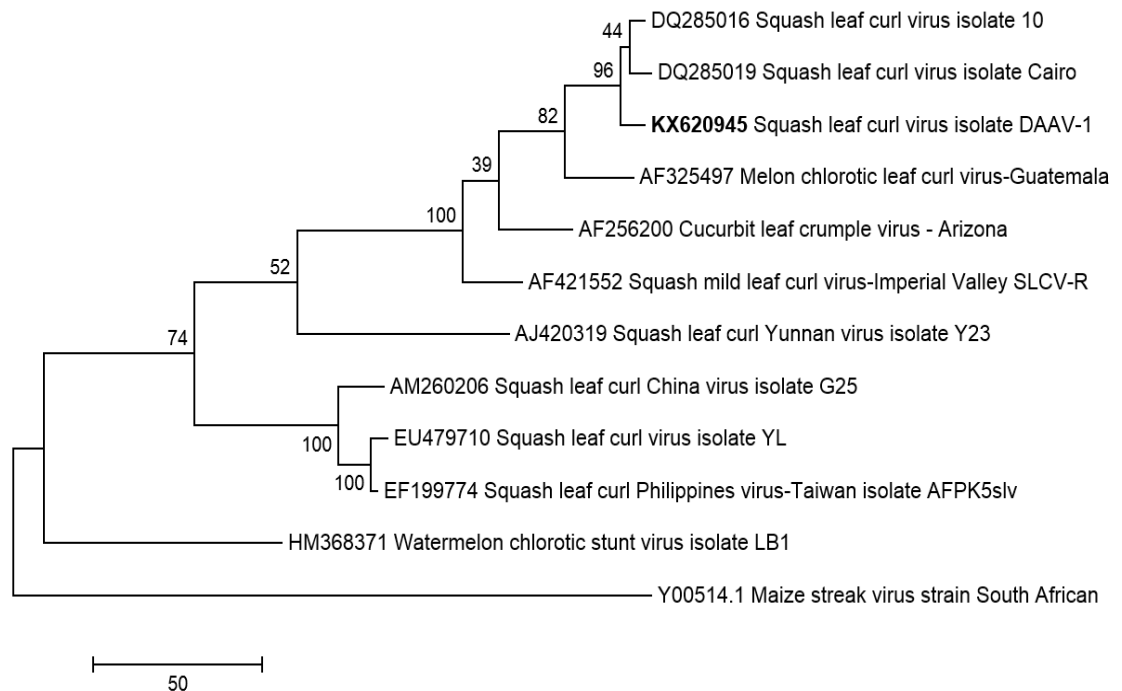


Figura 3. Árbol filogenético obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio.

Patogenicidad de SLCV

Los resultados de esta prueba indicaron que el SLCV transmitido por mosquita blanca en calabacita var. Gray Zucchini es patogénico; los síntomas se manifestaron a los 8 días después de la introducción de mosquita blanca a las jaulas.

La infección por SLCV causa el enrollamiento de hojas, retraso del crecimiento, epinastia, clorosis intervenal y moteado de hojas, síndrome que coincide con los descritos por Sufrin y Lapidot (2011) (Figura 4), así como por Idris *et al.* (2006) y Al-Musa *et al.* (2008) quienes estudiando el *squash leaf curl virus* (SLCV) en cucurbitáceas en Jordania y Egipto; encontraron que las hojas infectadas fueron de menor tamaño y provocaron un 40 % de reducción en el crecimiento de las plantas (Figura 5).

Asimismo, Sobh *et al.* (2012) reportaron que la infección de SLCV provocó síntomas severos de enrollamiento de hojas de calabaza (cv. Camelia F1), a las 2 semanas después de la inoculación; es decir, se presentaron en el doble de tiempo en comparación con los resultados del presente ensayo. Además se determinó que el producto amplificado del SLCV obtenido de hojas de las plantas utilizadas en la prueba de patogenicidad, presentaba una talla de 464 pb; la secuencia se depositó en el Banco de Genes (Genbank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (accesión KX620948.1 DAAV-2).

Estos resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con lo reportado por Taha *et al.* (2016) quienes confirmaron que el virus SLCV, se transmite por mosquita blanca e induce un severo retraso del crecimiento, enchinamiento de hojas y causa pérdidas severas en la producción de cucurbitáceas.

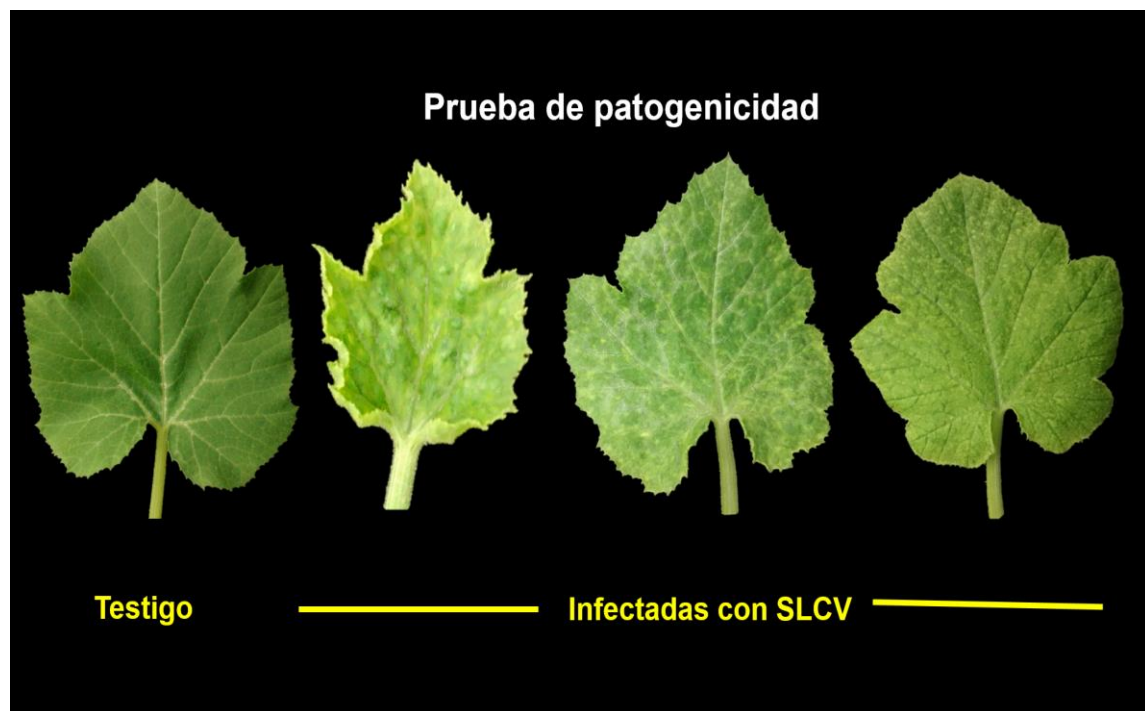


Figura 4. Síntomas de SLCV. Planta sana (izquierda) y plantas infectadas con *Squash leaf curl virus* (derecha).

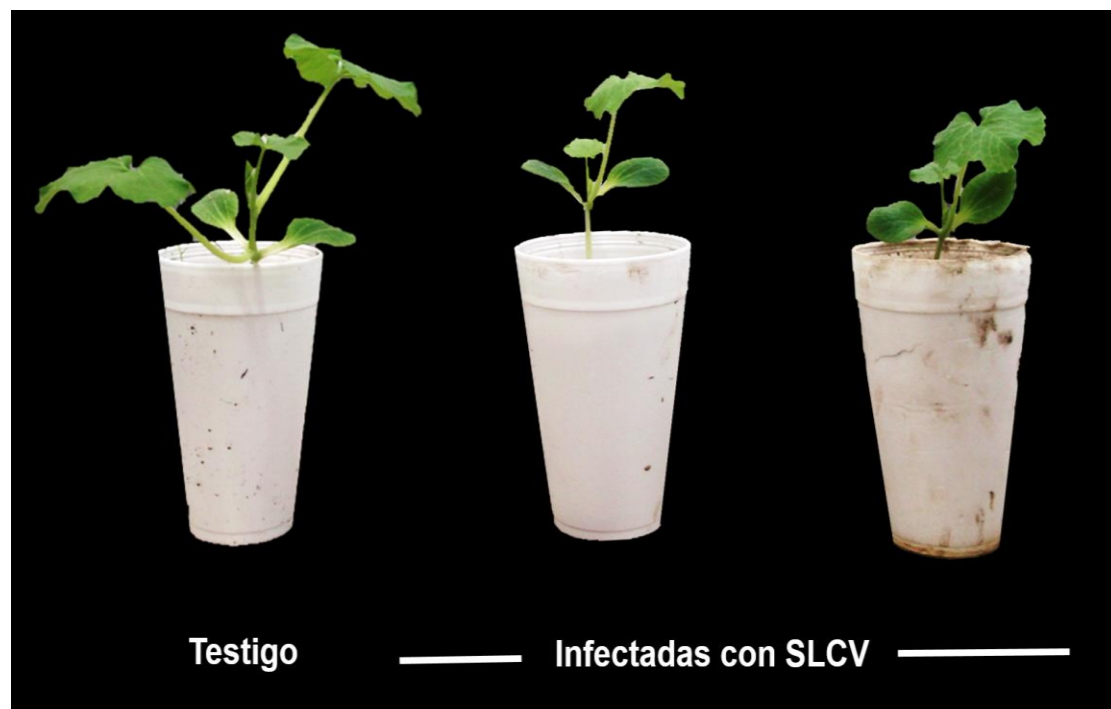


Figura 5. Síntomas de SLCV. Planta sana (izquierda) y plantas infectadas con *Squash leaf curl virus* (derecha).

Fluctuación poblacional de *B. tabaci* y análisis temporal de la severidad de SLCV

Los números de adultos de mosca blanca presentaron diferencias altamente significativas en la mayoría de los muestreos, por efecto del tipo de trampa. En todas las fechas de muestreo la trampa pegajosa fue más efectiva que la de charola con agua, para capturar moscas blancas (Cuadro 1), cuyos promedios fluctuaron de 25 (muestreo 2) a 379 (muestreo 11). Al final, tomando en cuenta el acumulado de todos los muestreos, se encontró que en la trampa pegajosa se capturaron 2,082 adultos (Figura 6), en comparación con la trampa tipo charola (416).

La ubicación de la trampa sólo influyó significativamente en la cantidad de insectos capturados en los muestreos 1, 3 y 6. En los primeros muestreos (1 y 3), los promedios indican que las mayores poblaciones de moscas se registraron en el sitio Oeste; sin embargo, en las evaluaciones finales, la mayor densidad de insectos tendió a presentarse en las trampas del Este y Norte (Cuadro 2). Al final del ensayo, la cantidad acumulada más alta de *B. tabaci* se obtuvo en el lado Este, con 538 individuos (Figura 7); el menor valor fue de 443 y se encontró en el sitio Sur. Se presentaron diferencias significativas entre las fechas de muestreo (Figura 8), porque las poblaciones de insectos variaron en un rango de 26 (fecha 2) a 437 (fecha 11).

Los programas de manejo de plagas deben basarse en el conocimiento preciso de los principales factores responsables de los cambios en la dinámica de la población insectil objetivo. Los parámetros del ciclo biológico estimados en diferentes condiciones bióticas o abióticas proporcionan las herramientas básicas para comprender los cambios y comportamiento de las especies de plagas (Southwood, 1978). *B. tabaci* es un organismo poiquilotermo (es decir, la temperatura influye en el ciclo biológico); es importante tener en cuenta este factor para poder explicar la ecología de la población. Drost *et al.* (1998) informaron que los parámetros que influyen en la biología de *B. tabaci* incluyen las temperaturas, plantas hospederas y biotipos.

Cuadro 1. Comparación de medias del número de moscas blancas en tipo de trampa y fecha de muestreo.

Muestreo	Número de mosquitas	
	Charola amarilla con agua	Trampa pegajosa
1	0 b [†]	7.4 a
2	1 a	25 a
3	42 a	66 a
4	44 a	96 a
5	43 b	146 a
6	52 b	156 a
7	60 b	214 b
8	15 b	298 a
9	62 b	224 a
10	16 b	236 a
11	58 b	379 a
12	12 b	168 a

[†]Valores con letras iguales en la misma hilera no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

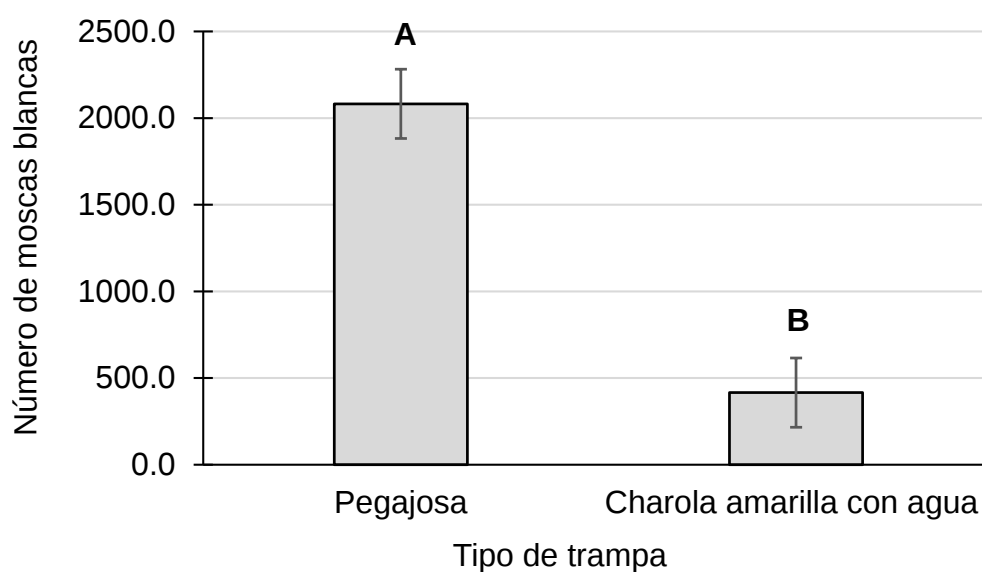


Figura 6. Número acumulado de mosquitas blancas en función del tipo de trampa.

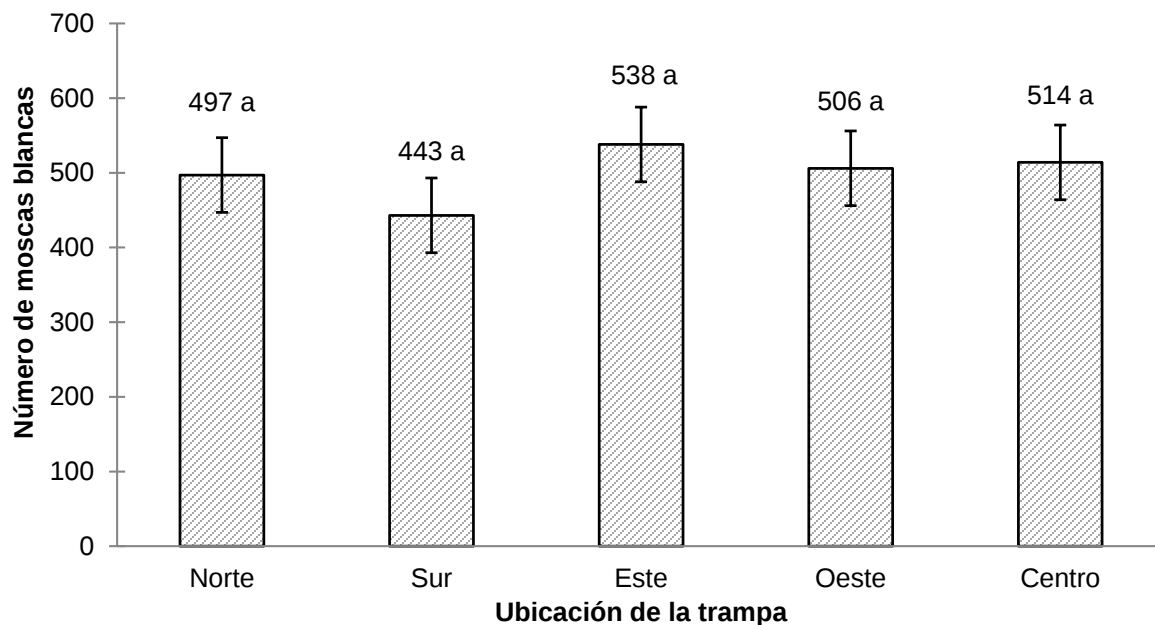


Figura 7. Número de mosquitos blancos en función de la ubicación de las trampas.

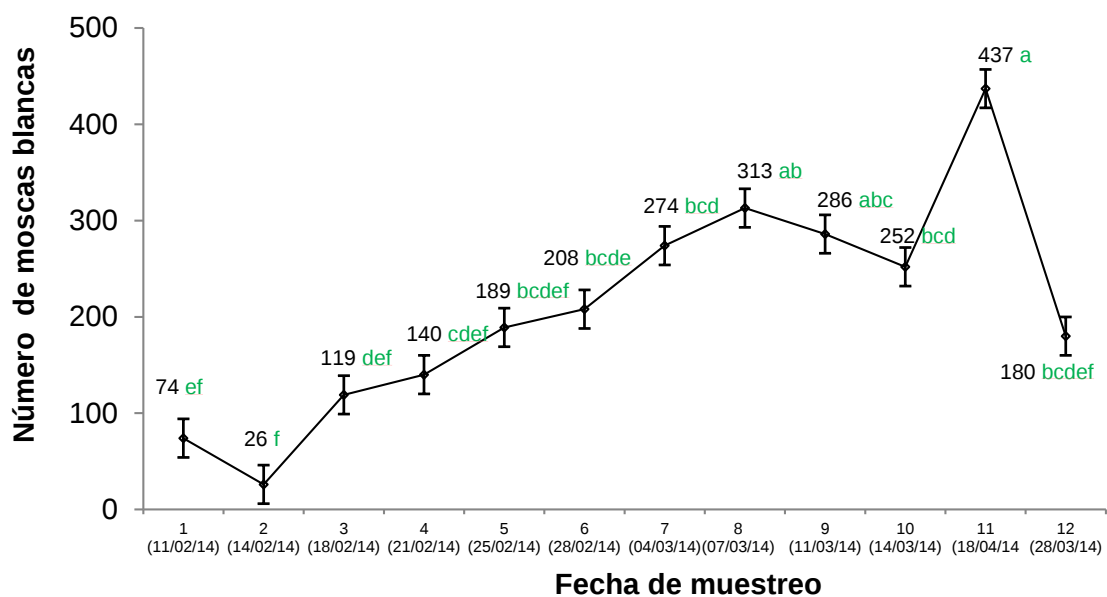


Figura 8. Número de mosquitos blancos en función de la fecha de muestreo.

Los resultados obtenidos corroboran lo que reportó Curnutte *et al.* (2014) quienes evaluaron el efecto de la temperatura sobre el comportamiento biológico de *B. tabaci*; reportaron que la oviposición, la supervivencia de las ninfas y la reproducción fueron afectadas significativamente por la temperatura, y la capacidad reproductiva total disminuyó 36.4 % a 33 °C. En general, se determinó que 28 °C fue la temperatura más favorable para el desarrollo de la mosquita blanca. Sin embargo, reportaron que la temperatura óptima para la reproducción de *B. tabaci* puede estar entre 28 y 33 °C. En el presente estudio, se encontró que durante los muestreos se incrementaron las temperaturas medias y los altos índices de éstas, facilitaron el aumento en la tasa reproductiva de *B. tabaci*, aunado con la fenología del cultivo que favoreció la incidencia de la plaga. En diversos estudios se ha demostrado que una temperatura de 30-32 °C es favorable para el desarrollo de *B. tabaci* (Bonato *et al.*, 2007; Curnutte *et al.*, 2014). Al respecto, Quintela *et al.* (2016) investigaron la reproducción del biotipo B de *B. tabaci* en maíz (*Zea mays* L.) en Brasil y encontraron que los máximos de población de mosca blanca coincidieron con alta temperatura. Estos hallazgos son semejantes a lo obtenido en el presente estudio, en donde se observó que la población de la plaga aumentó conforme se incrementó la temperatura.

Por otra parte, la modelación de la bionomía dependiente de la temperatura de *B. tabaci* (Q-biotipo), fue estudiada por Bonato *et al.* (2007) quienes reportaron que la temperatura de 32.5 °C es la óptima para el desarrollo de ninfas de *B. tabaci*; la fecundidad total (huevos por hembra) varía de 105.3 (a 21°C) a 41 (a 35 °C) y que la longevidad disminuye con el aumento de la temperatura. Argumentan que la asociación entre la temperatura y los parámetros del ciclo biológico son útiles para predecir el efecto de la temperatura sobre la dinámica de la población.

La severidad registrada a través de las fechas de evaluación fluctuó entre 5.14 y 73.28 %. Se determinó que a partir de la fecha 5, el promedio de porcentaje de severidad (PS) se mantuvo estable, y se notó que la temperatura registró una tendencia creciente lo que se relacionó con la severidad del SLCV (Figura 9). El

análisis combinado a través de las fechas de evaluación indicó que los cuadrantes 7 a 10 y de 16 a 20 tuvieron un mayor PS (47.88 a 54.87 %) (Figura 10). La relación entre la severidad y la temperatura observada en este trabajo, coincide con lo reportado por Ali *et al.* (2014) quienes estudiaron el geminivirus de la hoja rizada del algodón, basados en modelos predictivos con variables ambientales, y reportaron que las temperaturas entre 37.16 y 37.78 °C, propician el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, la temperatura promedio mínima de 27.43 °C fue favorable para la incidencia de geminivirus en algodón y mostró efecto significativo durante dos ciclos de cultivo.

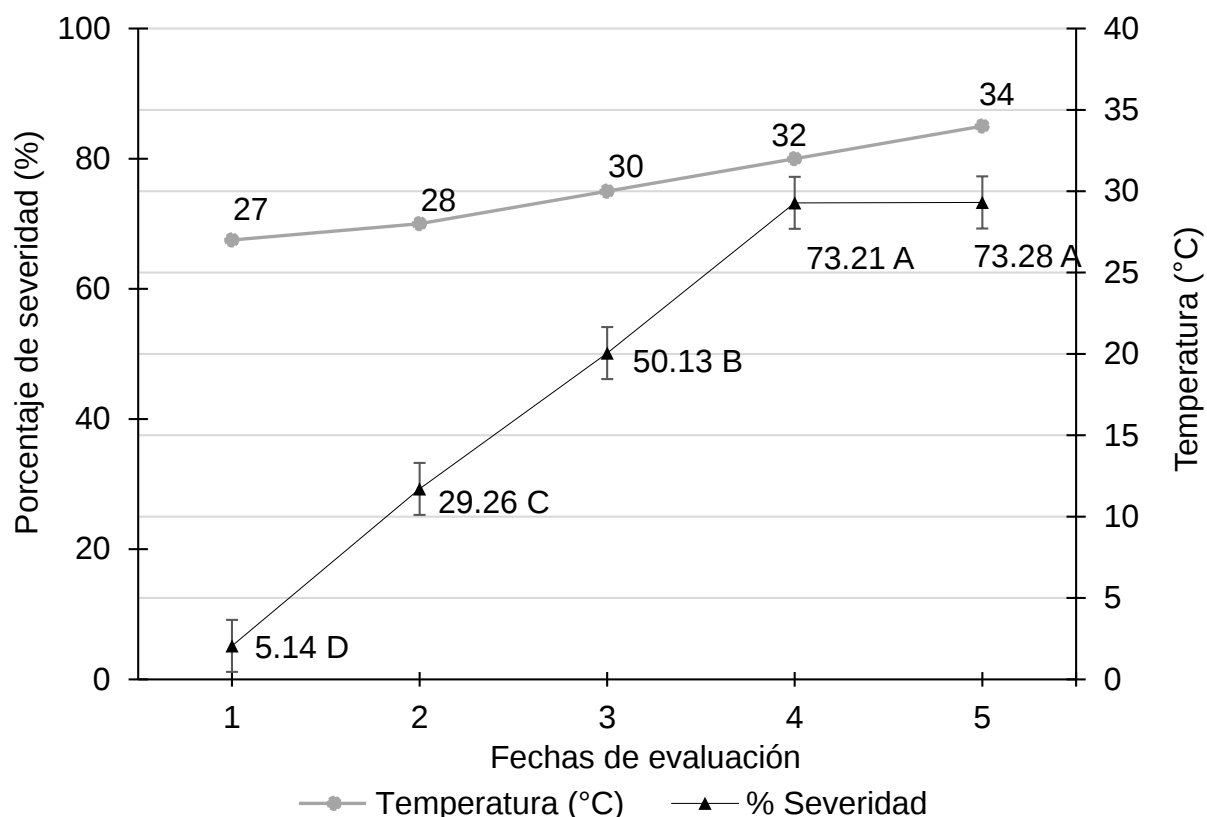


Figura 9. Interrelación del porcentaje de severidad y la temperatura promedio en cada evaluación de la severidad del SLCV en plantas de calabaza var. Gray Zucchini, en diferentes evaluaciones en Cocula, Guerrero. Invierno de 2015.

El ABCPE registró diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) entre cuadrantes y surcos; porque, la mayor incidencia de enfermedad se presentó entre los cuadrantes 7 a 10 y 16 a 20, respectivamente (Figura 10), que se corroboró con el ABCPE con 1431.72 a 1674.41. Se encontró que la severidad en los cuadrantes 1 a 6 y 11 a 15 fue inferior al 50 % y también la ABCPE fue menor (Figura 10); asimismo, se determinó que la mayor severidad de virosis en el cultivo de calabacita se manifestó en los cuadrantes 17 y 19 (Figura 10).

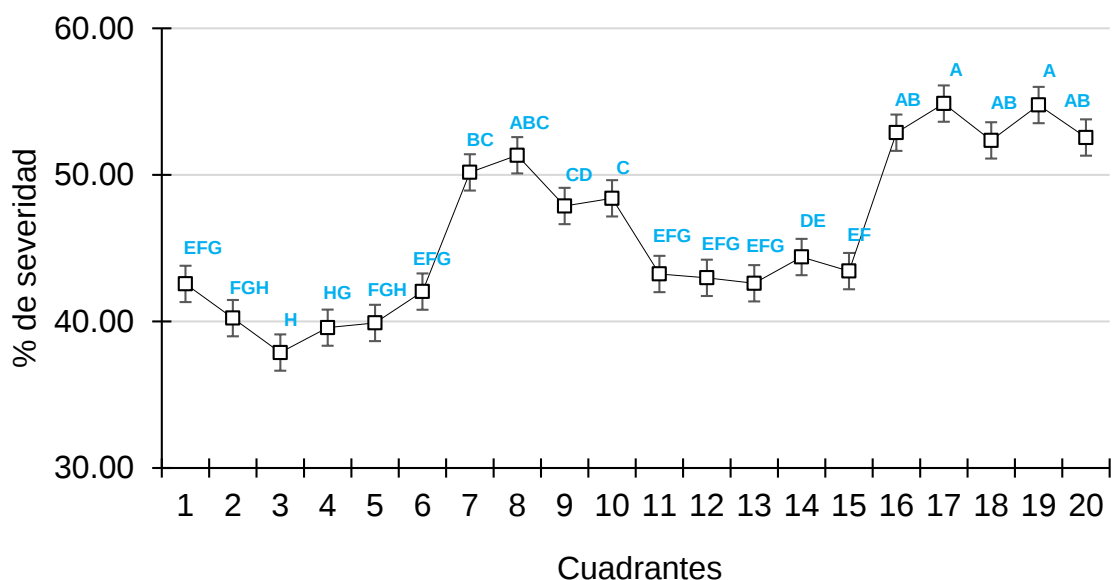


Figura 10. Porcentaje de severidad del SLCV por cuadrante en plantas de calabaza var. Gray Zucchini, en diferentes evaluaciones en Cocula, Guerrero. Invierno de 2015.

El PS fue menor en los cuadrantes 2 al 5, según se indica por el ABCPE, que osciló de 39.90 a 40.23 % y de 1049.78 a 1134.66 %, respectivamente; lo que indica que las epidemias inducidas por SLCV fueron de alta intensidad monitoreada a través de cambios en la severidad de la virosis (infección activa y progresiva) (Figura 10).

Se observó un pronunciado gradiente del PS de SLCV en los cuadrantes con dirección al norte y noreste del área de estudio, comparativamente con las partes central y sureste que fueron poco afectadas (Figura 12); se notó un aparente efecto de orilla atribuible a la fuente de inóculo primario probablemente por las malezas perennes desarrolladas en la riberia del Río San Juan (Figura 11). A pesar de la presencia permanente y progresiva de la enfermedad, no se detectó una distribución uniforme, lo cual puede indicar que la dispersión del patógeno está influenciada por el acceso del vector.

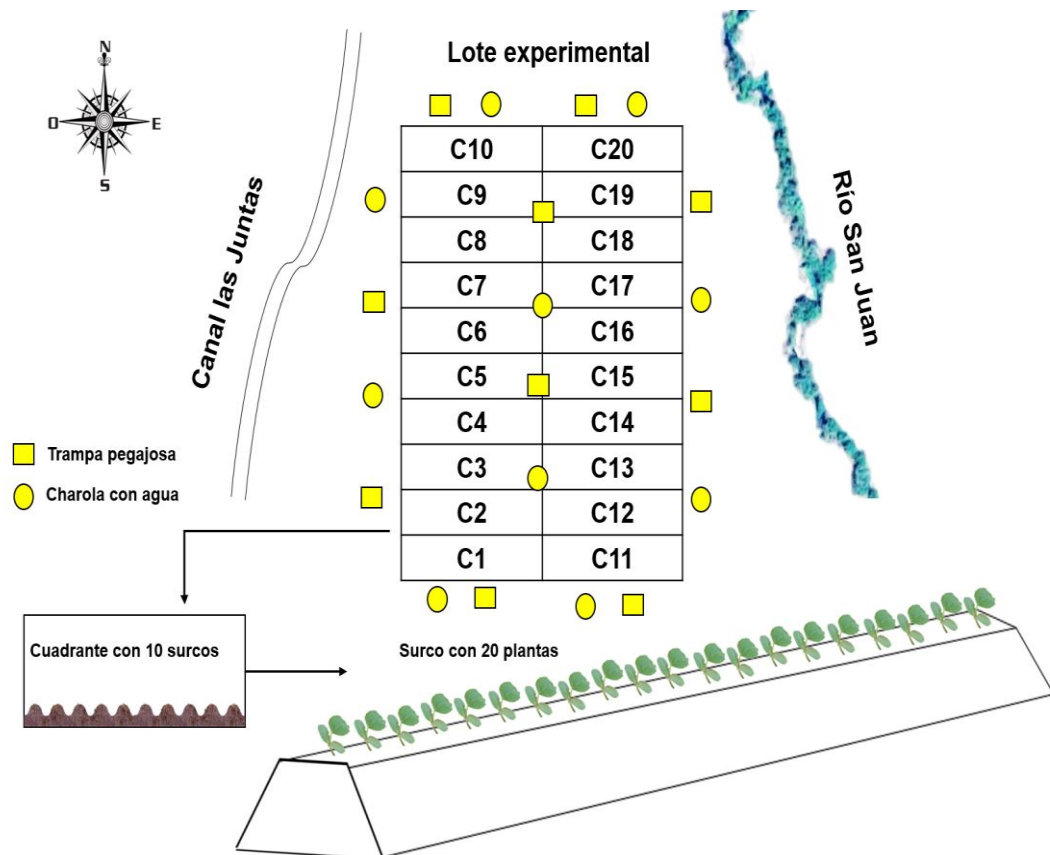
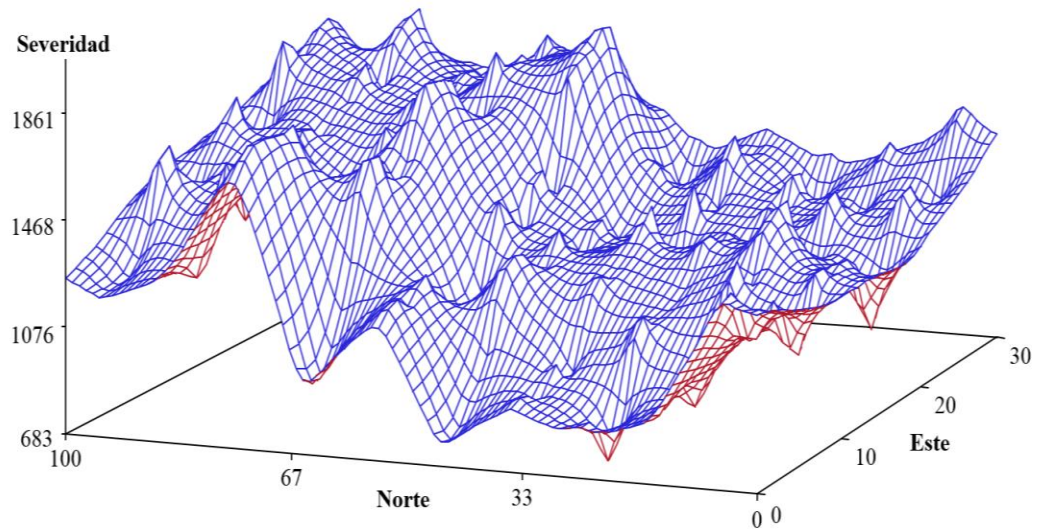


Figura 11. Localización del lote experimental y los afluentes de agua, Río San Juan y Canal de agua de riego Las Juntas.

Superficie de Respuesta para Predicción de ABCPE



Contornos de Predicción para ABCPE

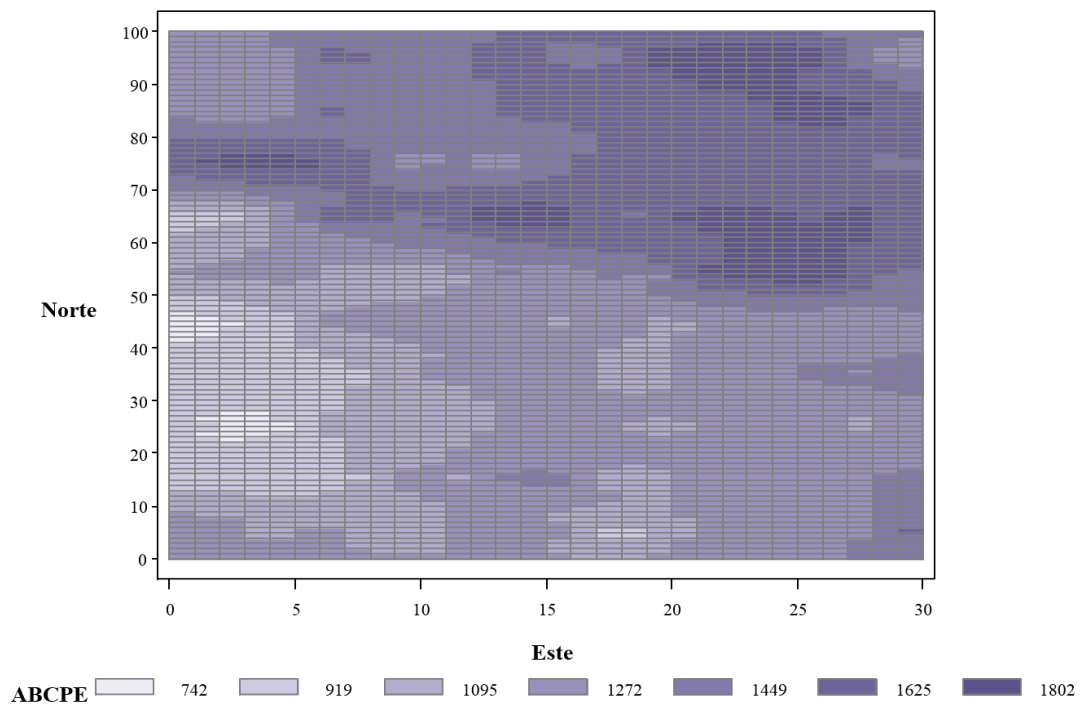


Figura 12. Mapa de superficie de respuesta y plano de curvas de contorno o isolíneas, obtenidos mediante el método de kriging, de la dispersión y frecuencia de la distribución de severidad del SLCV en calabaza var. Gray Zucchini, Cocula, Guerrero. Invierno de 2015. Las áreas claras indican una menor intensidad de la severidad, mientras que las áreas oscuras señalan mayor severidad de la virosis. Cocula, Guerrero. Invierno, 2015.

El patrón de distribución del SLCV en la zona de estudio, reveló una fuerte asociación espacial entre la severidad del virus y la incidencia de su vector *B. tabaci*; porque se notó que la severidad aumentó en la parte occidental del área de estudio durante el ciclo de cultivo. Resultados similares reportaron Szyniszewska *et al.* (2017), quienes estudiaron el análisis espacial y cambio temporal en la pandemia de un geminivirus en yuca en el noroeste de Tanzania; ellos encontraron en varios ciclos una fuerte asociación espacial entre las variables incidencia y severidad del virus y que éstas tendieron a incrementarse hacia una parte localizada y específica del área de estudio.

En el presente estudio la distribución espacial de la incidencia y severidad del SLCV proporcionó información para la explicación del arribo o llegada y distribución dinámica de las poblaciones de *B. tabaci* como vector del virus procedentes de malezas desarrolladas en áreas anexas al Río San Juan, en donde la humedad es permanente y favorece la alta incidencia de arvenses que funcionan como reservorios de *B. tabaci* vector y portador de SLCV. Estas observaciones son respaldadas en los reportes hechos por Mubin *et al.* (2009) quienes argumentan que las malezas son reservorios de begomovirus, y juegan un papel importante en la aparición de las virosis al inicio del ciclo de cultivo, que se tornan en severas epidemias que afectan a las plantas cultivadas; mientras que, en temporada de estiaje, las malezas desempeñan el papel crucial en la propagación de muchos virus; actúan en la redistribución del inóculo primario y sirven de refugio de insectos vectores que forman parte importante en la epidemiología de los begomovirus (Zaidi y Mansoor, 2017).

Por otra parte, Szyniszewska *et al.* (2017) investigaron la distribución espacial y temporal de un begomovirus en yuca; ellos reportaron que el patrón de variación más significativo en la incidencia de mosquitas se registró entre cuadrantes durante la misma temporada, asimismo, también comentan que la reducción de la severidad está asociada a condiciones ambientales, porque durante uno de los ciclos de experimentación se presentó un clima más fresco y la severidad de virosis fue menor, en comparación con el ciclo que tuvo un clima más cálido y

más seco, y por lo tanto, la severidad se incrementó. Con esta información se muestra que los factores climáticos causaron ese cambio (Thresh *et al.*, 1994). Los hallazgos obtenidos en la presente investigación son corroborados por resultados similares publicados por Legg (2010), quien confirmó que están estrechamente correlacionados los cambios de incidencia de mosquita blanca y los patrones de diseminación de virosis.

CONCLUSIONES

Los análisis de PCR, secuenciación y la filogenia comprobaron que las muestras de hojas sintomáticas obtenidas en el Valle de Cocula, Guerrero México, estaban infectadas con el Squash Leaf Curl Virus (SLCV) (accesión KX620945.1 DAAV-1). El SLCV es transmitido por el vector *B. tabaci* e induce retraso grave del crecimiento y enrollamiento severo de hojas en las plantas de calabaza. El tipo de trampa y la fecha de muestreo influyen en la precisión y en la determinación de la dinámica poblacional de *B. tabaci*. La trampa amarilla pegajosa fue más efectiva que la de charola amarilla con agua, para medir la fluctuación poblacional de *B. tabaci*. El sitio de ubicación de la trampa no influyó en el monitoreo del insecto. La incidencia de *B. tabaci* se manifestó en todas las etapas fenológicas y se relacionó con la temperatura. La severidad de SLCV presentó una tendencia creciente y se correlacionó con la temperatura.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización del presente trabajo. J. F. Díaz-Nájera reconoce con gratitud el apoyo incommensurable otorgado por el Dr. S. Ayvar-Serna, Dr. A. Mena Bahena y el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, al Dr. O. Alvarado-Gómez y al laboratorio Biociencia S. A. de C. V. por facilitar las instalaciones para la realización del proyecto de investigación, y al Instituto de Horticultura así como al personal administrativo y de apoyo, por brindar las facilidades para culminar este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, S., Khan, M., Talib, S. S., Atiq, M., Hannan, A. (2014). Algodon leaf curl virus predictive model based on environmental variables. En: Ahmad P., Wani M., Azooz M., Phan Tran LS. (eds) Mejora de Cultivos en la Era de los Cambios Climáticos. Springer, Nueva York.
- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Hussein, E. Y., Mallah, O. B., Abu-Zeitoun, S. Y. (2014). Squash leaf curl virus (SLCV): a serious disease threatening cucurbits production in Palestine Virus Genes 48: 320–328.
- Al-Musa, A., Anfoka, G., Misbeh, S., Abhary, M., and Ahmad, F. H. (2008). Detection and molecular characterization of Squash leaf curl virus (SLCV) in Jordan. J. Phytopathol. 156: 311-316.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Omer, S., Yunis, H., Messika, Y., Uko, O., Koren, A. (2003) Squash leaf curl geminivirus – a new illegal immigrant from the Western Hemisphere and a threat to cucurbit crops in Israel. Phytoparasitica 31: 415.
- Bonato, O., Lurette, A., Vidal, C. Fargues, J. (2007). Modeling temperature-dependent bionomics of *Bemisia tabaci* (Q-biotype). Physiol. Entomol. 32: 50–55.
- Brown, J. K., Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Zerbini, M., Moriones, E., Navas-Castillo, J. (2012). Family Geminiviridae. In Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses; Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., Eds. Elsevier Academic Press: London, UK. pp. 351–373.
- Campbell, C. L. and Madden, L. V. (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons. New York. 532 p.
- Curnutte, L., Simmons, A. and Abd-Rabou, S. (2014). Climate change and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): impacts of temperature and carbon dioxide on life history. Ann. Entomol. Soc. Am. 107: 933–943.

- Díaz, N. J. F., Alvarado, G.O. G., Leyva, M. S. G., Ayvar, S. S., Michel, A. A. C., Vargas, H. M. (2015). Identification and control of fungi causing fruits rot in pipiana pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber). *African Journal Agricultural Research* 10(11):1150-1157.
- Drost, Y. C., Van Lenteren, J. C. and Van Roermund, H. J. W. (1998) Life-history parameters of different biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to temperature and host plant: a selective review. *Bulletin of Entomological Research* 88: 219–229.
- El-DougDoug, K. A., Hayam, S. A. E., Ibtisam, A. H., Entsar, A. A., Asmaa, F., Abd, E. M. (2009). Identification of squash leaf curl virus (Egyptian isolate). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(4): 3470-3478.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Flock, R. A. and Mayhew, D. E. (1981). Squash leaf curl, a new disease of cucurbits in California. *Plant Dis.* 65: 75–76.
- Hall, T. (2004). BioEdit version 7.0.0. Isis Pharmaceuticals Inc. 192 p. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/biodoc.pdf>.
- Idris, A. M., Abedl-Salam, A., Brown, J. K. (2006). Introduction of the new world squash leaf curl virus to squash (*Cucurbita pepo*) in Egypt: a potential threat to important food crops. *Plant Dis.* 90: 1262.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870–1874.
- Legg, J. P. (2010). Epidemiology of a whitefly-transmitted cassava mosaic geminivirus pandemic in Africa. Pp. 233-257 in: *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. A. Stansly and S. E. Naranjo, eds. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.

- Mubin, M., Briddon, R. W., Mansoor, S. (2009). Diverse and recombinant DNA betasatellites are associated with a begomovirus disease complex of *Digera arvensis*, a weed host. *Virus Res.* 142: 208-212.
- Naranjo, S. E. (1996). Sampling Bemisia for research and pest management applications, pp. 209-224. In: Gerling, D. and Mayer R. T. [eds.], *Bemisia: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Intercept, Andover, UK.
- Naranjo, S. E., Castle, S. J., De Barro, P. J. and Liu, S. S. (2010). Population Dynamics, Demography, Dispersal and Spread of Bemisia tabaci. In P. A. Stansly and S. E. Naranjo [eds.] *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer, London.
- Ozaslan, M., T. Aytekin, B., Bas, I., Hali-Kilic, I., Didem, A. and Dag, D. S. (2006). Virus diseases of cucurbits in Gaziantep-Turkey. *Plant Pathology Journal* 5(1): 24-27.
- Paris, H. S., Lebeda, A., Kristkova, E., Andres, T. C., Nee, M. H. (2012). Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated sub species of *Cucurbita pepo*. *Eco. Bot.* 66(1): 71–90.
- Paris, H. S., Maynard, D. N. (2008). *Cucurbita* spp. Squash, pumpkin, gourds. In: Janick J, Paulls RE (eds) *The Encyclopedia of Fruits & Nutes*. CAB Internationals, Wallingford, pp. 292–299.
- Pessarakli, M. (2016). *Handbook of Cucurbits, Growth, Cultural Practices, and Physiology*. CRC Press, Taylor & Francis Publishing Group, Florida, 574 p.
- Polston, J. E., Chellemi, D. O., Schuster, D. J., McGovern, R. J. and Stansly, P. A. (1996). Spatial and temporal dynamics of tomato mottle geminivirus and *Bemisia tabaci* (Genn.) in Florida tomato fields. *Plant Dis.* 80: 1022-1028.
- Quintela, E. D., Abreu, A. G., Lima, D. J. F., Mascarin, G. M., Dos Santos, J. B., Brown, J. K. (2016). Reproduction of the whitefly Bemisia tabaci

- (Hemiptera: Aleyrodidae) B biotype in maize fields (*Zea mays* L.) in Brazil. *Pest Management Science*. 72, 11: 2181–2187.
- Ramesh, S. V., Sahu, P. P., Prasad, M., Praveen, S., Pappu, H. R. (2017). Geminiviruses and Plant Hosts: A Closer Examination of the Molecular Arms Race. *Viruses*, 9(9), 256. <http://doi.org/10.3390/v9090256>
- Rosemeyer, M. E., Brown, J. K., Nelson, M. R. (1986). Five viruses isolated from field-grown buffalo gourd, *Cucurbita foetidissima* HBK, a potential crop for semi-arid lands. *Plant Dis*. 70: 405–409.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin, B., Pakkianathan, B. A., Farich, N., Santana-Magal, M., Elimelech, S., Kontsedalov, G., Lebedev, M. C. (2015). Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors *Curr. Opin. Virol*. 15: 1-8.
- Sobh, H. J., Samsatly, M., Jawhari, C., Najjar, A. H. and Abou-Jawdah, Y. (2012). First report of Squash leaf curl virus in Cucurbits in Lebanon. *Plant Dis*. 96(8): 1231.
- Southwood, T. R. E. (1978). *Ecological Methods*. Chapman & Hall, London, U.K.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2016). SAS Inc. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute in corporation, Cary, N.C. USA: Author.
- Sufrin-Ringwald, T., and Lapidot, M. (2011). Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology* 101: 281-289
- Szyniszewska, A. M., Busungu, C., Boni, S. B., Shirima, R., Bouwmeester, H., Legg, J. P. (2017). Spatial analysis of temporal changes in the pandemic of severe cassava mosaic disease in Northwestern Tanzania. *Phytopathology* 107: 1229-1242.

- Taha, O., Farouk, I., Abdallah, A., Abdallah, N. A. (2016). Use of Post transcription Gene Silencing in Squash to Induce Resistance against the Egyptian Isolate of the Squash Leaf Curl Virus. *Int. J. Genomics*. Article ID 6053147, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6053147>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thresh, J. M., Fargette, D., and Otim-Nape, G. W. (1994). Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. *Trop. Sci.* 34:26-42.
- Van Der Plank, J. E. (1963). *Plant Disease: Epidemic and Control*. Academic Press, New York, London.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Briddon, R. W., Rivera-Bustamante, R., Zerbini, F. M., Martin, D. P. (2017). *Capulavirus* and *Grablovirus*: Two new genera in the family *Geminiviridae*. *Arch. Virol.* 162: 1819–1831.
- Wyatt, S. D. and Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.
- Zaidi, S. S. and Mansoor, S. (2017). Viral vectors for plant genome engineering. *Front. Plant Sci.* 8: 539. doi: 10.3389/fpls.2017.00539.
- Zhang, Y. P., Zhu, M. W., Cui, H. M., Qiu, Y., Sha, K., Wan, Y. H., Zhu, L. Y., Yu, L., Hui, Z. (2008). Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China. *Virus Genes* 36: 547-551.

CAPÍTULO II.

PRIMER REPORTE DE *Squash leaf curl virus* DETECTADO EN LA MALEZA *Proboscidea louisianica* EN MÉXICO

CAPÍTULO II.

PRIMER REPORTE DE *Squash leaf curl virus* DETECTADO EN LA MALEZA *Proboscidea louisianica* EN MÉXICO

José F. Díaz-Nájera

RESUMEN

En las décadas más recientes, ha surgido un amplio interés en los geminivirus, especialmente los begomovirus, por los daños que estos causan a las plantas cultivadas. Las malezas sirven como reservorio natural de begomovirus y como fuente de inóculo para la transmisión de estos agentes infecciosos a cultivos hortícolas. Los objetivos del presente estudio fueron: i) diagnosticar genéticamente y por medio de filogenia, al virus asociado en malezas en el campo experimental del Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero y ii) identificar síntomas de virosis en la maleza *Proboscidea louisianica*. Se colectaron muestras de la maleza *P. louisianica* con síntomas de virosis a las cuales se les extrajo el ADN y se sometió a reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras positivas fueron clonadas y secuenciadas, adicionalmente se realizó un análisis filogenético para conocer la historia evolutiva del begomovirus identificado. Se encontró un begomovirus asociado a la maleza *Proboscidea louisianica*, el virus fue identificado como *Squash leaf curl virus* (SLCV) basado en la secuencia de nucleótidos del genoma viral de la proteína de cápside (KX620944.1 DAM2). El análisis de la secuencia del agente infeccioso con número de acceso KX620944.1 DAM2 se realizó utilizando BLASTn que reveló la identidad de secuencia más alta del 99% con *Squash leaf curl virus*, el análisis filogenético confirmó la identificación del begomovirus asociado a síntomas de virosis en *P. louisianica*. Éste es el primer informe del *Squash leaf curl virus* en la maleza *P. louisianica*, en Guerrero, México.

Palabras clave: Diagnóstico, Begomovirus, PCR, maleza.

**FIRST REPORT OF Squash leaf curl virus DETECTED IN THE WEED
Proboscidea louisianica IN MEXICO**

José F. Díaz-Nájera

SUMMARY

In the most recent decades, there has emerged a widespread interest in geminiviruses, especially begomoviruses, for the damage they cause to cultivated plants. Weeds serve as a natural reservoir for begomoviruses and as a source of inoculum for the transmission of these infectious agents to horticultural crops. The objectives of this study were: i) to diagnose genetically and through phylogeny, the associated virus in weeds in the experimental field of the Agricultural College of the Guerrero state and ii) to identify symptoms of virosis in the weeds *Proboscidea louisianica*. Samples of the *P. louisianica* weed were collected with symptoms of virosis to which the DNA was extracted and subjected to a polymerase chain reaction. The positive samples were cloned and sequenced, in and phylogenetic analysis was performed to know the evolutionary history of the identified begomovirus. A begomovirus associated with the weedy *Proboscidea louisianica* was found, the virus was identified as Squash leaf curl virus (SLCV) based on the nucleotide sequence of the viral genome of the capsid protein (KX620944.1 DAM2). The analysis of the sequence of the infectious agent with accession number KX620944.1 DAM2 was performed using BLASTn that revealed the highest sequence identity of 99 % with Squash leaf curl virus, the phylogenetic analysis confirmed the identification of the begomovirus associated with virosis symptoms in *P. louisianica*. This is the first report of the Squash leaf curl virus in the *P. louisianica* weed, in Mexico.

Key words: Diagnosis, Begomovirus, PCR, weed.

INTRODUCCIÓN

Los geminivirus son virus fitopatógenos de la familia Geminiviridae, tienen un genoma de DNA de cadena única, circular, encapsulado dentro de partículas isométricas gemelas tienen genomas de componentes únicos o bipartitos (DNAs A y B), a esta familia pertenece el género begomovirus, que es transmitido por mosquita blanca, *Bemisia tabaci* (Al-Musa *et al.*, 2008); que causan pérdidas importantes e infectan plantas dicotiledóneas como cultivos hortícolas altamente rentables (Khan y Khan, 2017; Kil *et al.*, 2017) y malezas (McLaughlin *et al.*, 2008). Además de las plantas cultivadas, los begomovirus se hospedan en malezas y plantas silvestres. Para una comprensión completa de la epidemiología de estos agentes infecciosos y para desarrollar medidas de manejo integral adecuadas, la identificación de hospedantes alternos (malezas) es indispensable; sin embargo ha sido descuidado (Leke *et al.*, 2015). Recientemente se ha estudiado a los begomovirus que infectan malezas (Fiallo *et al.*, 2012; Prajapat *et al.*, 2013; Polston *et al.*, 2017).

Según Mubin *et al.* (2009) las malezas son reservorios de begomovirus, juegan un papel importante en la aparición de epidemias que afectan a las plantas cultivadas a inicio de ciclo. En temporada de estiaje, las malezas desempeñan un papel crucial en la propagación de muchos virus, actúan en la redistribución del inóculo primario, También actúan como refugio de insectos vectores y forman parte importante en la epidemiología de begomovirus (Zaidi y Mansoor, 2017). Las malezas infectadas pueden mostrar pocos o ningún síntoma, lo que significa en un reto en el manejo de virus en plantas (Wisler y Norris, 2005).

Por lo anterior los objetivos del presente estudio fueron: i) diagnosticar genéticamente y por medio de filogenia, al virus que afecta a la maleza *P. louisianica* del Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero y ii) identificar síntomas de virosis en la maleza *Proboscidea louisianica* conocida comúnmente como “Torito”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de plantas de la maleza *Proboscidea louisianica* (P. Mill.) Thell. conocida comúnmente como “Torito” con síntomas característicos de virosis como: mosaicos amarillos brillantes, epinastia, clorosis foliar marginal, enaciones foliares, reducción del área foliar, enanismo y retraso del crecimiento (Polston y Anderson 1997). El sitio de colecta fue el Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro), en Cocula, Guerrero (18° 14' N, 99° 39' O y 640 m de altitud). El clima es AW0, que corresponde a cálido subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura y precipitación promedios anuales de 26.4 °C y 767 mm, respectivamente. Las muestras colectadas se transportaron al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario Biociencia con sede en Monterrey, Nuevo León, México, en donde se realizó el análisis molecular, por medio de la extracción de DNA genómico de hojas de *P. louisianica* según el DNeasy Plant Kit (QIAGEN®).

Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para los análisis moleculares, se realizó una extracción de DNA genómico de hojas de *P. louisianica* empleando el DNeasy Plant Kit (QIAGEN®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR se usó una combinación de oligonucleótidos degenerados, descritos por Wyatt y Brown (1996) y Zhang et al. (2008), mediante la amplificación del gen que codifica para la proteína de la cápside. Se utilizaron los primers degenerados prV324 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') y CoPR (5'-GANGSATGHGTRCADGCCA TATA-3') que amplifican un fragmento aproximado de 576 pb (Wyatt y Brown 1996; Zhang et al. 2008), utilizando un programa con una temperatura inicial de 94 °C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C 60 seg, 50 °C 45 seg, y 72 °C 45 seg, y 72 °C de extensión final por 6 min. Para la amplificación del DNA se utilizó un termociclador Thermo™ (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y la visualización de los productos amplificados se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % a 62 volts por 5 minutos seguido de 100 volts por 40

minutos, y se observaron en un transiluminador de luz UVMR (Labnet, Edison, NJ). Se secuenciaron muestras representativas de los productos de PCR, y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank.

Análisis filogenético

Las secuencias consenso se editaron y ensamblaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004). En el análisis evolutivo, todas las secuencias consenso fueron alineadas con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las reconstrucciones filogenéticas para los datos se realizaron con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting, opción de búsqueda (nivel=1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones) y los espacios faltantes se consideraron como delecciones completas. Para calcular los valores de confianza de los clados del árbol, se realizó una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). La secuencia obtenida se depositó en la base de datos del GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de begomovirus en *Proboscidea louisianica*

En plantas de *Proboscidea louisianica* se observó el síndrome viral: deformación de hojas, presencia de rugosidades, mosaicos amarillos, reducción en el tamaño, y clorosis abultamiento y clorosis foliar marginal (Figura 1), el cual coincide con los síntomas descritos por Al-Musa *et al.* (2008) y Sufrin y Lapidot (2011). Por medio de PCR y su posterior observación en geles de agarosa, se detectó la presencia de begomovirus en el tejido foliar de la maleza “Torito” (Figura 2), endémica en el CSAEGro localizado en el municipio de Cocula Gro., de la zona norte del estado de Guerrero, México. Lo anterior es congruente con la abundante población de mosquita blanca detectada en la maleza Torito y en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) establecido en ese sitio durante el ciclo de cultivo (primavera/verano 2015) inmediato anterior. La secuencia obtenida (494 pb) a partir del producto amplificado tuvo 99 % de similitud con la región que codifica

para la proteína de la cápside, con secuencias reportadas en el Gen Bank para *Squash leaf curl virus*. Posteriormente la secuencia se depositó en el Banco de Genes (Genbank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica con número de acceso KX620944.1 DAM2 (Figura 2).

Análisis filogenético

En la reconstrucción filogenética basada en la utilización de la región que codifica para la proteína de la cápside, se identificó a *SLCV*. Con la región de la proteína de la cápside se logró agrupar al virus identificado, con sus homólogos (DQ285016 y DQ285019), con una confiabilidad bootstrap del 96%, además de ser altamente diferenciadas del resto de las especies (100%) (Figura 2).

El torito y otras malezas forman parte importante en los agroecosistemas de la región norte de Guerrero, y de otras partes de México y Norteamérica; cuando finaliza la cosecha de cultivos principalmente de hortalizas, las malezas son los principales hospedantes y reservorios de virus fitopatógenos y sus insectos vectores (Chen *et al.*, 2013). La interrelación planta-patógeno-vector se caracteriza por formar complejas interacciones, directas e indirectas (Belliere *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que varias malezas sirven como hospedantes alternos de múltiples virus, y existe la posibilidad de que de estos reservorios emerjan nuevas cepas más agresivas de virus fitopatógenos (Mubin *et al.* 2010). Snehi *et al.* (2015) señalan que la erradicación de malezas perennes de alrededor, dentro y fuera de invernaderos y campos de cultivo para eliminar posibles fuentes de inóculo de virus, y realizar el monitoreo y detección de los síntomas iniciales en las primeras etapas de desarrollo del cultivo, pueden ser estrategias útiles para disminuir la incidencia de virosis.

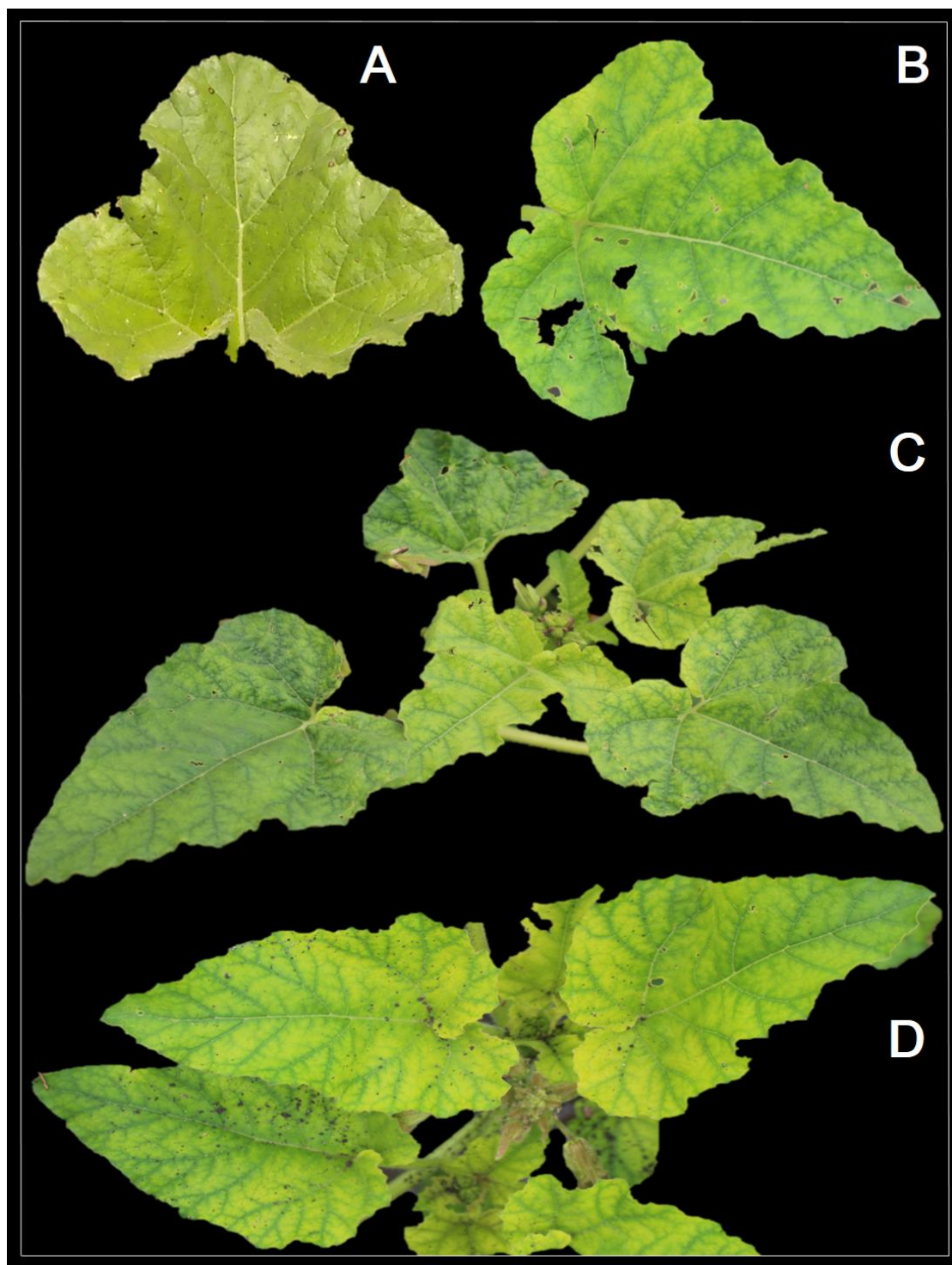


Figura 1. (A) Hoja sana, (B, C y D) Síntomas de clorosis, deformación y mosaicos asociados con la infección por begomovirus en *Proboscidea louisianica*.

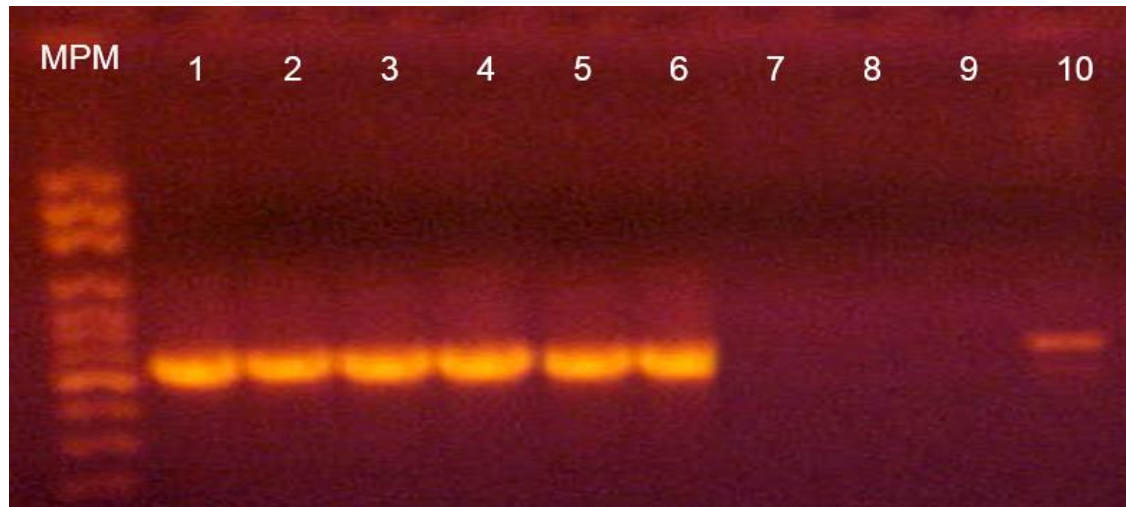


Figura 2. Productos de amplificación de PCR de muestras de *Proboscidea louisianica* (1-6); testigo (plantas sanas) (7, 8 y 9); control positivo (10) y mpm (Marcador de peso molecular).

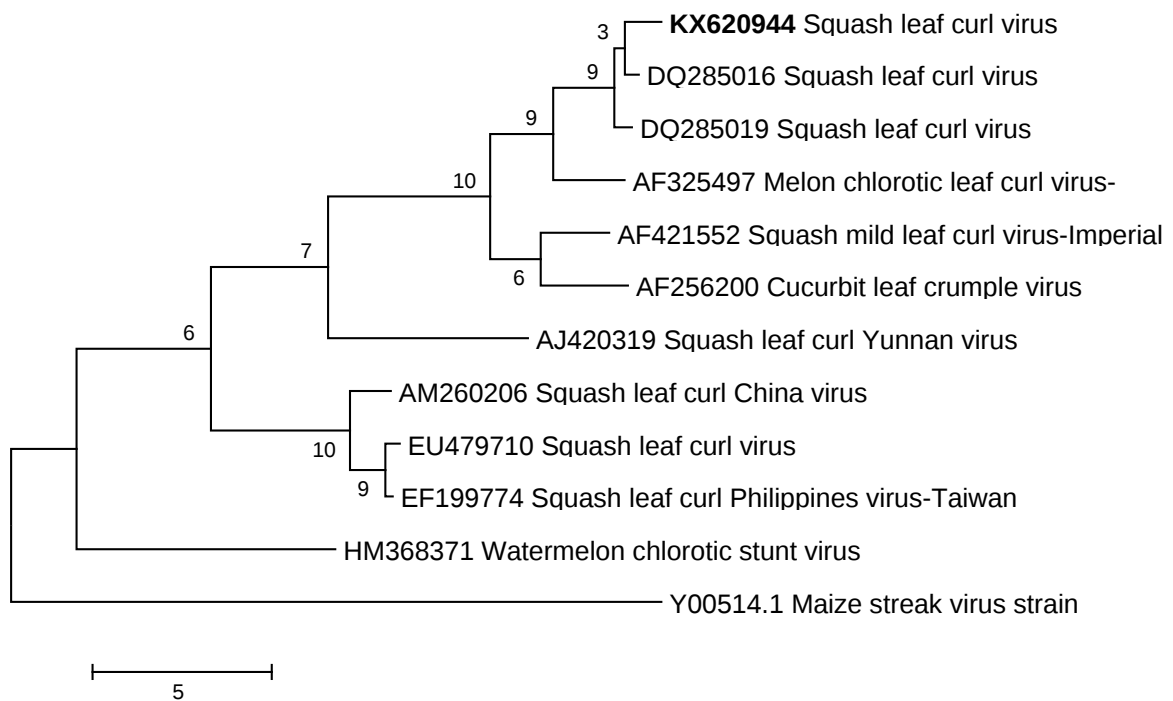


Figura 3. Árbol filogenético obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio. s. l.=sensu lato.

Rist y Lorbeer (1989) reportaron que el control de malezas logró reducir con éxito la incidencia del virus mosaico del pepino (Cucumber mosaic cucumovirus) en apio. Sin embargo, se ha informado que el control de malezas es una estrategia con limitaciones, y falla cuando ocurren cambios que afectan la epidemiología del virus, como fluctuaciones climáticas locales o los cambios en las prácticas de cultivo (Hull y Davies, 1992). En Pakistán Mubin *et al.* (2010) estudiaron la interacción de begomovirus y *Sonchus arvensis* mediante clonación, secuenciación de ácidos nucleicos y análisis filogenético porque según estos autores, el diagnóstico molecular permite conocer la relación del virus y su hospedante y además determinar la correlación existente con otros virus del mismo grupo detectados en otras partes del mundo. Por otra parte, según Mauck *et al.* (2012) los vectores tienden a ser atraídos por las malezas y una vez que transmiten los virus, éstos presentan una fase de atenuación patógeno que no mata al hospedante (maleza) el cual funciona como fuente de alimentación del vector a largo plazo (Zaidi y Mansoor, 2017).

CONCLUSIONES

Se identificó molecularmente y por medio de filogenia, al *Squash leaf curl virus* en la maleza *Proboscidea louisianica* del Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero y los síntomas de virosis en la maleza *P. louisianica* fueron deformación de hojas, presencia de rugosidades, mosaicos amarillos, reducción en el tamaño, y clorosis abultamiento y clorosis foliar marginal

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece a la Universidad Autónoma Chapingo, por el financiamiento para la realización de la presente investigación, así como también al Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez, de la UANL, por su dedicada y entusiasta colaboración para el diagnóstico molecular en este trabajo, extensos agradecimientos al Dr. Sergio Ayvar Serna por todo el apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Al-Musa, A., Anfoka, G., Misbeh, S., Abhary, M., Ahmad, F. H. (2008). Detection and Molecular Characterization of Squash leaf curl virus (SLCV) in Jordan. *J. Phytopathology* 156: 311-316.
- Belliure, B., Janssen, A., Maris, P. C., Peters, D., Sabelis, M. W. (2005). Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecol. Lett.* 8: 70-79.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791. <http://www.jstor.org/stable/2408678>.
- Hall, T. (2004). BioEdit version 7.0.0. Isis Pharmaceuticals Inc. 192 p. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/biodoc.pdf>.
- Hull, R., Davies, J. W. (1992). Approaches to non-conventional control of plant virus diseases. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 11: 17-33.
- Kil, E. J., Kim, S., Lee, Y. J., Byun, H. S., Park, J., Seo, H., Kim, C. S., Shim, J. K., Lee, J. H., Kim, J. K., Lee, K. Y., Choi, H. S., Lee, S. (2017). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports* 6:19013. DOI:10.1038/srep19013.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870–1874.
- Leke, W. N., Mignouna, D. B., Brown, J. K., Kvarnheden, A. (2015), Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa. *Agriculture & Food Security* 4:1. DOI 10.1186/s40066-014-0020-2.
- Mauck, K., Bosque, P. N. A., Eigenbrode, S. D., De-Moraes, C. M., Mescher, M. C. (2012). Transmission mechanisms shape pathogen effects on host–vector interactions: evidence from plant viruses. *Funct. Ecol.* 26: 1162–1175.

- McLaughlin, P. D., McLaughlin, W. A., Maxwell, D. P., Roye, M. E. (2008). Preliminary identification of begomoviruses infecting crops and weeds in Belize. *Plant Viruses* 2(1): 58-63.
- Mubin, M., Shahid, M. S., Tahir, M. N., Briddon, R. W., Mansoor, S. (2010). Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites. *Virus Genes* 40: 452-457.
- Polston, J. E., Anderson, P. (1997). The emergence of whitefly transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81: 1358-1369.
- Polston, J. E., Londoño, M. A., Cohen, A. L., Padilla-Rodriguez, M., Rosario, K., Breitbart, M. (2017). Genome sequence of Euphorbia mosaic virus from passion fruit and *Euphorbia heterophylla* in Florida. *Genome Announc* 5(17)1: 4-16.
- Prajapat, R., Marwal, A., Gaur, R. K, (2013). Evidence of the Association of Solanum leaf curl lakshmangarh virus with a Weed Plant *Solanum nigrum* in Rajasthan, India. *Science International* 1(11): 379-383.
- Rist, D. L., Lorbeer, J. W. (1989). Occurrence and overwintering of Cucumber mosaic virus and Broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York. *Phytopathol.* 79: 65-69.
- Snehi, S. K., Raj, S. K., Prasad, V., Singh, V. (2015). Recent Research Findings Related to Management Strategies of Begomoviruses. *J. Plant Pathol. Microb.* 6: 273.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

- Wisler, G. C., Norris, R. F. (2005). Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Science* 53: 914-917.
- Wyatt, S. D., Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293.
- Zaidi, S. S., Mansoor, S. (2017). Viral vectors for plant genome engineering. *Front. Plant Sci.* 8: 539.
- Zhang, Y. P., Zhu, M. W., Cui, H. M., Qiu, Y., Sha, K., Wan, Y. H., Zhu, L. Y., Yu, L., Hui, Z. (2008). Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China. *Virus Genes* 36: 547-551.

CAPÍTULO III.

DIAGNÓSTICO DE Squash leaf curl virus Y MANEJO INTEGRADO DE *Bemisia tabaci* EN *Cucurbita pepo*

CAPÍTULO III.

DIAGNÓSTICO DE *Squash leaf curl virus* Y MANEJO INTEGRADO DE *Bemisia tabaci* EN *Cucurbita pepo*

José F. Díaz-Nájera

RESUMEN

Los begomovirus, una de las principales limitaciones en la producción de hortalizas como calabaza, son transmitidos por la mosca blanca. Para implementar un manejo integrado se tiene que realizar un buen diagnóstico. La presente investigación tuvo como objetivos: a) identificar por medio de características morfológicas al espécimen de mosca blanca en el cultivo de calabaza en trópico seco, b) diagnosticar la etiología del virus rizado de la hoja de calabaza en tejido y su vector, con técnicas moleculares y filogenia, así como comprobar su patogenicidad, y c) probar en campo bajo condiciones de riego, dos genotipos de calabaza, e insecticidas de origen químico y orgánico sobre mosca e incidencia y severidad de virosis, durante dos ciclos consecutivos de cultivo. Se identificó a *Bemisia tabaci*, los análisis de PCR, secuenciación y filogenia confirmaron que *B. tabaci* es portador y transmite el Squash Leaf Curl Virus, el cual induce retraso grave del crecimiento y enrollamiento severo de hojas. En los genotipos Depredador y Grey Zucchini, la aplicación de Confidor® (imidacloprid), Oberon® (spiromesifen) + (Muralla® max) (imidacloprid + betacyfluthrin), Benefit® (Azadiractina), Movento® (spirotetramat) + SAF-T-SIDE® (Aceite parafínico de petróleo), disminuyeron la población de *B. tabaci*, la incidencia y severidad de virosis en 2014 y 2015.

Palabras clave: Calabaza, begomovirus, vector, manejo integrado.

DIAGNOSTIC OF *Squash leaf curl virus* AND INTEGRATED MANAGEMENT OF *Bemisia tabaci* IN *Cucurbita pepo*

José F. Díaz-Nájera

ABSTRACT

Begomoviruses, one of the main limitations in the production of vegetables such as squash, are transmitted by the whitefly. To implement integrated management, a good diagnosis must be made. The objectives of the present research were: a) to identify by means of morphological characteristics the specimen of whitefly in the crop of Zucchini the dry tropic, b) to diagnose the etiology of the curly virus of the zucchini leaf in tissue and its vector, with techniques molecular and phylogeny, as well as check their pathogenicity, and c) to test in field under irrigation conditions, two genotypes of squash, and insecticides of chemical and organic origin on fly and incidence and severity of virosis, during two consecutive crop cycles. *Bemisia tabaci* was identified, PCR analysis, sequencing and phylogeny confirmed that *B. tabaci* is a carrier and transmits the Squash Leaf Curl Virus, which induces severe growth retardation and severe leaf curl. In the Depredator and Gray Zucchini genotypes, the application of Confidor® (imidacloprid), Oberon® (spiromesifen) + (Muralla® max) (imidacloprid + betacyfluthrin), Benefit® (Azadirachtin), Movento® (spirotetramat) + SAF-T- SIDE® (petroleum paraffinic oil), decreased the population of *B. tabaci*, the incidence and severity of virus in 2014 and 2015.

Keywords: Zucchini, begomoviruses, vector, integrated management.

INTRODUCCIÓN

La calabacita (*Cucurbita pepo* L.) tiene gran aceptación para el consumo, en diferentes platillos de la cocina mexicana (Román *et al.*, 2013). Dentro de las cucurbitáceas, *C. pepo* es el cultivo más dinámico porque es de ciclo corto y permite al productor recuperar rápidamente su inversión y capitalizar sus ganancias económicas, varias veces por año, en condiciones del trópico.

El cultivo es atacado por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Gen.), insecto picador succionador que, al alimentarse de la savia de los tejidos vegetales, ocasiona daños directos manifestados en amarillamiento y debilitamiento de las plantas. En ataques severos éstas presentan desarrollo y maduración desuniformes, causados por la inyección de toxinas en la saliva del insecto. Además de este daño directo, el insecto produce mielecilla que cubre el follaje en donde se desarrolla la fumagina por hongos saprófitos como *Capnodium* y *Fumago* (Khan y Wan, 2015; Navas *et al.*, 2011).

No obstante, el daño de mayor impacto económico es la transmisión de enfermedades virales en el cultivo. Al respecto, Razze *et al.* (2016) señalan que *Bemisia tabaci* es vector de begomovirus en calabacita, que cuando infectan al cultivo joven ponen en riesgo el éxito de la inversión económica del agricultor.

Para disminuir los daños provocados por begomovirus en el cultivo, el control se dirige a combatir el insecto vector, a través del manejo integrado, en donde lo más recomendable es utilizar genotipos resistentes en combinación con prácticas culturales, así como la utilización de micoorganismos benéficos y la aspersión de productos orgánicos y químicos (Nicaise, 2014; Snehi *et al.*, 2015). En la agricultura sustentable se utilizan cada vez más insecticidas orgánicos obtenidos de plantas, como extracto acuoso de ajo, aceite vegetal de semilla de soya, azadiractina y otros que tienen las ventajas de no ser dañinos para humanos y animales, no contaminan los ecosistemas y garantizan la inocuidad de los productos agropecuarios.

Los insecticidas botánicos o insecticidas de origen vegetal (fitoextractos) se consideran una fuente importante de sustancias bioactivas y son compatibles con los programas de manejo integrado de plagas. Esta práctica puede usarse conjuntamente con otros métodos de control de plagas en los esfuerzos por mantener el equilibrio ambiental, porque deja menos residuos químicos y causa bajos efectos tóxicos en animales o humanos. Varios estudios han demostrado la eficacia del uso de *Azadirachta indica* y otras plantas para controlar *B. tabaci* (De Almeida *et al.*, 2014; Abdel-Razek *et al.*, 2017). La utilización de insecticidas químicos es el método tradicional de control de este vector; en la actualidad se recomienda aplicar productos específicos como spirotetramat, spiromesifen e imidacloprid; pero el uso irracional y la residualidad de estos provoca que surjan generaciones resistentes del insecto y alteran a la fauna benéfica, sin embargo estas moléculas químicas son específicas para el complejo de chupadores y no afectan la fauna benéfica (Labanowska *et al.*, 2014). Por los inconvenientes que se tienen con la aplicación de insecticidas químicos, la tendencia actual es disminuir su uso, sobre todo en la agricultura orgánica, para evitar riesgos en la salud de los consumidores. Para lograr éxito en el manejo integrado de *B. tabaci* es importante monitorear la incidencia del vector en el cultivo, principalmente en los meses más cálidos que, en la región de estudio, son marzo, abril y mayo, en los cuales se puede presentar la mayor incidencia tanto del insecto vector como de las enfermedades virales por éste transmitidas; esta información se utiliza como base para decidir cuándo llevar a cabo las aplicaciones de insecticidas contra la mosca blanca (Gerling y Horowitz, 2010; Bragard *et al.*, 2013).

La presente investigación tuvo como objetivos: a) identificar por medio de características morfológicas al espécimen de mosca blanca en el cultivo de calabaza en trópico seco, b) diagnosticar la etiología del virus rizado de la hoja de calabaza en tejido y su vector, por medio de técnicas moleculares y filogenia, así como comprobar su patogenicidad, y c) probar en campo bajo condiciones de riego en trópico seco, dos genotipos de calabaza, e insecticidas de origen químico y orgánico sobre mosca e incidencia y severidad de virosis, durante dos ciclos consecutivos de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

En el ciclo invierno-primavera del año 2014 se colectaron 20 muestras sintomáticas de calabaza con virosis (Figura 1), en un lote experimental de 2,000 m² cultivado con calabacín var. Gray Zucchini, establecido en el Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro), en el municipio de Cocula, Guerrero, en la zona Norte del Estado, localizado entre las coordenadas 18°26'27.20" latitud Norte y -99°65'07.98" longitud Oeste, a 635 msnm (Díaz *et al.*, 2015).



Figura 1. Planta de calabaza (*C. pepo*) infectadas naturalmente con Squas leaf curl virus (SLCV), mostrando un rizado severo de la hoja y moteado clorótico.

Identificación morfológica de mosca blanca

Se realizó un muestreo sistemático en transecto en W, la unidad de muestreo fue de una planta y el tamaño de muestra de cinco hojas infestados de ninfas de en el cuarto instar ninfal ("pupa", ojos visibles a través del integumento *Bemisia tabaci*), obtenidos de cada punto del transecto de muestreo. Una vez capturados, se prepararon para su identificación. Las ninfas del cuarto instar obtenidas durante la colecta, se despegaron de los folíolos mediante golpeo y pincel.

Se dispusieron 12 ninfas representativas en montas permanentes (solución Hoyer), para posteriormente ser observadas por medio de microscopio compuesto y microscopio confocal. La identificación se realizó mediante la utilización de claves taxonómicas basadas en la morfología de especímenes inmaduros (Carapia y Castillo, 2013).

Detección, patogenicidad, análisis filogenético en vector y tejido vegetal de Squash leaf curl virus (SLCV)

Colecta de mosca blanca. Se realizó en 2014 en el municipio de Cocula en Guerrero. Se colectaron adultos en un predio de calabaza (*C. pepo*) cultivado a cielo abierto. Los insectos se colocaron en grupos variables entre 30 y 100 especímenes por frasco y se mantuvieron en alcohol al 80 % para su análisis posterior.

Identificación de Begomovirus en el vector. Se utilizó la combinación de oligonucleótidos degenerados, descritos por Wyatt y Brown (1996) y Zhang *et al.* (2008), por medio de la amplificación del gen que codifica para la proteína de la cápside, con los primers degenerados prV324 (5-gccyatrtayagraagccmag-3') y CoPR (5-gangsatghgtrcadgcatata-3'), se siguió un programa de temperatura inicial de 94°C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C 60 seg, 50°C 45 seg, y 72°C 45 seg; con una temperatura de 72°C de extensión final por 6 min. Para la amplificación del ADN se utilizó un termociclador Thermo™ (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y la visualización de los productos amplificados se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % a 62 volts por 5 minutos seguido de 100 volts por 40 minutos, y fue observado en un transiluminador de luz UVMR (Labnet, Edison, NJ). Se secuenciaron muestras representativas de ADNmt de los diferentes biotipos de mosca blanca, así como de los productos de PCR de los Begomovirus encontrados, y las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank.

Patogenicidad. La prueba de transmisión de virus por mosquita blanca en calabacita se realizó en periodo febrero-marzo del 2014. Se efectuó en condiciones controladas utilizando jaulas preparadas con dos vasos de

poliestireno expandido de 1 litro de capacidad, con ventanas cubiertas con tela de organza. La colecta de mosquita blanca se llevó a cabo mediante un succionador bucal en un lote de calabacita con síndromes virales. Para conocer la patogenicidad del virus se introdujeron 30 mosquitas blancas por jaula, las cuales contenían una planta de calabacita var. Gray Zucchini. En cinco jaulas se introdujeron mosquitas blancas y dos se dejaron como testigo. Se llevaron a cabo revisiones periódicas durante tres semanas para detectar la posible aparición de síntomas virales.

Identificación de Begomovirus en tejido vegetal. De las plantas utilizadas en la prueba de patogenicidad que mostraron síntomas de virosis, se colectaron muestras de hojas sintomáticas de calabaza var. Grey zucchini para la detección del virus. De las hojas de calabacín se extrajo el DNA con el DNeasy Plant Kit (QIAGEN®). Se usaron los mismos oligonucleótidos degenerados prV324 y CoPR para detectar begomovirus. Las reacciones de PCR y la amplificación del DNA se realizaron de forma similar que en la identificación de begomovirus en el vector.

Filogenia del virus. Las secuencias consenso se editaron y ensamblaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004). En el análisis evolutivo, todas las secuencias consenso se alinearon con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las reconstrucciones filogenéticas de los datos se realizaron con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting, opción de búsqueda (nivel=1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones) y los espacios faltantes se consideraron como deleciones completas. Para calcular los valores de confianza de los clados del árbol, se realizó una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). La secuencia obtenida se depositó en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Manejo integrado en campo

El trabajo se estableció en trópico seco en condiciones de campo durante el ciclo invierno-primavera del 2014 y 2015 en el campo experimental del CSAEGro.

Material genético

Los genotipos utilizados en el presente estudio fueron el Depredator y el Grey Zucchini, ambos tipo Zucchini de la compañía Seminis® seeds.

Insecticidas

Los insecticidas usados en el presente estudio se describen en el Cuadro 1, se usaron las dosis recomendadas por el fabricante.

Cuadro 1. Características de los insecticidas utilizados.

Producto	Empresa	Ingrediente activo	Grupo químico
Confidor®	Bayer	imidacloprid	Neonicotinoide
Benefit®	Agrícola Innovación	Azadiractina	Botánicos
SAF-T-SIDE	DISTRIBUCIONES IMEX	Aceite parafínico de petróleo	Aceite mineral derivado de petróleo
Oberon®	Bayer	spiromesifen	Derivados de los ácidos tetrónico y tetrámico
Movento®	Bayer	spirotetramat	Neonicotinoide/Piretroides
Muralla max	Bayer	imidacloprid+ betacyfluthrim	

Fuente: Sparks y Nauen (2015).

Tratamientos y diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas, con parcelas grandes arregladas como bloques completos al azar. Las parcelas grandes correspondieron a los dos genotipos y las parcelas chicas, a los insecticidas; se utilizaron cuatro repeticiones, los tratamientos se describen en el Cuadro 2.

Las unidades experimentales estuvieron constituidas de 3 a 1.60 m de separación y de 5 m de longitud; con 0.45 m de distancia entre matas y 2 plantas por mata. La densidad poblacional fue de 66 plantas por unidad experimental. La parcela útil fue el surco central. Se hicieron tres aplicaciones a intervalos de siete días, con una mochila motorizada Arimitsu® (ModeloSD-260D), con una boquilla de 2 puntas de abanico plano KS-K6 a 80 psi. Con un gasto de 300 y 400 L ha⁻¹

en el primer y segundo experimento, respectivamente. Se ajustó el pH del agua a 7 (Agrex® ABC) y se añadió coadyuvante (Inex-A®) a 1 ml L⁻¹.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en condiciones de campo durante los ciclos 2014 y 2015, contra *Bemisia tabaci* en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

Trat.	Productos
T1	imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer)
T2	Azadiractina (Benefit® 3 % CE, Agrícola Innovación)
T3	Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80 %, DISTRIBUCIONES IMEX)
T4	imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86 %. SC, Bayer)
T5	imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30%. OD, Bayer)
T6	spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®)
T7	spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE)
T8	spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid+betacyfluthrim (Muralla max 300 OD, Bayer)
T9	spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®)
T10	spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE)

Variables de estudio y análisis de datos

Adultos y ninfas de Bemisia tabaci

Para determinar el número de individuos por tratamiento, se muestrearon dos folíolos, uno del tercio superior de la planta y otro del tercio medio. Lo anterior en base a los hábitos migratorios de *B. tabaci* y colonizar las partes apicales de la planta, observándose una mayor preferencia de oviposición en el estrato superior de la planta.

Así mismo, se ha demostrado que las ninfas son más predominantes en la porción media de la planta. Estos folíolos se tomaron de 5 plantas por unidad experimental, con un total de 40 folíolos por tratamiento, para registrar el número de ninfas y adultos. Los muestreos se realizaron antes de cada aplicación de los tratamientos y 7 días después de la última aplicación.

Porcentaje de reducción de moscas blancas (PRMB)

Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de reducción del número de moscas blancas (adultos y ninfas) sobre el control mediante la siguiente formula (Neupane *et al.*, 2016):

$$PRMB = \frac{\text{Número de moscas en el tratamiento control} - \text{Número de moscas en el tratamiento}}{\text{Número de moscas en el tratamiento control}} \times 100$$

Porcentaje de incidencia y severidad del SLCV

El porcentaje de incidencia de virosis en calabaza se calculó de acuerdo con la fórmula de Muqit y Akanda (2007):

$$\text{Incidencia de la enfermedad (\%)} = \frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Total de plantas en la parcela}} \times 100$$

Para evaluar la severidad de virosis, se utilizó la escala de Van Der Plank (1963). El análisis de los datos incluyó análisis de varianza individual por año y genotipo, combinado a través de genotipos por año y análisis combinado a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015 y genotipos. De igual forma, se efectuaron pruebas de comparaciones múltiples de medias utilizando el método de LSD con nivel de significancia de 5 %. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS 9.4 (SAS, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica de mosca blanca

Se identificó a *Bemisia tabaci*, los especímenes de cuarto instar ninfal observadas en microscopio compuesto y confocal, mostraron forma alargada; orificio vasiforme estrecho y triangular, con una língula larga sin extenderse más del orificio vasiforme, ensanchada y puntiaguda distalmente (no lobular), dos setas terminales y tiene la presencia del surco caudal definido que se extiende desde la parte posterior del opérculo hasta el margen caudal del cuerpo (Figura 2) (Carapia y Castillo, 2013; Hodges y Evans, 2005).

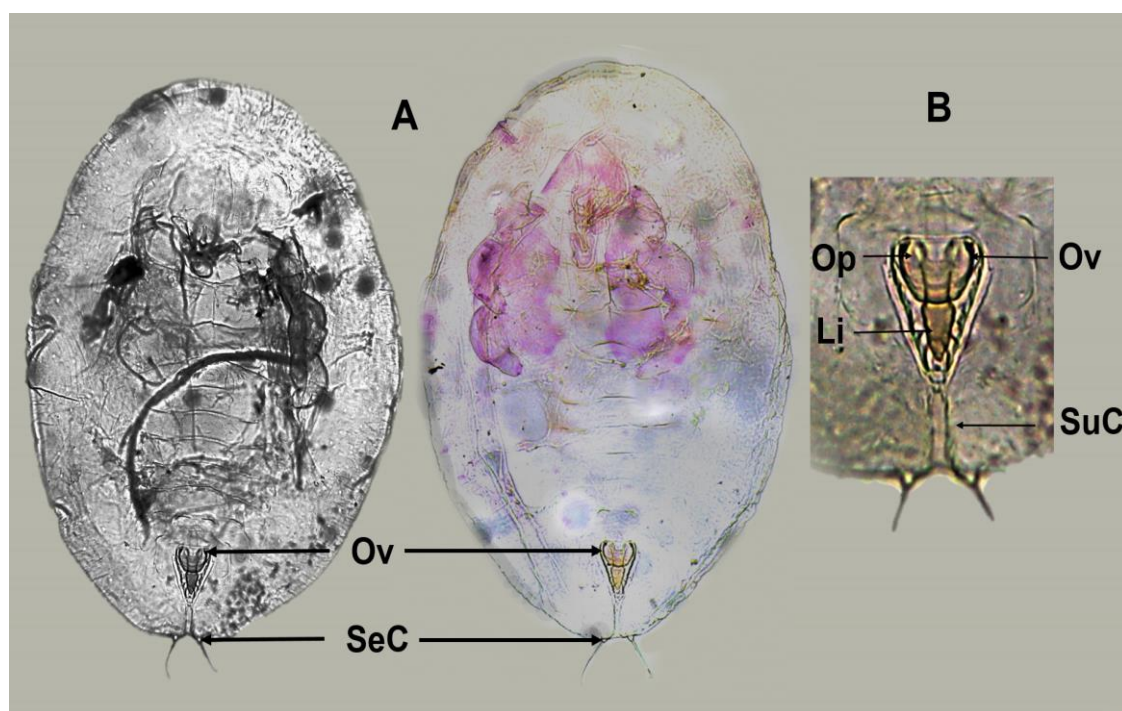


Figura 2. Características morfológicas de *Bemisia tabaci*, ninfa IV. A) Vista ventral B) Caracteres del Orificio vaciforme (Ov), seta caudal (SeC), língula (Li), opérculo (Op), surco caudal (SuC).

Detección del SLCV en el vector

El análisis de 100 especímenes de mosca blanca colectadas en calabaza (*C. pepo*) en Cocula Guerrero, los análisis de PCR y secuenciación evidenciaron que los especímenes de *B. tabaci* portaban al virus de la hoja rizada de la calabaza (SLCV), lo que resultó en fragmentos de aproximadamente 489 pb comprobándose la presencia de este virus en 2014. Después de secuenciar los productos de PCR del ADN del virus obtenido de las moscas blancas se compararon con las secuencias del GenBank y se encontró en las muestras de 2014 una similitud de 99 % con el virus SLCV.

Patogenicidad

Ocho días después de la introducción de mosquita blanca a las jaulas, se manifestaron síntomas severos de enrollamiento de la hoja de calabaza, como enrollamiento de hojas, retraso del crecimiento, epinastia, clorosis intervenal y moteado de hojas, síndrome que coincide con los descritos por Sufrin y Lapidot (2011) (Figura 3), así como por Kuan *et al.* (2010) y Tahir *et al.* (2010) quienes estudiaron el *squash leaf curl virus* (SLCV) en cucurbitáceas en Taiwan y Pakistán. Los resultados de esta prueba indicaron que el SLCV transmitido por *B. tabaci* en calabacita var. Gray Zucchini es patogénico; las plantas usadas como control se mantuvieron libres de la enfermedad (Figura 3).

Detección del SLCV en tejido vegetal

De las hojas de plantas inoculadas con SLCV por medio de *B. tabaci*, aunado a los análisis de PCR y secuenciación, se encontró que las hojas con síntomas de virosis obtenidas de la prueba de patogenicidad, eran portadoras del SLCV.

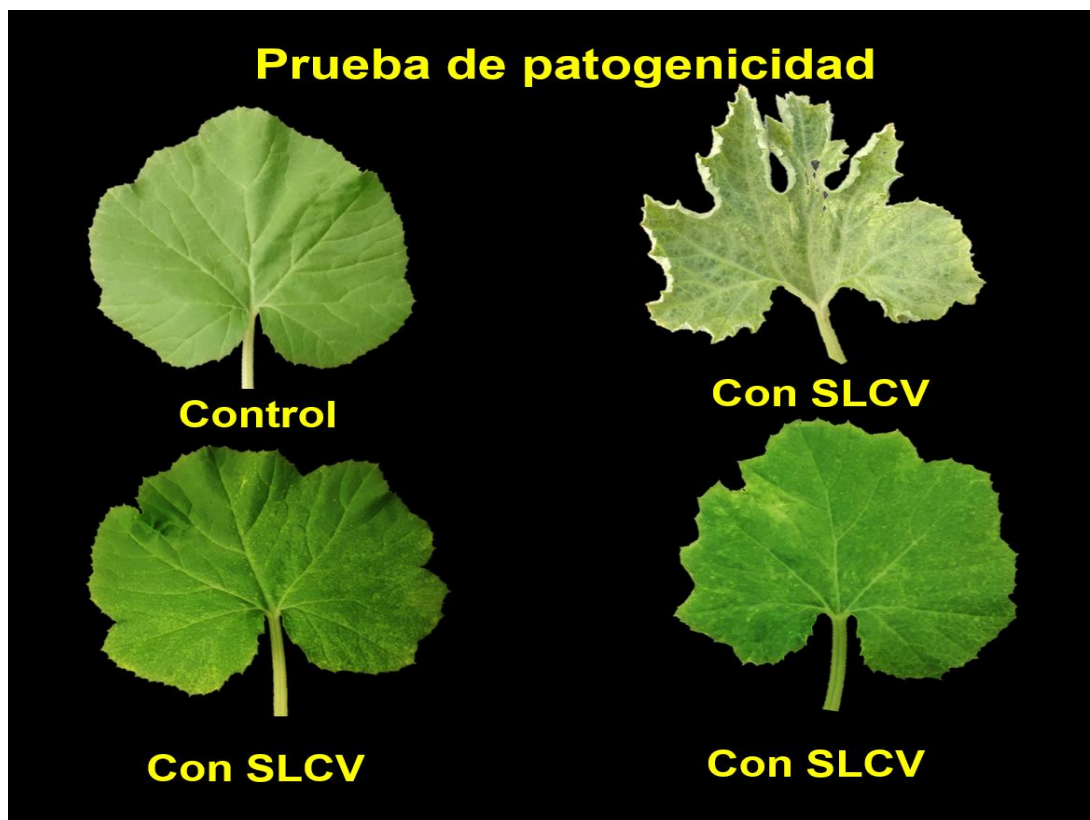


Figura 3. Síntomas de SLCV. Planta sana (superior izquierda) y plantas infectadas con *Squash leaf curl virus* (inferior izquierda, y superior e inferior derecha).

Análisis filogenético

La secuencia del genoma del virus obtenida del vector y tejido vegetal se depositó en el Banco de Genes (Genbank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (accesión KX620946.1 DAAV-m y KX620948.1 DAAV-2). El análisis filogenético mostró que el SLCV encontrado en vector y tejido en Guerrero, México estuvo estrechamente relacionado con las accesiones de SLCV reportadas en El Cairo (DQ285019) y El Valle Imperial de California (USA) (DQ285016) con valor bootstrap del 96 % en ambos casos; además estas accesiones de origen americano y la de Medio Oriente, se diferenciaron del grupo de accesiones asiáticas (AM260206, EU47910 y EFQ99774) (75 y 82 % respectivamente) (Figura 4).

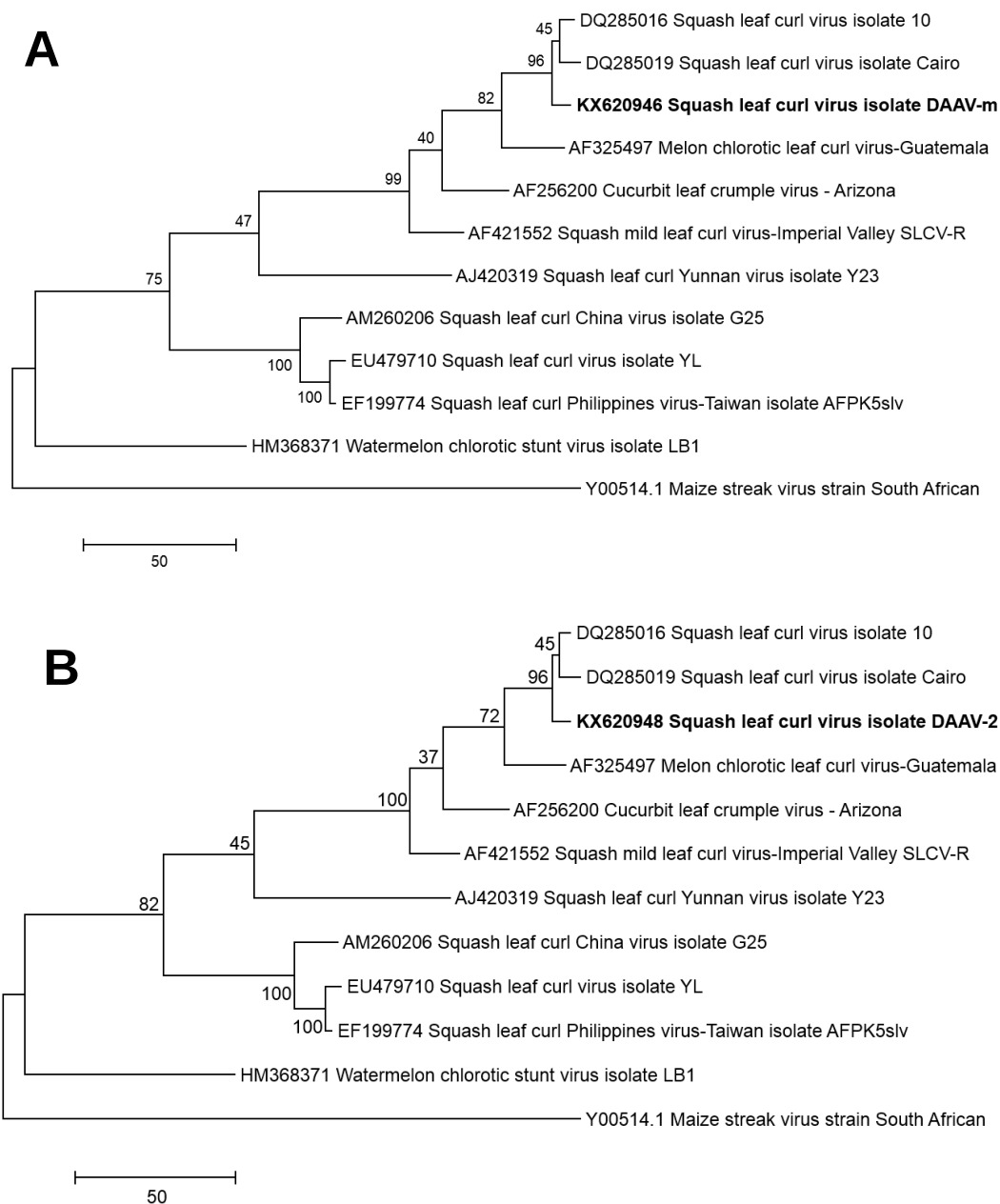


Figura 4. Árbol filogenético del SLCV en vector (A) y en tejido vegetal (B), obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio.

Manejo integrado en campo

Adultos y ninfas de *B. tabaci*

Análisis individual por año y genotipo. Se encontraron diferencias significativas, para años y genotipos en todos los muestreos; en el genotipo Depredador, la mayor incidencia de adultos de mosca blanca (AMB) se registró en el muestreo 4 del ciclo invierno-primavera del 2015 (I-P 2015) con 1.67 individuos, en el muestreo cuatro del ciclo invierno-primavera del 2014 (I-P 2014), se registró el menor promedio de incidencia de AMB (0.49). La mayor población de ninfas de mosca blanca (NMB) se registró en el muestreo 3 (1.59) y 4 (0.97) de los ciclos I-P 2014 y 2015, respectivamente (Cuadro 3). En el genotipo Grey zucchini, se encontró que en los muestreos 2 y 1 hubo la menor incidencia de ninfas con un promedio de 0.54 y 0 en los ciclos I-P 2014 y 2015, respectivamente. El mayor promedio de ninfas se obtuvo en el muestreo 4 con 2.01 especímenes en el ciclo I-P 2015 (Cuadro 3).

En el genotipo Depredador, los tratamientos con imidacloprid (Confidor®), imidacloprid+spiromesifen (Oberon®) y spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), en el ciclo I-P 2014 registraron la menor incidencia de AMB, en el resto de los tratamientos la población fluctuó de 1 a 1.31 en promedio. En el ciclo I-P 2015 los productos imidacloprid (Confidor®) y Azadiractina (Benefit®) mostraron el mejor desempeño porque registraron el menor promedio de AMB (Cuadro 3). El menor promedio de NMB en el ciclo I-P 2014 se obtuvo con los productos spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid+betacyfluthrin (Muralla max), spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE) eimidacloprid (Confidor®). Durante el ciclo I-P 2015 el Azadiractina (Benefit®) mostró los mejores resultados al evidenciar el menor promedio de NMB con 0.48, en el resto de tratamientos la incidencia de la plaga fluctuó de 0.5 a 0.75 (Cuadro 3).

El genotipo Grey Zucchini en los ciclos I-P 2014 y 2015, los tratamientos que mostraron la menor población de AMB fueron el spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE) y imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat

(Movento®) respectivamente. El menor promedio de NMB en el ciclo I-P 2014 se obtuvo con imidacloprid (Confidor®), Azadiractina (Benefit®) y spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®); mientras que en el ciclo I-P 2015 los insecticidas que provocaron la menor incidencia de NMB fueron spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid+betacyfluthrim (Muralla® max) (Cuadro 3).

Análisis combinado a través de genotipos por año. En el ciclo I-P 2014, no existió diferencia estadística entre genotipos en AMB y NMB, los muestreos y tratamientos en ambas características exhibieron diferencias significativas. El muestro 3 y el insecticida botánico Azadiractina (Benefit®) consiguieron obtener el menor promedio de AMB. Además en el muestreo 2 y con el uso de los insecticidas spiromesifen (Oberon®) + imidacloprid + betacyfluthrim (Muralla® max), se percibió el menor promedio de NMB (Cuadro 4).

Por otra parte en el ciclo I-P 2014, se detectó diferencia significativa únicamente para genotipos y muestreos; el genotipo Grey Zucchini logró obtener la menor incidencia de AMB, en cuanto a NMB el menor promedio lo obtuvo el genotipo Depredator. Fue el primer muestreo el que exhibió la menor población de AMB y NMB; a pesar de que en los tratamientos mostraron un comportamiento estadístico similar, los insecticidas spiromesifen (Oberon®) + imidacloprid + betacyfluthrim (Muralla® max), lograron registrar la menor presencia de la plaga (Cuadro 4).

Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo, genotipos y muestreos. En el número de AMB, solo existió diferencia significativa para ciclos de cultivo, muestreo y tratamientos; en el ciclo I-P 2015, primer muestreo y el tratamiento con spiromesifen (Oberon®) + imidacloprid + betacyfluthrim (Muralla® max), fueron los más destacados ya que se sostuvo el menor promedio de AMB. Para el número de NMB solamente se detectó diferencia significativa en el factor genotipo, muestreo y tratamientos; de tal manera que igualmente que para AMB en el primer muestreo y con spiromesifen (Oberon®) + imidacloprid + betacyfluthrim (Muralla® max), se obtuvo la menor incidencia de la plaga NMB (Cuadro 5).

Cuadro 3. Análisis individual por año y genotipo, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del número de adultos (AMB) y ninfas (NMB) de *Bemisia tabaci*, en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

	Genotipo Depredador				Genotipo Grey Zucchini			
	Ciclo invierno-primavera 2014		Ciclo invierno-primavera 2015		Ciclo invierno-primavera 2014		Ciclo invierno-primavera 2015	
	AMB	NMB	AMB	NMB	AMB	NMB	AMB	NMB
Muestreo								
1	1.08 b [†]	0 c	1.04 b	0.71 b	0.87 b	0.3 c	0 b	0.45 b
2	1.46 a	0.19 bc	1.54 a	0.28 c	0.54 c	0.49 ab	0.49 a	0.43 b
3	1.19 ab	1.59 a	0.81 b	0.47 c	0.58 c	0.6 ab	0.47 a	0.21 c
4	0.49 c	0.45 bc	1.67 a	0.97 a	1.17 a	0.47 b	0.4 a	2.01 a
DSH	0.29	0.30	0.33	0.19	0.20	0.13	0.11	0.22
Trat.								
T1	0.9 a	0.29 d	1 b	0.6 a	0.73 ab	0.42 a	0.38 ab	0.92 a
T2	1.1 a	0.44 bcd	1 b	0.48 a	0.88 ab	0.42 a	0.31 ab	0.88 ab
T3	1 a	0.5 bcd	1.4 ab	0.75 a	0.92 a	0.46 a	0.31 ab	0.81 ab
T4	0.94 a	0.83 abc	1.08 b	0.69 a	0.81 ab	0.52 a	0.31 ab	0.81 ab
T5	1.31 a	0.4 bc	1.4 ab	0.65 a	0.83 ab	0.46 a	0.25 b	0.75 ab
T6	1.08 a	0.63 abcd	1.31 ab	0.69 a	0.75 ab	0.52 a	0.44 a	0.85 ab
T7	0.96 a	0.29 d	1.67 a	0.65 a	0.92 ab	0.48 a	0.31 ab	0.77 ab
T8	1.11 a	0.27 d	1.14 b	0.55 a	0.66 ab	0.45 a	0.34 ab	0.55 b
T9	1.04 a	1.04 bcd	1.13 b	0.5 a	0.79 ab	0.42 a	0.4 ab	0.65 ab
T10	1.1 a	0.9 bcd	1.48 ab	0.5 a	0.58 b	0.5 a	0.35 ab	0.73 ab
DSH	0.46	0.47	0.52	0.30	0.32	0.21	0.18	0.34

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). AMB= Número de adultos de mosca blanca, NMB= Número de ninfas de mosca blanca. DSH: Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T2: Azadiractina (Benefit® 3 % CE, Agrícola Innovación), T3: Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80 %, DISTRIBUCIONES IMEX), T4: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86 %. SC, Bayer), T5: imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30 %. OD, Bayer), T6: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T7: spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T8: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrin (Muralla max 300 OD, Bayer), T9: spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T10: spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

Cuadro 4. Análisis combinado a través de genotipos por año, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, sobre el número de adultos (AMB) y ninfas (NMB) de *Bemisia tabaci*, en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

Genotipo	Ciclo invierno-primavera 2014		Ciclo invierno-primavera 2015	
	AMB	NMB	AMB	NMB
Depredador	1.05 a [†]	0.56 a	0.79 a	0.46 b
Grey Zucchini	1.26 a	0.61 a	0.34 b	0.77 a
DSH	0.69	0.49	0.15	0.19
Muestreo				
1	1.06 b	0.35 c	0.43 b	0.38 b
2	1.5 a	0.24 c	0.52 b	0.46 b
3	1.0 b	1.03 a	0.53 b	0.40 b
4	1.08 b	0.71 b	0.78 a	1.24 a
DSH	0.22	0.18	0.11	0.13
Trat.				
T1	0.95 a	0.45 a	0.55 a	0.67 a
T2	1.05 a	0.46 a	0.59 a	0.65 a
T3	1.20 ab	0.63 a	0.61 a	0.64 a
T4	1.01 ab	0.76 a	0.56 a	0.67 a
T5	1.35 ab	0.52 ab	0.54 a	0.60 a
T6	1.20 ab	0.66 ab	0.59 a	0.69 a
T7	1.32 abc	0.47 abc	0.62 a	0.63 a
T8	1.13 abc	0.41 abc	0.50 a	0.50 a
T9	1.08 abc	0.77 abc	0.59 a	0.53 a
T10	1.29 abc	0.7 abc	0.47 a	0.61 a
DSH	0.34	0.28	0.18	0.20

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). AMB= Número de adultos de mosca blanca, NMB= Número de ninfas de mosca blanca. DSH: Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T2: Azadiractina (Benefit® 3 % CE, Agrícola Innovación), T3: Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80 %, DISTRIBUCIONES IMEX), T4: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86 %. SC, Bayer), T5: imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30 %. OD, Bayer), T6: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T7: spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T8: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrin (Muralla max 300 OD, Bayer), T9: spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T10: spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

Cuadro 5. Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015, genotipos y muestreos, sin incluir al tratamiento testigo, sobre el número de adultos (AMB) y ninfas (NMB) de *Bemisia tabaci*, en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

	AMB	NMB
Año		
2014	1.16 a [†]	0.58 a
2015	0.56 b	0.62 a
DSH	0.19	0.27
Genotipo		
Depredador	0.92 a	0.51 b
Grey Zucchini	0.80 a	0.69 a
DSH	0.23	0.17
Muestreo		
1	0.75 b	0.36 c
2	1.01 a	0.35 c
3	0.76 b	0.72 b
4	0.93 a	0.97 a
DSH	0.16	0.14
Trat.		
T1	0.75 b	0.56 ab
T2	0.82 ab	0.55 ab
T3	0.91 ab	0.63 a
T4	0.79 ab	0.71 a
T5	0.95 a	0.56 ab
T6	0.9 ab	0.67 a
T7	0.97 a	0.55 ab
T8	0.81 ab	0.45 b
T9	0.84 ab	0.65 a
T10	0.88 ab	0.66 a
DSH	0.19	0.17

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). AMB= Número de adultos de mosca blanca, NMB= Número de ninfas de mosca blanca. DSH: Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T2: Azadiractina (Benefit® 3 % CE, Agrícola Innovación), T3: Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80 %, DISTRIBUCIONES IMEX), T4: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86 %. SC, Bayer), T5: imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30 %. OD, Bayer), T6: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T7: spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T8: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrin (Muralla max 300 OD, Bayer), T9: spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T10: spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

Porcentaje de reducción de moscas blancas (PRMB)

Análisis individual por año y genotipo. Para esta variable existió diferencia altamente significativa en ambos genotipos y ciclos de cultivo. En el genotipo Depredador durante el ciclo I-P 2014, todos los tratamientos usados tuvieron un desempeño sobresaliente, el imidacloprid (Confidor®) obtuvo el PRMB más alto; en el ciclo I-P 2015 nuevamente el imidacloprid (Confidor®) mostró el PRMB más destacado porque obtuvo 97.92 % de RMB. En ambos ciclos de cultivo I-P 2014 y 2015, el PRMB fluctuó de 95.55 a 98.06 % (Cuadro 6).

En el genotipo Grey Zucchini, en los ciclos I-P 2014 y 2015, los productos spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®) y spiromesifen (Oberon®) + imidacloprid + betacyfluthrim (Muralla® max), fueron los que exhibieron el mejor comportamiento, porque en ellos se registró el mayor PRMB con 96.83 y 98.52%, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis individual por año y genotipo, del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del porcentaje de control de *Bemisia tabaci* en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

Trat.	Genotipo Depredador		Genotipo Grey Zucchini	
	Ciclo 2014	Ciclo 2015	Ciclo 2014	Ciclo 2015
T1	0.00 c†	0.00 b	0.00 c	0.00 b
T2	98.06 a	97.92 a	96.31 ab	98.04 a
T3	97.08 a	97.64 a	96.79 a	98.11 a
T4	97.39 a	97.56 a	94.04 b	98.35 a
T5	97.53 a	96.99 a	95.59 ab	98.12 a
T6	95.55 b	97.09 a	94.25 b	98.31 a
T7	97.01 ab	97.72 a	94.90 ab	97.87 a
T8	96.88 ab	96.99 a	94.93 ab	98.08 a
T9	97.43 a	97.52 a	96.64 a	98.52 a
T10	97.38 a	97.79 a	96.83 a	98.51 a
T11	96.73 ab	97.71 a	96.34 ab	98.16 a
DSH	1.48	1.27	2.34	0.83

†Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: Testigo, T2: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T3: Azadiractina (Benefit® 3% CE, Agrícola Innovación), T4: Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80%, DISTRIBUCIONES IMEX), T5: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86%. SC, Bayer), T6: imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30%. OD, Bayer), T7: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T8: spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T9: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrim (Muralla max 300 OD, Bayer), T10: spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T11: spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

Análisis combinado a través de genotipos por año. El buen efecto de los productos utilizados, en comparación con el testigo permitió que se manifestaran diferencias significativas en ambos ciclos de cultivo. Se observó que todos los productos utilizados ejercieron una excelente reducción de mosca blanca, en los ciclos I-P 2014 y 2015 el insecticida imidacloprid (Confidor®) provocó el máximo PRMB manifestado con 97.18 y 97.98%, respectivamente (Figura 5).

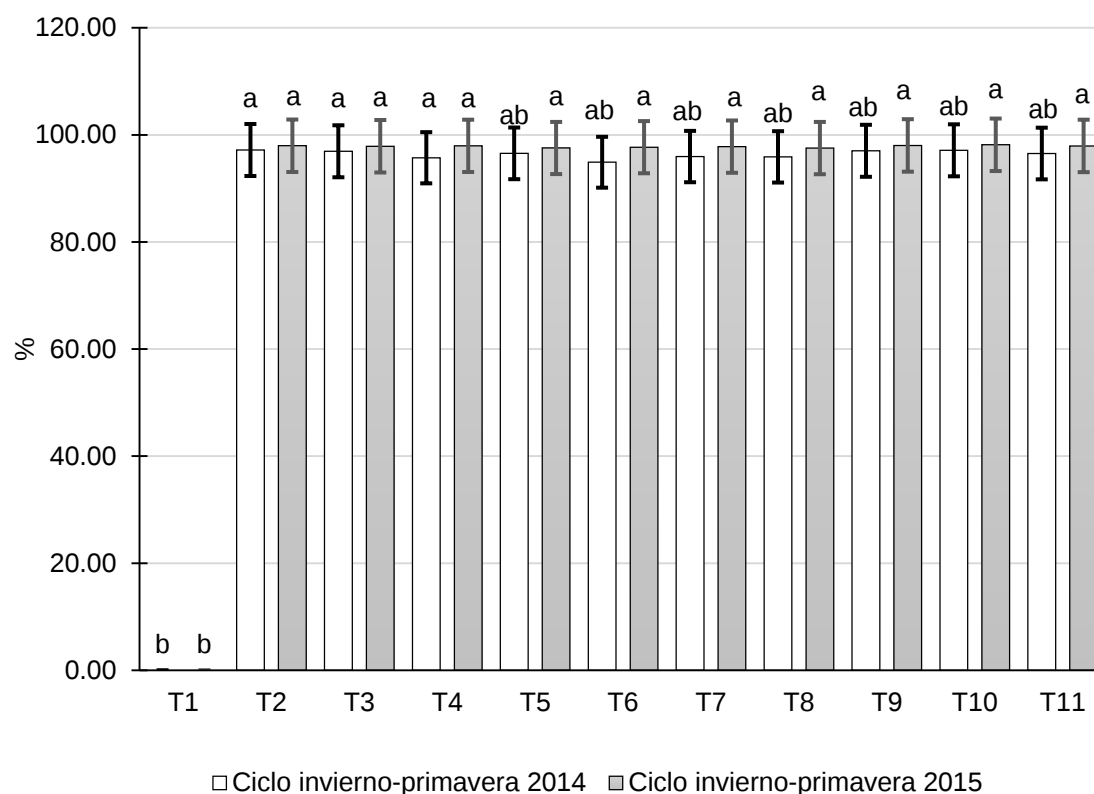


Figura 5. Porcentaje de reducción de moscas blancas *Bemisia tabaci* (PRMB) a través de genotipos, en los ciclos de cultivo 2014 y 2015, en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo, genotipos y muestreos.

El PRMB mostró diferencias significativas, los insecticidas utilizados ejercieron un buen control porque redujeron significativamente el número de moscas blancas, de tal modo que los productos spirotetramat (Movento®)+Azadiractina

(Benefit®), fueron los más sobresalientes porque evidenciaron un PRMB de 97.63% (Figura 6).

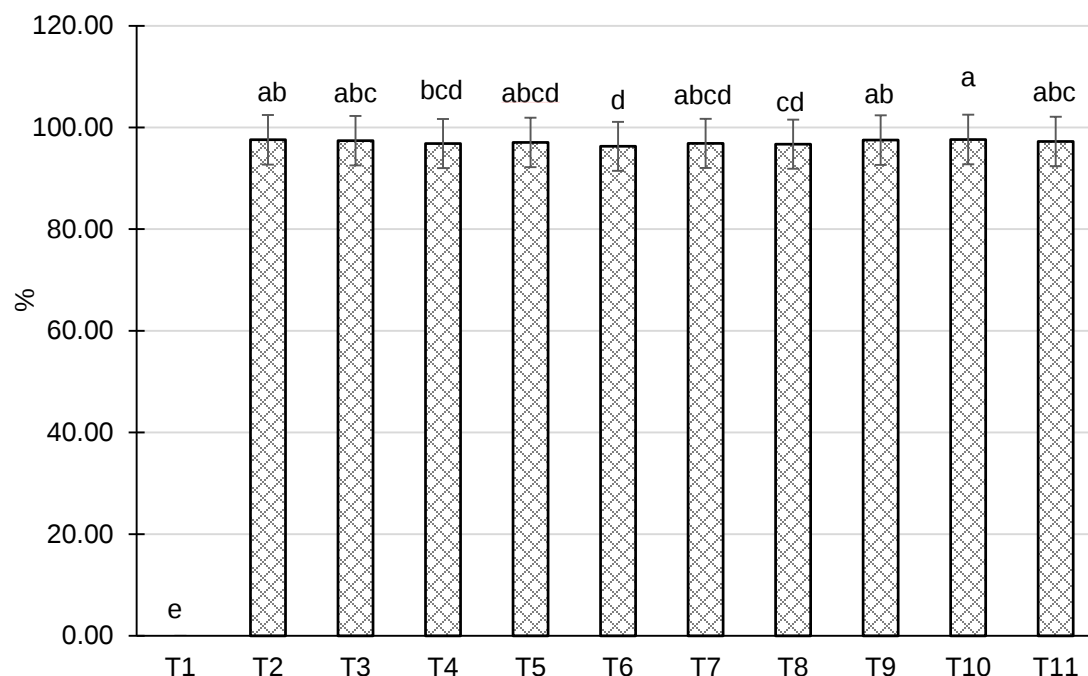


Figura 6. Porcentaje de reducción de moscas blancas *Bemisia tabaci* (PRMB) a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015, genotipos y muestreos, en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

Porcentaje de incidencia y severidad del SLCV

Análisis individual por año y genotipo. Estos dos caracteres fueron afectados significativamente por el muestreo, y tratamientos en los ciclos de cultivo I-P 2014 y 2015 y ambos genotipos. Los genotipos Depredator y Grey Zucchini en ambos ciclos de cultivo registraron el menor porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) en el primer muestreo, del mismo modo el PI y PS exhibió un comportamiento exponencial porque en el último muestro se registraron los porcentajes más altos (Cuadro 7).

En ambos genotipos, Depredator y Grey Zucchini durante el ciclo P-I 2014, los insecticidas imidacloprid (Confidor®)+spiromesifen (Oberon®), consiguieron el

menor PI y PS con 13.33 y 5.56% de incidencia y para severidad 3.89 y 1.39% respectivamente; mientras que en el ciclo P-I 2015 se observó una notable reducción del PI y PS en los dos genotipos con el uso del insecticida de origen vegetal Azadiractina (Benefit®), porque solo obtuvieron 16.67, 15.56% de incidencia y 7.78, 8.89% de severidad, respectivamente (Cuadro 7).

Análisis combinado a través de genotipos por año. El genotipo no se diferenció estadísticamente, sin embargo en el genotipo Depredador se registró el menor PI y PS en los dos ciclos de cultivo (2014 y 2015); en el factor muestreo y tratamientos se detectaron diferencias significativas, de tal modo que en el primer muestreo de los ciclos I-P 2014 y 2015, se identificó un reducido PI y PS, que incrementó significativamente a través del tiempo en los muestreos posteriores; de manera semejante a los insecticidas imidacloprid (Confidor®)+spiromesifen (Oberon®), se les atribuyó el menor PI y PS (Cuadro 8).

Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo, genotipos y muestreos. Los ciclos de cultivo 2014-2015 y los genotipos no se diferenciaron estadísticamente, por otro lado los promedios indicaron que existieron diferencias estadísticas en los factores muestreo y tratamientos. A pesar de no existir evidencia significativa en el ciclo I-P 2015 y genotipo Depredador se obtuvo el mínimo PI y PS, y nuevamente los insecticidas que provocaron la menor incidencia y severidad de virosis fueron el imidacloprid (Confidor®)+spiromesifen (Oberon®) (Cuadro 9).

Cuadro 7. Análisis individual por año y genotipo, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) del Squash leaf curl virus en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

	Genotipo Depredador				Genotipo Grey Zucchini			
	Ciclo invierno-primavera 2014		Ciclo invierno-primavera 2015		Ciclo invierno-primavera 2014		Ciclo invierno-primavera 2015	
	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS
Muestreo								
1	27.67 b [†]	11.33 b	26 b	9.67 b	22.67 b	9.83 b	20.33 b	8.42 b
2	39.67 a	16.25 ab	45.33 a	17.33 a	37.33 a	14.17 ab	40 a	15.17 a
3	50.67 a	20.67 ab	53.67 a	22.58 a	45 a	17.08 ab	46 a	20.17 a
DSH	11.76	7.08	10.45	6.08	15.26	7.51	12.81	6.50
Trat.								
T1	22.22 cd	8.33 b	31.11 cd	13.06 ab	18.89 bc	5 b	24.44 bc	9.44 b
T2	31.11 cd	10 b	16.67 d	7.78 b	26.67 b	8.06 b	15.56 c	8.89 b
T3	31.11 cd	8.33 b	51.11 abc	25 a	35.56 b	10.56 b	53.33 a	25.83 a
T4	13.33 d	3.89 b	33.33 bcd	12.5 ab	5.56 c	1.39 b	23.33 bc	11.39 b
T5	40 c	14.72 b	18.89 d	8.33 b	32.22 b	11.39 b	33.33 abc	10.83 b
T6	33.33 cd	13.33 b	61.11 ab	21.39 ab	22.22 bc	7.5 b	35.56 abc	11.94 b
T7	31.11 cd	10 b	44.44 abcd	17.5 ab	35.56 b	8.89 b	35.56 abc	16.67 ab
T8	37.78 c	13.61 b	47.78 abc	18.33 ab	36.67 b	11.94 b	41.11 ab	19.44 ab
T9	64.44 a	34.72 a	63.33 a	24.17 a	60 a	33.06 a	56.67 a	17.5 ab
T10	88.89 b	43.89 a	48.89 abc	17.22 ab	76.67 a	39.17 a	35.56 abc	13.89 b
DSH	21.48	12.92	27.86	13.72	19.08	11.09	23.40	11.87

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). DSH: Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T2: Azadiractina (Benefit® 3% CE, Agrícola Innovación), T3: Aceite paraafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80%, DISTRIBUCIONES IMEX), T4: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86%. SC, Bayer), T5: imidacloprid (Confidor®)+spirotramat (Movento® 15.30%. OD, Bayer), T6: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T7: spiromesifen (Oberon®)+Aceite paraafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T8: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrin (Muralla max 300 OD, Bayer), T9: spirotramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T10: spirotramat (Movento®)+Aceite paraafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

Cuadro 8. Análisis combinado a través de genotipos por año, sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2014 y 2015, del porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) del Squash leaf curl virus en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

	Ciclo invierno-primavera 2014		Ciclo invierno-primavera 2015	
	PI	PS	PI	PS
Genotipo				
Depredador	39.33 a [†]	16.08 a	35.00 a	13.69 a
Grey Zucchini	41.67 a	16.53 a	35.44 a	14.58 a
DSH	44.18	16.77	53.69	18.70
Muestreo				
1	26.83 c	10.50 c	21.50 b	9.13 b
2	42.50 b	16.79 b	38.67 a	14.67 a
3	52.17 a	21.63 a	45.50 a	18.63 a
4	9.02	4.79	7.81	4.16
DSH				
Trat.				
T1	26.67 cd	10.69 bc	21.67 def	7.22 e
T2	23.89 d	8.89 bc	21.11 ef	8.47 de
T3	41.11 bc	16.67 bc	44.44 ab	18.19 bc
T4	23.33 d	8.19 c	14.44 f	6.39 e
T5	29.44 cd	11.53 bc	32.78 bcde	11.11 de
T6	47.22 b	17.36 b	28.89 cde	9.72 de
T7	37.78 bcd	13.75 bc	35.56 bcd	12.78 cde
T8	42.78 bc	15.97 bc	38.89 bc	15.69 cd
T9	63.89 a	29.44 a	58.33 a	25.28 ab
T10	68.89 a	30.56 a	56.11 a	26.53 a
DSH	16.47	8.74	14.26	7.59

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). DSH: Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T2: Azadiractina (Benefit® 3% CE, Agrícola Innovación), T3: Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80%, DISTRIBUCIONES IMEX), T4: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86%. SC, Bayer), T5: imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30%. OD, Bayer), T6: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T7: spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T8: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrim (Muralla max 300 OD, Bayer), T9: spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T10: spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

Cuadro 9. Análisis combinado a través de los ciclos de cultivo 2014 y 2015 y genotipos, sin incluir al tratamiento testigo, del porcentaje de incidencia (PI) y severidad (PS) del Squas leaf curl virus en el cultivo de calabaza (*Cucurbita pepo*).

	PI	PS
Año		
2014	40.50 a [†]	16.31 a
2015	35.22 a	14.14 a
DSH	7.43	4.10
Genotipo		
Depredador	37.17 a	14.89 a
Grey Zucchini	38.56 a	15.56 a
DSH	22.43	8.10
Muestreo		
1	24.17 c	9.81 c
2	40.58 b	15.73 b
3	48.83 a	20.13 a
4	6.25	3.35
DSH		
Trat.		
T1	24.17 ed	8.96 cd
T2	22.50 ed	8.68 cd
T3	42.78 b	17.43 b
T4	18.89 e	7.29 d
T5	31.11 cd	11.32 bcd
T6	38.06 bc	13.54 bc
T7	36.67 bc	13.26 bcd
T8	40.83 bc	15.83 b
T9	61.11 a	27.36 a
T10	62.50 a	28.54 a
DSH	11.41	6.12

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). Diferencia Significativa Honesta de LSD. T1: imidacloprid (Confidor® SC 350, Bayer), T2: Azadiractina (Benefit® 3% CE, Agrícola Innovación), T3: Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE 80%, DISTRIBUCIONES IMEX), T4: imidacloprid+spiromesifen (Oberon® 22.86%. SC, Bayer), T5: imidacloprid (Confidor®)+spirotetramat (Movento® 15.30%. OD, Bayer), T6: spiromesifen (Oberon®)+Azadiractina (Benefit®), T7: spiromesifen (Oberon®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE), T8: spiromesifen (Oberon®)+imidacloprid y betacyfluthrim (Muralla max 300 OD, Bayer), T9: spirotetramat (Movento®)+Azadiractina (Benefit®), T10: spirotetramat (Movento®)+Aceite parafínico de petróleo (SAF-T-SIDE).

La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) y sus biotipos se han convertido en una gran amenaza para la agricultura en todo el mundo, especialmente cultivos a cielo abierto debido al daño directo que infringen y su capacidad para transmitir virus.

En la presente investigación se encontró que la mayor incidencia de AMB y NMB así como el PI y PS se manifestó en el genotipo de calabaza Grey Zucchini. Al respecto, la preferencia de la mosca blanca por las plantas de calabaza Grey Zucchini podría estar asociada con uno o más de los cambios inducidos por virus como clorosis y amarillamiento de las venas. Así por ejemplo, Shrestha *et al.* (2017) estudiaron efectos mediados por el hospedante del virus amarillento de la vejiga de la calabaza transmitido por mosca blanca, su comportamiento y aptitud; reportaron que las plantas de calabaza infectadas exhibieron distintos síntomas de amarillamiento de las venas y áreas de hojas verdes claras y venas amarillas, lo que podría provocar que las moscas blancas según los autores orienten hacia las plantas infectadas, en este caso en particular el genotipo Grey zucchini es susceptible al begomovirus. De este modo se puede mencionar en base al antecedente mencionado que la mayor incidencia de adultos y ninfas de *B. tabaci* se encontró en el genotipo Grey Zucchini porque en general mostró una clorosis generalizada durante todo el ciclo de cultivo en 2014 y 2015.

Por otra parte, la menor y mayor incidencia de AMB y NMB así como el PI y PS se manifestó en el primer y último muestreo, respectivamente; Syed *et al.* (2016) analizaron la dinámica de población de *Bemesia tabaci* en el cultivo de mostaza *Brassica campestris* L., los reportes mostraron que la población media de mosca blanca varió en las diferentes fechas de evaluación y fenología del cultivo. Del mismo modo los autores refieren que además de que la dinámica de población se relaciona con la fenología del cultivo, la temperatura juega un papel importante porque reportaron que la incidencia baja de la plaga se registró en invierno (diciembre) e incremento significativamente en primavera (marzo). Los resultados obtenidos en el presente estudio, corroboran lo que reportó Curnutte *et al.* (2014) quienes evaluaron el efecto de la temperatura sobre el comportamiento biológico de *B. tabaci*; reportaron que la oviposición, la supervivencia de las ninfas y la reproducción fueron afectadas significativamente por la temperatura. La relación entre la severidad y la temperatura observada en este trabajo, coincide con lo reportado por Ali *et al.* (2014) quienes estudiaron el geminivirus de la hoja rizada del algodón, basados en modelos predictivos con variables ambientales, y

reportaron que las temperaturas entre 37.16 y 37.78 ° C, propician el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, la temperatura promedio mínima de 27.43 ° C fue favorable para la incidencia de geminivirus en algodón y mostró efecto significativo durante dos ciclos de cultivo.

La aplicación de insecticidas sigue siendo la forma más efectiva de controlar *B. tabaci* en la producción agrícola, y los insecticidas utilizados incluyen organofosforados, carbamatos, piretroides, reguladores del crecimiento de insectos y neonicotinoides. Sin embargo, debido al uso indebido de insecticidas, *B. tabaci* ha desarrollado una alta resistencia a muchos insecticidas de uso común y especialmente a los neonicotinoides (Wang *et al.*, 2010; Vassiliou *et al.*, 2011; Kontsedalov *et al.*, 2012) Por lo tanto, para el manejo de *B. tabaci* se necesitan nuevos insecticidas que sean amigables con el medio ambiente y que tengan modos de acción novedosos.

Los neonicotinoides funcionan al interferir con la transmisión neuronal en el sistema nervioso central. Se unen a los receptores de acetilcolina nicotínicos (*n* AChR) en la neurona postsináptica, actuando como "neurotransmisores falsos" (agonistas). Esta interferencia con la señalización del neurotransmisor de acetilcolina provoca la activación continua del receptor, lo que conduce a síntomas de neurotoxicidad. Los neonicotinoides tienen mayor afinidad por los insectos que los mamíferos y otros receptores de vertebrados, por lo que su toxicidad para los mamíferos es menor que para los insectos y la reversibilidad de la intoxicación es mayor (Tomizawa y Casida 2005; Jeschke *et al.*, 2011).

El imidacloprid, un insecticida neonicotinoide, de amplio espectro que tiene altas propiedades sistémicas, puede transferirse rápidamente al tallo y hojas de la planta después de la absorción del suelo y causa rápidamente una alta mortalidad de plagas (Nauen *et al.*, 1999). Esto podría hacerlo efectivo contra las plagas del complejo de chupadores que incluye a *B. tabaci* (Wang *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2011). Existe evidencia de que el imidacloprid es muy efectivo contra varias plagas cuando se aplica mediante goteo (Zhang *et al.*, 2011). Van Iersel *et al.* (2001) encontraron que el imidacloprid proporcionó altos niveles de control con

acción prolongada contra *B. tabaci* cuando se aplicó en aplicación en drench en flor de nochebuena. El imidacloprid aplicado al suelo también manejó con éxito a la plaga vectora de virus, *Frankliniella fusca* (Hinds) (Thysanoptera: Thripidae), y redujo la incidencia del virus bronceado del tomate en plantas de tomate y pimiento (Groves *et al.*, 2001). La aplicación de imidacloprid en el suelo causó una mortalidad del 90% de adultos de *B. tabaci* en algodón después de 48 h (Paulson *et al.*, 2005), estos resultados con alta efectividad coinciden con el porcentaje de reducción de mosca blanca.

Sun y Liu (2016) estudiaron la eficacia de imidacloprid en combinación con fertilizante nitrogenado aplicado en plántulas de tomate contra *B. tabaci*; encontraron que a dosis de 12 mg i.a plántula⁻¹ causó la mayor mortalidad de adultos y ninfas de *B. tabaci*, además se registró el menor número de huevos. Generalmente, el imidacloprid se dispersa dentro del xilema y se degrada rápidamente después de la absorción de la raíz en la planta, y muchos metabolitos se producen al mismo tiempo (Sur y Stork, 2003). Los metabolitos 4 - hidroxí son activos contra *B. tabaci*, y la olefina puede tener una toxicidad muy amplia (Nauen *et al.*, 1999), lo que hace que esta molécula provoque una amplia reducción de la incidencia de mosca blanca en los cultivos que sean tratados con este insecticida. Además estos metabolitos prolongan la actividad insecticida residual de imidacloprid frente a *B. tabaci*, por lo que se ha encontrado que a 50 días después de la aplicación, la mortalidad de *B. tabaci* todavía ha sido superior al 60%. Además, algunos metabolitos derivados de imidacloprid, como la imidazolina, también muestran una alta toxicidad para pulgones como *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) (Nauen *et al.*, 1998b).

Entre los insecticidas botánicos actualmente comercializados, el aceite de neem es uno de los menos tóxicos para los humanos y muestra una toxicidad muy baja para los organismos benéficos, por lo que es muy prometedor para el control de muchas plagas (Campos *et al.*, 2016). El aceite se considera un insecticida de contacto, que presenta actividad sistémica y translaminar (Cox, 2002). Tiene un amplio espectro de acción, inhibe la alimentación, afecta la función hormonal en

etapas juveniles, reduce la ecdisona, desregula el crecimiento, altera el desarrollo y la reproducción, suprime la fertilidad, esteriliza, repele la oviposición y altera los procesos de muda (Brahmachari, 2004). Poco se sabe sobre el modo de acción de la azadiractina como inhibidor de la alimentación, aunque es posible que estimule las células implicadas en la inhibición de la alimentación, causando debilidad y muerte por plagas (Brahmachari, 2004).

La azadiractina, la salanina y otros limonoides presentes en el aceite de neem inhiben la ecdisona 20-monooxigenasa, la enzima responsable de catalizar el paso final en la conversión de ecdisona a la hormona activa, 20-hidroxiecdisona, que controla el proceso de metamorfosis de los insectos. Sin embargo, estos efectos son probablemente secundarios a la acción de la azadiractina en el bloqueo de la formación de microtúbulos en células que se dividen activamente (Morgan, 2009). Además, la azadiractina puede inhibir la liberación de hormona protroracicotrópica y allatotropinas del complejo cerebro-cuerpo cardíaco, lo que provoca problemas de fertilidad y fecundidad. El meliantriol y el salannin también actúan para inhibir la alimentación de insectos. La azadiractina también puede interferir en la mitosis, de la misma manera que la colchicina, y tiene efectos histopatológicos directos sobre las células epiteliales del intestino de los insectos, los músculos y los tejidos grasos, resultando en movimientos restringidos y disminución de la actividad de vuelo (Qiao *et al.*, 2014).

De Almeida *et al.* (2014) compararon la eficacia de diversos aceites botánicos frente a diferentes etapas de la vida de *B. tabaci* y sus impactos en la transmisión de begomovirus en frijol; reportaron que las ninfas de mosca blanca son la etapa más susceptible a los aceites botánicos entre ellos el neem. Los aceites fueron regularmente efectivos contra los adultos de *B. tabaci*, los aceites botánicos no evitaron la transmisión del virus del mosaico dorado en frijol; sin embargo citaron que se pueden usar varios aceites botánicos para controlar las ninfas de mosca blanca en programas integrados; los resultado de estos autores coinciden con lo encontrado en el presente estudio porque con uso del neem como insecticida se

logró reducir la incidencia de ninfas, pero difieren porque con el insecticida botánico se disminuyó el porcentaje de severidad del SLCV en calabaza.

Rehman *et al.* (2015) investigaron la eficacia comparativa del extracto de neem y el insecticida lambdacialotrina contra mosca blanca en okra, los autores citaron que el insecticida lambdacihalotrina y el aceite de neem a 4 y 5% de concentración fueron igualmente efectivos contra la mosca blanca en plantas de okra. Por otra parte Abdel-Razek *et al.* (2017) evaluaron varios bioplaguicidas ecológicos contra *B. tabaci* en dos variedades de tomate de invernadero en Egipto, encontraron que con el uso de Azadiractina se obtuvo una reducción de más del 80% de mosca, estos resultados son similares a los que se obtuvieron en nuestro estudio, en donde los resultados en NMB, PS y PRMB disminuyó con el uso de Azadiractina (Benefit®).

Nauen *et al.* (2008) mencionan que el spirotetramat es un insecticida de tercera generación, nuevo y miembro de la familia de ketoenol, es totalmente sistémico y ambimobil, eficaz contra el complejo de chupadores que incluye a la mosca blanca. Como inhibidor de la biosíntesis de lípidos, spirotetramat es particularmente efectivo contra las etapas inmaduras de las plagas chupadoras de floema (Wachendorff *et al.*, 2002; Nauen *et al.*, 2005). Debido a sus propiedades únicas de translocación, es muy eficaz para controlar plagas ocultas como áfidos de la raíz y para proteger los brotes jóvenes y las hojas que aparecen después de la aplicación foliar. Spirotetramat no daña los cultivos, tiene una excelente fotoestabilidad y una buena actividad residual, y está activo en un amplio rango de temperatura (Nauen *et al.*, 2008). Varios informes han indicado que la sensibilidad a spirotetramat difería entre etapas adultas e inmaduras de diversas plagas, incluidas moscas blancas, áfidos y trips (Guillén *et al.*, 2014; Prabhaker *et al.*, 2014).

Peng *et al.* (2017) monitorearon la resistencia en campo de las etapas inmaduras de *Bemisia tabaci* a spirotetramat en China; encontraron que las ninfas fueron altamente sensibles al spirotetramat, resultados semejantes a los obtenidos en

el presente estudio en donde con el producto (Movento® Bayer) se registró una menor incidencia de ninfas de mosca blanca.

Prabhaker *et al.* (2014) estudiaron el efecto del spirotetramat durante un período de 2 años 19 poblaciones de *B. tabaci* procedentes de Arizona y California, informaron que el insecticida fue más efectiva contra etapas inmaduras que contra adultos de *B. tabaci*.

Xie *et al.* (2011), citan que al utilizar Movento, se tiene buen efecto en el control de *Bemisia tabaci* en condiciones de campo; este aumenta cuando se rota con otros productos de diferente grupo químico, dichos resultados coinciden con lo obtenido en el presente estudio con la utilización del Movento cuando se empleó en combinación con otros insecticidas, porque según Bruck *et al.* (2009), después de que penetra a través de la cutícula de la hoja y se transloca como espirotetramat-enol vía xilema y floema, hasta los brotes en crecimiento y hasta las raíces.

Los aceites parafínicos se obtienen de destilados de petróleo y está bien documentado su uso para el control de plagas (Buteler y Stadler, 2011), en el caso de *B. tabaci*, Cuthbertson y Collins (2015) investigaron la utilización del aceite parafínico como una estrategia de erradicación de *B. tabaci* en invernaderos; reportaron que su uso resultó excelente contra huevos de *B. tabaci* con un 100% de mortalidad, y poco menos efectivo contra ninfas de segundo instar porque registró una efectividad del 69%. En el presente estudio el producto SAF-T-SIDE® (Aceite parafínico de petróleo), provocó una disminución importante de adultos y ninfas de mosca blanca.

Al respecto, Najjar *et al.* (2008) informaron que los aceites derivados de petróleo tienen diferentes efectos sobre los insectos plaga, que los convierten en una alternativa de control, entre los que destacan es el bloqueo de espiráculos, causando que mueran por asfixia, también pueden actuar como venenos al interactuar con los ácidos grasos en el insecto y/o interferir con el metabolismo normal, además pueden alterar la alimentación de un insecto.

CONCLUSIONES

Características morfológicas de ninfas permitieron identificar a la población de mosca blanca como *Bemisia tabaci*.

Los análisis de PCR, secuenciación y filogenia confirmaron que los especímenes de mosca colectadas en el Valle de Cocula, Guerrero México, fueron portadoras del Squash Leaf Curl Virus (SLCV) (accesión KX620945.1 DAAV-m).

Se confirmó que SLCV es transmitido por *B. tabaci* e induce retraso grave del crecimiento y enrollamiento severo de hojas, además las pruebas moleculares y filogenia permitieron comprobar que muestras de hojas sintomáticas de plantas de calabaza utilizadas en la prueba de patogenicidad estaban infectadas por SLCV.

En condiciones de riego en trópico seco en los genotipos Depredador y Grey Zucchini, la aplicación de Confidor® (imidacloprid), Oberon® (spiromesifen) + (Muralla® max) (imidacloprid + betacyfluthrim), Benefit® (Azadiractina), Movento® (spirotetramat) + SAF-T-SIDE® (Aceite parafínico de petróleo), afectaron significativamente el número de adultos y ninfas de *B. tabaci* en los ciclos de cultivo 2014 y 2015.

La utilización del insecticida Confidor® (imidacloprid) en el genotipo de calabaza Depredador influyó en el porcentaje de reducción de la población de mosca blanca en ambos ciclos de cultivo.

El uso de los productos comerciales Movento® (spirotetramat) + SAF-T-SIDE® (Aceite parafínico de petróleo) y Movento® (spirotetramat) + Benefit® (Azadiractina), en el genotipo Grey Zucchini en los ciclos de cultivo 2014 y 2015, promovieron la menor incidencia de *B. tabaci*.

La aplicación de Confidor® (imidacloprid) + Oberon® (spiromesifen) y Benefit® (Azadiractina), provocaron la menor incidencia y severidad de virosis generada por el SLCV en ambos genotipos durante el 2014 y 2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Razek, A., El-Ghany, N., Djelouah, K. (2017). An evaluation of some eco-friendly biopesticides against *Bemisia tabaci* on two greenhouse tomato varieties in Egypt. *Journal of Plant Protection Research* 57(1): 9-17.
- Ali, S., Khan M., Talib Sahi S., Atiq M., Hannan A. (2014) Algodon leaf curl virus predictive model based on environmental variables. In: Ahmad P., Wani M., Azooz M., Phan Tran LS. (eds) *Improvement of Crops in the Era of Climate Change*. Springer, Nueva York.
- Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez, M. J. J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., Torrance, L. 2013. Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51: 177–201
- Brahmachari G. (2004). Neem an omnipotent plant: a retrospection. *Chembiochem* 5: 408–421.
- Bruck, E., Elbert, A., Fischer, R. (2009). Movento®, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Protection* 28: 838-844.
- Buteler, M. and Stadler, T. (2011). A review on the mode of action and current use of petroleum distilled spray oils. Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*, InTech, Croatia pp. 119-136.
- Carapia, R. V. E., Castillo, G. A. (2013). Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: aleyrodidae). *Acta Zoológica Mexicana* 29: 178-193.
- Cox C. (2002). Pyrethrins/pyrethrum insecticide factsheet. *J. Pestic. Reform* 22: 14–20.

- Curnutte, L., Simmons, A. and Abd-Rabou, S. (2014). Climate change and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): impacts of temperature and carbon dioxide on life history. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 107: 933-943.
- Cuthbertson, A. G. S., Collins, D. A. (2015). Tri-Tek (Petroleum Horticultural Oil) and *Beauveria bassiana*: Use in Eradication Strategies for *Bemisia tabaci* Mediterranean Species in UK Glasshouses. *Insects* 6: 133-140.
- De Almeida, M. M., Quintela, E. D., Mascarin, G. M., Fernandes, P. M., Arthurs, S. P. (2014). Management of *Bemisia tabaci* biotype B with botanical and mineral oils. *Crop Protection* 66: 127-132.
- Díaz, N. J. F., Alvarado, G. O. G., Leyva, M. S. G., Ayvar, S. S., Michel, A. A. C., Vargas, H. M. (2015). Identification and control of fungi causing fruits rot in pipiana pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber). *African Journal of Agricultural Research* 10(11): 1150-1157.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791. <http://www.jstor.org/stable/2408678>.
- Gerling, D. and Horowitz, A. R. (2010). Management of *Bemisia* in Diverse Cropping Systems. In: P.A., Stansly and S.E. Naranjo (eds). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer. pp 347-349.
- Guillén, J., Navarro, M., Bielza, P. (2014). Cross-resistance and baseline susceptibility of spirotetramat in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) *J. Econ. Entomol.* 107: 1239-1244.
- Hall, T. (2004) BioEdit version 7.0.0. Isis Pharmaceuticals Inc. 192 p. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/biodoc.pdf>.
- Hodges, G. S. and Evans, G. A. (2005). An identification guide to the whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the Southeastern United States. *Florida Entomologist* 88: 518-534.

- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2897–2908.
- Khan, I. A. and Wan, F. H. 2015. Life history of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B on tomato and cotton host plants. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3(3): 117-121.
- Kontsedalov, S., Abu-Moch, F., Lebedev, G., Czosnek, H., Horowitz, R. A., Ghanim, M. (2012). *Bemisia tabaci* biotype dynamics and resistance to insecticides in Israel during the years 2008-2010. *Journal of Integrative Agriculture* 11: 312-320.
- Kontsedalov, S., Gottlieb, Y., Ishaaya, I., Nauen, R., Horowitz, R. y Ghanim, M. (2009). Toxicity of spiromesifen to the developmental stages of *Bemisia tabaci* biotype B. *Pest. Manag. Sci.* 65: 5-13.
- Kuan, C. P., Wu, M. T., Lu, Y. L. Huang, H. C. (2010). Rapid detection of squash leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol Methods* 169: 61–65.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870–1874.
- Labanowska, B. H., Korzeniowski, M. Gasparski, T. (2014). Efficacy of spirotetramat in the control of the currant-sowthistle (*Hyperomyzus lactucae* L.) on blackcurrant plantations in Poland. *Journal of Horticulture Research* 21(2): 73-78.
- Morgan E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4096-4105.
- Muqit, A. and Akanda, A. M. (2007). Management of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* Through Netting. *The Agriculturists* 5(1&2): 1-5.

- Najar, R. A. J., Lavidis, N. A., Mensah, R. K., Choy, P. T., Walter, G. H. (2008). The toxicological effects of petroleum spray oils on insects - evidence for an alternative mode of action and possible new control options. *Food Chem. Toxicol.* 46: 3003–3014.
- Nauen, R. and Denholm, I. (2005). Resistance of Insect Pests to Neonicotinoid Insecticides: Current Status and Future Prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58: 200-215.
- Nauen, R. and Konanz, S. (2005). Spiromesifen as a new chemical option for the management of resistance in white flies and red spiders. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 58: 485 - 502
- Nauen, R., Reckmann, U., Armbrorst, S., Stupp, H. P., Elbert, A. (1999). Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants *Pestic. Sci.* 55: 265-271.
- Nauen, R., Reckmann, U., Thomzik, J., Thielert, W. (2008). Biological Profile of Spirotetramat (Movento), a New Two-Way Systemic (Ambimobile) Insecticide Against Sucking Pest Species. *Bayer CropScience Journal* 61 (2): 245-278
- Nauen, R., Schnorbach, H. J., Elbert, A. (2005). The biological profile of spiromesifen (Oberon®) – a new tetrone acid insecticide/acaricide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 58: 417–440.
- Nauen, R., Tietjen, K., Wagner, K., Elbert, A. (1998). Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) *Pestic. Sci.* 52: 53-57
- Nauen, R., Bretschneider, T., Elbert, A., Fischer, R., Tieman R. (2003). Spirodiclofen and spiromesifen. *Pestic Outlook* 14: 243 - 246
- Navas, C. J., Fiallo, O. E., Sánchez, C. S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 219–248.

- Neupane, S., Subedi, S., Thapa, R. B., Yubak-Dhoj, G. C., Pokhrel, S., Regmi, P. P., Shrestha, J. 2016. Efficacy of Biorational Compounds against Whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) on Blackgram (*Vigna mungo* L.). Journal of AgriSearch 3(1): 34-39.
- Nicaise, V. (2014). Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. Frontiers in Plant Science 5: 660.
- Paulson, G., Hull, L., Biddinger, D. (2005). Effect of a plant growth regulator prohexadione-calcium on insect pests of apple and pear. J. Econ. Entomol. 98: 423-431.
- Peng, Z., Zheng, H., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Zhang, Y. (2017). Field resistance monitoring of the immature stages of the whitefly *Bemisia tabaci* to spirotetramat in China. Crop Protection 98: 243-247.
- Prabhaker, N., Castle, S., Perring, T. M. (2014). Baseline susceptibility of *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) populations from California and Arizona to spirotetramat J. Econ. Entomol. 107: 773-780.
- Prabhaker, N., Castle, S. J., Buckelew, L., Toscano, N. C. (2008). The basal susceptibility of *Bemisia tabaci* B biotype (Hemiptera: Aleyrodidae) populations of California and Arizona to spiromesifen. J. Econ. Entomol. 101: 174-181.
- Qiao J., Zou X., Lai D., Yan Y., Wang Q., Li W., et al. (2014). Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. Pest Manag. Sci. 70: 1041–1047.
- Razze, J. M., Liburd, O. E., McSorley, R. (2016). Preference of *Bemisia tabaci* biotype B on zucchini squash and buckwheat and the effect of *Delphastus catalinae* on whitefly populations. Pest. Manag. Sci. 72: 1335–1339.

- Rehman, H., Nadeem, M., Ayyaz M., Begum, H. A. (2015). Comparative Efficacy of Neem Oil and Lambda cyhalothrin against Whitefly (*Bemisia tabaci*) and Jassid, (*Amrasca devastans* Dist.) in okra field. Russian Journal of Agricultural Sciences 41: 138-145.
- Román, S., Ojeda, G. C., Panduro, A. (2013). Genética y evolución de la alimentación de la población en México. Revista de Endocrinología y Nutrición 21(1): 42-51.
- Shrestha, D., McAuslane, H. J., Adkins, S. T., Smith, H. A., Dufault, N., Colee, J., Webb, S. E. (2017). Host-Mediated Effects of Semipersistently Transmitted *Squash Vein Yellowing Virus* on Sweetpotato Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) Behavior and Fitness. Journal of Economic Entomology 110(4): 1433-1441.
- Snehi, S. K., Raj, S. K., Prasad, V., Singh, V. (2015). Recent Research Findings Related to Management Strategies of Begomoviruses. J. Plant Pathol. Microb. 6: 273.
- Sparks, T. C. and Nauen, R. (2015). IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. Pestic. Biochem. Physiol. 121: 122–128.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2016). SAS Inc. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute in corporation, Cary, N.C. USA: Author.
- Sufrin-Ringwald, T., and Lapidot, M. (2011). Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. Phytopathology 101:281-289
- Sun, Y. X. and Liu, T. X. (2016). Effectiveness of imidacloprid in combination with a root nitrogen fertilizer applied to tomato seedlings against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Crop Protection 80: 56-64.

- Sur, R. and Stork, A. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectol.* 56: 35-40.
- Syed, T.S., Khanzada, M.S., Rani, S., Khanzada, G.H.A., Salman, M., Sarwar, M., Dayo, S.H., Anwar, S., Su, W., (2016). Population dynamics of thrips, whiteflies and their natural enemies on mustard (*Brassica campestris* L.) Crop in different localities of Sindh, Pakistan. *J. Entomol. Zool. Studies.* 4(1): 7–16.
- Tahir, M., Haider, M. S., Briddon, R. W. (2010). First report of Squash leaf curl China virus in Pakistan. *Australas Plant Dis. Notes* 5: 21–24.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tomizawa, M., Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 247–268.
- Van Der Plank, J.E. *Plant disease: epidemic and control.* Academic Press, New York, London. 1963.
- Van-Iersel, R. D., Oetting, D. B., Hall, J. G., (2001). Application technique and irrigation method affect imidacloprid control of silverleaf whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) on poinsettias. *J. Econ. Entomol.* 94: 666-672.
- Vassiliou, V., Emmanouilidou, M., Perrakis, A., Morou, E., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Roditakis, E. (2011). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* from Cyprus. *Insect Science* 18: 30-39.
- Wachendorff, U., Nauen, R., Schnorbach, H.J., Rauch, N., Elbert, A. (2002). The biological profile of spiroticlofen (Envidor®) - a new selective tetronic acid acaricide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 55: 149–176.

- Wang, K. Y., Liu, T. X., Yu, C. H., Jiang, X. Y., Yi, M. Q. (2002). Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. J. Econ. Entomol. 92: 407-413.
- Wang, Z., Yan, H., Yang, Y., Wu, Y. (2010). Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* from China. Pest Manag. Sci. 66: 1360–1366.
- Wyatt, S. D. and Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288-1293.
- Xie, W., Wu, Q. J., Xu, B. Y., Wang, S. L., Zhang, Y. J. (2011). Evaluation on the effect of spirotetramat on controlling *Bemisia tabaci*. China Vegetables 14(1): 69-73.
- Zhang, L. P., Greenberg, S. M., Zhang, Y. M., Liu, T. X. (2011). Effectiveness of thiamethoxam and imidacloprid seed treatments against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on cotton. Pest Manag. Sci. 67: 226-232
- Zhang, Y. P., Zhu, M. W., Cui, H. M., Qiu, Y., Sha, K., Wan, Y. H., Zhu, L. Y., Yu, L., Hui, Z. (2008). Molecular identification and the complete nucleotide sequence of TYLCV isolate from Shanghai of China. Virus Genes 36: 547-551.

CAPÍTULO IV.

DIAGNÓSTICO Y MANEJO INTEGRADO DE LA PUDRICIÓN DE FRUTOS EN *Cucurbita argyrosperma*, CAUSADA POR *Sclerotium rolfsii*

CAPÍTULO IV.

DIAGNÓSTICO Y MANEJO INTEGRADO DE LA PUDRICIÓN DE FRUTOS EN *Cucurbita argyrosperma*, CAUSADA POR *Sclerotium rolfsii*

José F. Díaz-Nájera

RESUMEN

La pudrición de frutos es el principal problema fitopatológico del cultivo de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber) en el estado de Guerrero. Los objetivos de este estudio fueron: 1) identificar al agente causal de la pudrición algodonosa de frutos de calabaza, mediante criterios morfológicos, patogénicos y un análisis molecular (ITS1, 5.8S, ITS2); 2) evaluar *in vitro* cepas de *Trichoderma* spp. y fungicidas químicos, y 3) probar en campo en condiciones de temporal las cepas que resultaron más sobresalientes *in vitro*, en mezcla con los fungicidas utilizados, durante dos ciclos de cultivo. Se registró número de frutos sanos y dañados a la cosecha y rendimiento de semilla (kg ha⁻¹). Las pruebas morfológicas, patogénicas y moleculares confirmaron la identidad de *Sclerotium rolfsii* como patógeno causante de la pudrición de frutos en calabaza pipiana. En condiciones *in vitro* la mayor inhibición de *S. rolfsii* la obtuvieron: *Trichoderma virens* cepa G-41 (70.72 %), *T. asperellum* cepa CSAEGro-1 (69 %), y los fungicidas metalaxil (100 %), pyraclostrobin (100 %), quintozeno (100 %), cyprodinil + fludioxonil (100 %) y procloraz (100 %). El tiofanato metílico sólo retrasó el crecimiento (4.17 %). En campo, durante el ciclo Primavera-verano 2015, se encontró que los tratamientos con *T. asperellum* cepa CSAEGro-1 + metalaxil, y *T. asperellum* + cyprodinil + fludioxonil, favorecieron la mayor sanidad de frutos y rendimiento de semilla en el cultivo.

Palabras clave: Calabaza, *Sclerotium rolfsii*, pudrición de frutos, *Trichoderma*, fungicidas, manejo integrado.

**DIAGNOSIS AND INTEGRATED MANAGEMENT OF FRUIT ROT IN
Cucurbita argyrosperma, CAUSED BY *Sclerotium rolfsii***

José F. Díaz-Nájera

ABSTRACT

Fruit rot is the principal phytopathological problem of pipiana pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber) in the of Guerrero state. The aims of this research were to 1) identify the causal agent of southern blight on pumpkin fruits by Morphological, pathogenic, and molecular analysis (ITS1, 5.8S, ITS2). 2) evaluate *in vitro* *Trichoderma* spp. strains and chemical fungicides, and 3) evaluate under rainfed field conditions, the strains that obtained the best results *in vitro*, combined with fungicides during two crop cycles. Number of commercial and non-commercial fruits at harvest, and seed yield (kg ha⁻¹) were registered. Morphological, pathogenic and molecular characterization identified *Sclerotium rolfsii* as the causal agent of rot in pipiana pumpkin fruits. Now, *in vitro* conditions, the highest inhibition of *S. rolfsii* were obtained by *Trichoderma virens* strain G-41 (70.72 %), *T. asperellum* strain CSAEGro-1 (69 %), and the fungicides metalaxyl (100 %), pyraclostrobin (100 %), quintozone (100 %), cyprodinil + fludioxonil (100%), and prochloraz (100 %). Thiophanate-methyl only delayed growth (4.17 %). In field conditions, during the spring-summer 2015 cycle, *T. asperellum* strain CSAEGro-1 + metalaxyl, and *T. asperellum* + cyprodinil + fludioxonil, favored the highest number of fruits and seed yield in the crop.

Keywords: Pumpkin, *Sclerotium rolfsii*, fruit rot, *Trichoderma*, fungicides, integrated management.

INTRODUCCIÓN

La calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber) es una planta anual cultivada en un sistema tradicional de producción agrícola, durante la época de lluvias. Se siembra durante los meses de mayo y junio, y se cosecha de septiembre a diciembre (Ayvar *et al.*, 2007; Garza *et al.*, 2010). El producto principal del cultivo de calabaza pipiana es la semilla madura, que tiene gran aceptación para el consumo, en diferentes platillos de la cocina mexicana; además, se utiliza en la industria como materia prima para preparar pasta de mole. El cultivo es atacado por diferentes hongos fitopatógenos, pero los que habitan en el suelo son los que causan severos daños desde el inicio de la fructificación hasta la cosecha de frutos (Díaz *et al.*, 2015). La infección se presenta en los frutos que se encuentran en contacto con el suelo y el desarrollo de la enfermedad es favorecido por condiciones cálidas y húmedas. Los frutos de calabaza infectados se pierden porque los patógenos son destructivos (Zitter *et al.*, 2004).

Al respecto, Díaz *et al.* (2014) mencionan que el daño de mayor impacto económico es la pudrición de frutos poco antes de la cosecha, porque disminuye drásticamente el rendimiento de semilla y amenaza el éxito de la inversión económica del agricultor. Para disminuir los daños, se debe combatir el agente causal, previo diagnóstico, a través del manejo integrado, en donde lo más recomendable es utilizar diferentes métodos, como el uso de prácticas culturales, así como la utilización de microorganismos benéficos y la aspersión de productos químicos. El uso de fungicidas químicos es el método preferido por los agricultores, sin embargo, en el estado de Guerrero es limitada la información sobre el manejo integrado de la pudrición de frutos de calabaza. Ayvar *et al.* (2007) y Díaz *et al.* (2015) han reportado la incidencia de oomicetes y deuteromicetes en calabaza pipiana; recomiendan aplicar productos específicos como benomil y metalaxyl, entre otros; sin embargo, la validación de fungicidas en el cultivo es muy escasa.

En el manejo integrado y sustentable se debe incorporar métodos de control que permitan la reducción del uso de moléculas químicas, como la utilización del género *Trichoderma*, agente de biocontrol con amplias expectativas para el manejo de hongos en el cultivo de calabaza, porque tiene las ventajas de ser inocuo para humanos y animales, y no contamina los ecosistemas. Para lograr éxito en el manejo integrado de la pudrición de frutos en calabaza pipiana, es importante conocer el historial de las parcelas cultivadas; tener presente la información climática y realizar aplicaciones de biocontroladores y fungicidas de forma preventiva y nunca curativa.

La presente investigación tuvo como objetivos: a) identificar por medio de técnicas morfológicas, moleculares y de patogenicidad, al agente causal de la pudrición algodonosa de frutos en calabaza, b) evaluar *in vitro* la efectividad biológica de cepas comerciales y nativas de *Trichoderma* spp. y fungicidas, y c) probar en campo bajo condiciones de temporal, las dos cepas nativas más sobresalientes probadas *in vitro*, en mezcla con los fungicidas utilizados, durante dos ciclos consecutivos de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En septiembre y octubre del año 2014 se colectaron 20 frutos maduros de calabaza pipiana, en un lote comercial de 60,000 m² establecido en el valle de El Zoquital, ejido de Apipilulco, municipio de Cocula, Guerrero, en la zona norte del Estado, localizada entre las coordenadas 18°11'06.30" latitud Norte y 99°37'36.60" longitud Oeste, a 620 msnm. Predomina suelo franco-arcilloso, con precipitación y temperatura medias anuales de 1000 mm y 30°C. Se utilizó el método de muestreo de transecto en W; se colectaron frutos con micelio blanco algodonoso tipo nido (donde el fruto está en contacto con el suelo) y con esclerocios.

De muestras de frutos maduros de calabaza con síntomas y signos de pudrición, se cortaron 5 trozos de tejido de 0.5 cm² de la zona de avance de la enfermedad, se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos minutos; se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada esterilizada; se sembraron 50 muestras de tejido en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente (± 28 °C) con fotoperiodo 12/12 h durante 5 días. Las colonias fungosas desarrolladas se separaron y se purificaron por punta de hifa en cajas Petri con PDA.

Del patógeno aislado y purificado se tomaron muestras de micelio, se hicieron preparaciones temporales en lactofenol, se observaron en el microscopio compuesto en los objetivos 40X y 100X, las principales características de importancia taxonómica, como son: el color, septación y ramificación de las hifas; así como la presencia de esclerocios, y se compararon con las claves ilustradas de Watanabe (2002); lo que permitió llevar a cabo la identificación del hongo.

Para probar la patogenicidad se utilizó una muestra de cinco frutos que se lavaron con agua corriente del grifo, y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.2 % (NaOCl) durante 2 min. Se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada. Se realizó la inoculación del micelio maduro del hongo, por la técnica de pinchazo con una aguja de disección esterilizada, en el epicarpio del fruto. Los frutos inoculados se mantuvieron en una cámara húmeda a una humedad relativa de 70 % y se incubaron durante 7 días a 28 ± 2 °C. En los frutos utilizados como control, se realizó sólo el pinchazo con agua destilada estéril.

La extracción del ADN genómico del aislamiento se realizó a partir de una muestra de micelio de 7 días de edad utilizando el kit DNeasy^{MR} (QIAGEN®) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), los cuales amplifican los espacios internos transcritos y el gen 5.8S del ADN ribosomal (región ITS) y generan un producto de talla variable, aproximadamente entre 500 y 600 pares de bases (pb) (White *et al.*, 1990). Esta práctica se realizó con una mezcla de

reacción en un volumen final de 25 μ L, cuyos componentes finales fueron: amortiguador de reacción 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP's 200 nM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Promega). El programa térmico consistió en mantener una temperatura a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 s y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados por PCR fueron observados en un transiluminador de luz UV y secuenciados directamente en un equipo ABI PRISM® 3700 Genetic Analyzer.

Las secuencias consenso se editaron y ensamblaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004). En el análisis evolutivo, todas las secuencias consenso fueron alineadas con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron para los datos del ITS1-5.8S-ITS2 con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting, opción de búsqueda (nivel=1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones) y los espacios faltantes se consideraron como deleciones completas. Para calcular los valores de confianza de los clados del árbol, se realizó una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). La secuencia obtenida se depositó en la base de datos del GenBank.

Ensayo I. Control biológico *in vitro* del agente causal de la pudrición de frutos en calabaza

Se utilizaron tres cepas comerciales y tres cepas nativas de *Trichoderma* spp.; las del segundo grupo fueron proporcionadas por el laboratorio de Fitopatología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGro), las cuales se obtuvieron originalmente mediante la técnica de dilución en placa y se reactivaron transfiriéndolas en cajas Petri con PDA. De igual forma, las cepas comerciales se obtuvieron en cultivo puro, con el mismo procedimiento y se reactivaron en PDA. Los tratamientos evaluados se describen en el Cuadro 1. Para evaluar la antibiosis de las cepas de *Trichoderma*, se utilizó la técnica del

celofán descrita por Patil *et al.* (2014); primero se cortó papel celofán, en círculos de 8.5 cm de diámetro, igual a la superficie de la caja Petri; se esterilizó y se colocó sobre PDA; con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro, se cortaron discos de PDA con colonias de *Trichoderma* spp. de 3 días de edad y se colocaron en el centro de la caja, después de 48 horas de incubación, se retiró el papel con las colonias activas de *Trichoderma* spp., para que quedaran los metabolitos secundarios difundidos en el medio de cultivo, en el cual se probó inmediatamente su efecto fungistático sembrando en el centro de la caja, PDA con micelio de la colonia del patógeno de 3 días de edad y se incubaron las cajas a temperatura ambiente de 28 ± 2 °C en el laboratorio.

Cuadro 1. Tratamientos biológicos evaluados “*in vitro*” contra el agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.

Simbología	Cepa	Producto
T1	Testigo	--
T2	<i>Trichoderma fasciculatum</i>	FITHAN
T3	<i>Trichoderma virens</i> cepa G-41	PHC RootMate®
T4	<i>Trichoderma reesei</i>	BACTIVA
T5	<i>Trichoderma asperellum</i> cepa CSAEGro-1	Cepa nativa
T6	<i>Trichoderma asperellum</i> cepa CSAEGro-2	Cepa nativa
T7	<i>Trichoderma</i> sp. cepa Santa Teresa	Cepa nativa

Los tratamientos se arreglaron en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri de 8.5 y 9.0 cm de diámetro, y 1.5 cm de altura, con 20 mL de medio de cultivo PDA + metabolitos de *Trichoderma* spp.

Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la ecuación: $\% \text{ de inhibición} = ((D_1 - D_2) / D_1) \times (100)$ Donde: D_1 =diámetro de la colonia del patógeno (testigo) y D_2 =diámetro de la colonia fungosa del patógeno creciendo en caja con PDA, donde había crecido *Trichoderma* spp. (Patil *et al.*, 2014). A los datos de esta variable se le realizó análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de

medias utilizando el método de la diferencia significativa honesta de Tukey con nivel de significancia al 5 % (SAS, 2015).

Ensayo II. Control químico *in vitro* del agente causal de la pudrición de frutos en calabaza

El experimento se estableció para estudiar el efecto de diferentes fungicidas, sobre el desarrollo del hongo identificado, utilizando la técnica del medio de cultivo envenenado (Sohbat *et al.*, 2015). Los productos químicos comerciales se utilizaron a las dosis recomendadas por el fabricante (Cuadro 2), a las cajas Petri con la dosis de fungicida se les agregaron 20 mL de PDA, el cual se dejó solidificar a temperatura ambiente (28 ± 2 °C); después se sembró un disco de PDA (0.5 cm de diámetro) con micelio del hongo, en el centro de la caja; se etiquetó e incubó en el laboratorio. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri. Para conocer el efecto de las moléculas químicas sobre el desarrollo del agente causal de la pudrición de frutos de calabaza, se midió la variable porcentaje de inhibición en la misma forma descrita en el Ensayo I. El análisis estadístico también fue similar al realizado en el Ensayo I. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical Analysis System versión 9.4 (SAS, 2015).

Cuadro 2. Tratamientos químicos evaluados “*in vitro*” contra el agente causal de la pudrición de frutos en calabaza.

Simbología	Ingrediente activo (dosis[†])	Producto
T1	Testigo	-
T2	metalaxil (0.02 mL) [†]	TOKAT [®] 240 CE
T3	pyraclostrobin (0.02 mL)	HEADLINE [®]
T4	tiofanato metílico (0.02 mL)	CERCOBIN [®] -M
T5	quintozeno (0.02 mL)	PENTACLOR [®] 600 F
T6	cyprodinil + fludioxonil (0.02 mL)	SWITCH [®] 62.5 WG
T7	procloraz (0.02 mL)	SPORTAK 45 CE

[†]Dosis usada en 20 mL de PDA

Ensayo III. Control integrado en campo del agente causal de la pudrición de frutos en calabaza

Esta fase consistió en evaluar en condiciones de campo las dos cepas de *Trichoderma* más sobresalientes del Ensayo I y los fungicidas de la fase *in vitro* del Ensayo II.

Sitio experimental

El trabajo se realizó en dos ciclos de cultivo, durante primavera-verano de 2015 y 2016, en condiciones de temporal, en el Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, en Cocula, Guerrero. (18° 14' N, 99° 39' O y 640 m de altitud). El clima es AW0, que corresponde a cálido subhúmedo con lluvias en verano, con temperaturas promedio anual de 26.4 °C y de 23.4 °C del mes más frío (diciembre). La oscilación de temperatura de un mes a otro es de 5 a 7 °C. La precipitación promedio anual es de 767 mm (García, 2005). El suelo es un vertisol con pH de 7.1, conductividad eléctrica de 0.23 dS·m⁻¹, materia orgánica de 1.7 %, 0.1 % de N total y 14 ppm de fósforo (Apáez *et al.*, 2013).

Material vegetal

Se utilizó el genotipo criollo de calabaza pipiana “Apipilulco”, el más cultivado en el área de estudio, y alcanza su madurez de cosecha a los 100-110 días después de la emergencia (d.d.e.).

Tratamientos y diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas, con parcelas grandes arregladas como bloques completos al azar. Las parcelas grandes correspondieron a las dos cepas de *Trichoderma* spp. y las parcelas chicas, a los fungicidas; se utilizaron cuatro repeticiones, los tratamientos se describen en el Cuadro 3. La unidad experimental fue de 12 plantas, y por las características del cultivo (crecimiento rastrero indeterminado), se consideró a toda la unidad experimental como parcela útil. Se hicieron dos aplicaciones de los tratamientos, utilizando una bomba de mochila motorizada Arimitsu® (Modelo SD-260D), con

boquilla de 2 puntas de abanico plano KS-K6 a 80 psi. Con un gasto de 800 L ha⁻¹. Se ajustó el pH del agua a 7 (Agrex® ABC) y se añadió el coadyuvante (Inex-A®) a dosis de 1 mL L⁻¹. Las cepas de *Trichoderma* spp. se aplicaron al suelo a los 20 y 35 días después de la emergencia (d.d.e.) y los fungicidas, a los 60 y 75 d.d.e.

Se evaluaron número de frutos sanos cosechados en 35 m² (frutos maduros sin ningún daño); número de frutos dañados cosechados en 35 m² (frutos maduros con algún síntoma o nivel de daño por hongos); rendimiento de semilla en kg ha⁻¹. A los datos de cada variable se les realizó análisis de varianza individuales para cada uno de los ciclos y combinados a través de los 2 ciclos. De igual forma, se efectuaron pruebas de comparaciones múltiples de medias utilizando el método de Tukey con nivel de significancia de 5 %. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical Analysis System (SAS, 2015).

Cuadro 3. Tratamientos evaluados en condiciones de campo contra el agente causal de la pudrición de frutos en calabaza: *Trichoderma* más fungicida

Simbología	<i>Trichoderma</i> (cepa)	Fungicida
T1	Testigo	Testigo
T2	<i>Trichoderma asperellum</i> (CSAEGro-1)	TOKAT® 240 CE [†]
T3	<i>Trichoderma asperellum</i> (CSAEGro-1)	HEADLINE®
T4	<i>Trichoderma asperellum</i> (CSAEGro-1)	CERCOBIN®-M
T5	<i>Trichoderma asperellum</i> (CSAEGro-1)	PENTACLOR® 600 F
T6	<i>Trichoderma asperellum</i> (CSAEGro-1)	SWITCH® 62.5 WG
T7	<i>Trichoderma asperellum</i> (CSAEGro-1)	SPORTAK 45 CE
T8	<i>Trichoderma virens</i> (PHC RootMate®)	TOKAT® 240 CE
T9	<i>Trichoderma virens</i> (PHC RootMate®)	HEADLINE®
T10	<i>Trichoderma virens</i> (PHC RootMate®)	CERCOBIN®-M
T11	<i>Trichoderma virens</i> (PHC RootMate®)	PENTACLOR® 600 F
T12	<i>Trichoderma virens</i> (PHC RootMate®)	SWITCH® 62.5 WG
T13	<i>Trichoderma virens</i> (PHC RootMate®)	SPORTAK 45 CE

[†]Dosis recomendada por el fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

En base a criterios culturales y morfológicos, el patógeno fúngico se identificó como *Sclerotium rolfsii* Sacc. [Teleomorfo: *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu y Kimbrough] (Saccardo 1931, Punja *et al.*, 1982). Se caracteriza por la producción abundante de micelio aéreo algodonoso; crecimiento micelial rápido (Figura 1E), hifas septadas, hialinas, ramificadas y pared celular delgada (Figuras 1A y 1B) con y sin conexiones de abrazadera (fíbulas) (Figuras 1C y 1D) y formación de abundantes esclerocios color café claro, con 1.0-1.5 mm de diámetro, globosos o subglobosos, de superficie lisa, lustrosos y compactos (Figura 1E y 1F) (Punja y Damiani, 1996; Watanabe, 2002).

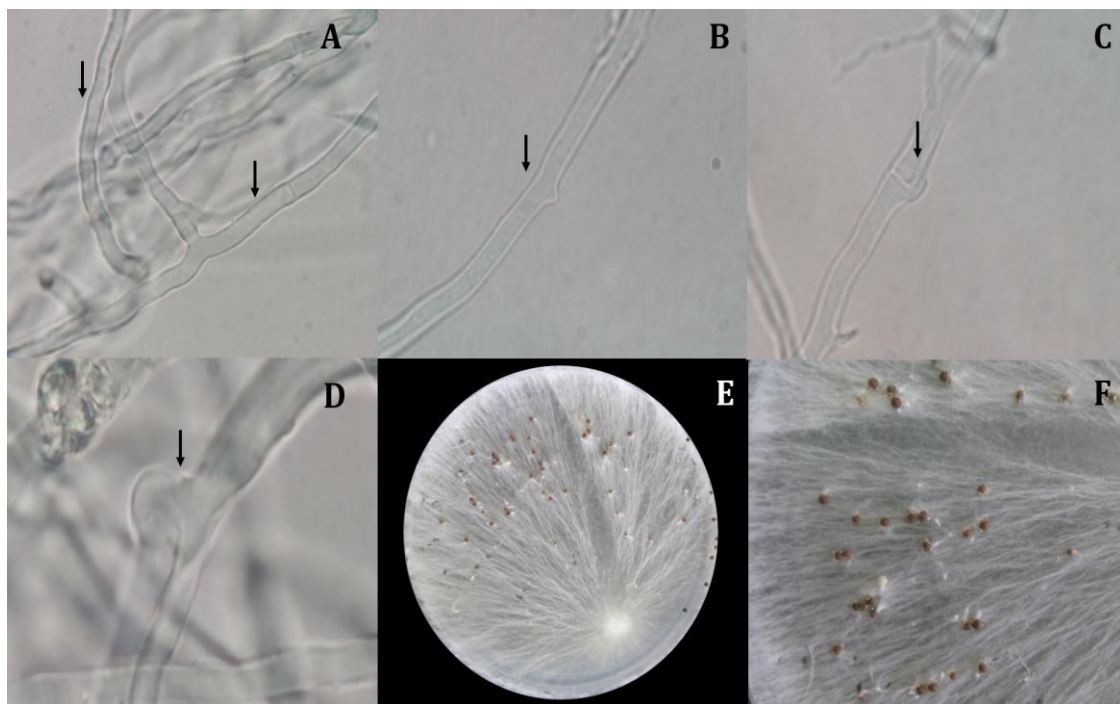


Figura 1. *Sclerotium rolfsii*. A y B) Micelio, C y D) Fíbulas, E) Cultivo en PDA, F) Formación de esclerocios.

Prueba de patogenicidad

Siete días después de la inoculación de *Sclerotium rolfsii* en frutos maduros de calabaza, se observaron síntomas de pudrición suave (Figura 2 derecha), de consistencia acuosa con crecimiento abundante de micelio blanco aéreo algodonoso, síntomas y signos similares a los observados en campo. Los frutos utilizados como testigo, permanecieron sanos (Figura 2 izquierda). El reaislamiento del hongo obtenido a partir del tejido infectado de frutos inoculados, presentó las mismas características morfológicas que el aislamiento originalmente aislado.



Figura 2. Prueba de patogenicidad. Fruto testigo (izquierda) y fruto inoculado (derecha).

Identificación molecular

Las secuencia obtenida (570 pb) tuvo 100 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con secuencias reportadas en el Gen Bank para *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimb [Anamorfo: *Sclerotium rolfsii* Sacc.]. Se depositó en el Banco de Genes (Genbank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (accesión KX757771.1 CSAEGro-CaDIA) (Figura 3). En la reconstrucción

filogenética basada en la utilización de la región ITS, se identificó la especie *A. rolfsii*. La región ITS logró separar al patógeno identificado y a la cepa *S. rolfsii* (JX566993), del resto de las especies del mismo género, con una confiabilidad bootstrap del 73 %, además de ser altamente diferenciadas del resto de las especies (100 %) (Figura 3).

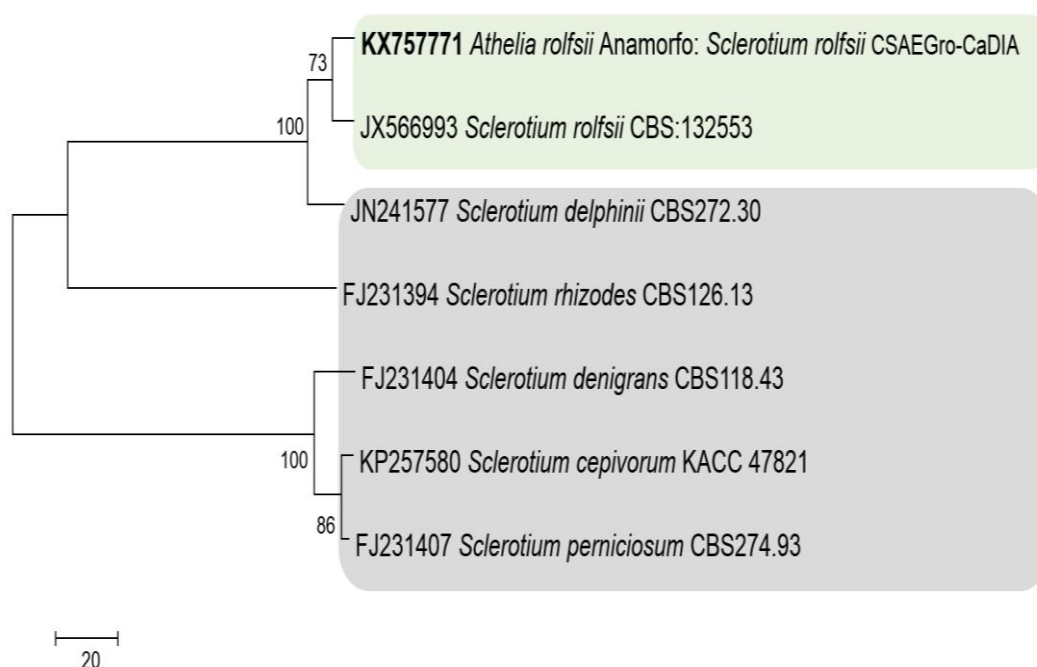


Figura 3. Árbol filogenético obtenido con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting. Los valores de confiabilidad de los nodos se formaron con 1000 repeticiones bootstrap. Entre paréntesis, números de accesoión del GenBank. Letra remarcada, cepas evaluadas en este estudio. s. l.=sensu lato.

Ensayo I. Control biológico *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* agente causal de la pudrición de frutos en calabaza

En los tres muestreos del crecimiento de las colonias del patógeno, los valores promedio presentaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$ y $P = 0.0042$). El menor crecimiento se registró en los tratamientos con *Trichoderma*

virens cepa G-41 (cepa comercial) y *T. asperellum* cepa CSAEGro-1 (cepa nativa) con 2.46 y 2.60 cm, respectivamente (Cuadro 4); en estas mismas cepas se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del patógeno, en la última fecha de evaluación (70.72 y 69 %) (Figura 4). El hongo *S. rolfsii* creció a una tasa de 2.8 cm día⁻¹. Al final del ensayo se determinó que *T. fasciculatum*, *T. reesei*, *T. asperellum* cepa CSAEGro-2 y *Trichoderma asperellum* Santa Teresa, registraron actividad fungistática sobre el patógeno.

Cuadro 4. Valores promedios del diámetro (cm) de la colonia de *Sclerotium rolfsii*, en el Ensayo I de antibiosis *in vitro* mediante la técnica del celofán.

Trat.	Cepa	Diámetro (cm) de la colonia de <i>S. rolfsii</i>		
		Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
T1	Testigo	2.96 a [†]	7.16 a	8.40 a
T2	<i>Trichoderma fasciculatum</i>	0.73 bc	1.11 b	4.26 ab
T3	<i>T. virens</i> cepa G-41	0.70 c	1.40 b	2.46 b
T4	<i>T. reesei</i>	0.71 c	0.85 b	3.00 b
T5	<i>T. asperellum</i> cepa CSAEGro-1	0.94 b	1.68 b	2.60 b
T6	<i>T. asperellum</i> cepa CSAEGro-2	0.62 c	1.03 b	4.26 ab
T7	<i>Trichoderma</i> sp. Sta. Teresa	0.78 bc	1.05 b	4.37 ab
Prob.		<.0001	<.0001	0.0042
DSH		0.22	1.00	4.47

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

Se ha reportado que *Trichoderma* spp. en sus metabolitos secundarios produce enzimas (glucanasas y quitinasas), antibióticos (viridina, gliotoxina o peptaiboles) y micotoxinas (Mukherjee *et al.*, 2006; Shores y Harman, 2008), las cuales están involucradas en el efecto fungistático ejercido por *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos como *S. rolfsii* (Mukherjee *et al.*, 2006; Hirpara *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente Ensayo I con la cepa *T. virens* son diferentes a los reportados por Parmar *et al.* (2015), quienes estudiaron la antibiosis *in vitro* de diversas cepas de *Trichoderma* en el biocontrol de *S. rolfsii* aislado de cacahuate. Obtuvieron 50 % de inhibición con *T. virens*. Al respecto, Hirpara *et al.* (2017) encontraron que *Trichoderma virens* presentó 76.37 % de inhibición del crecimiento *in vitro* de *S. rolfsii* a las 144 h; este promedio de

efectividad es similar al 70.72 % obtenido en el presente estudio, en donde fue la máxima inhibición y se encontró en el tratamiento con *T. virens* cepa G-41 (PHC RootMate®), pero en la mitad de tiempo (72 h). La diferencia en estos resultados quizá se explica por las condiciones de incubación, que pueden afectar la liberación de metabolitos secundarios por el agente biocontrolador y el desarrollo del patógeno (Infante *et al.*, 2009).

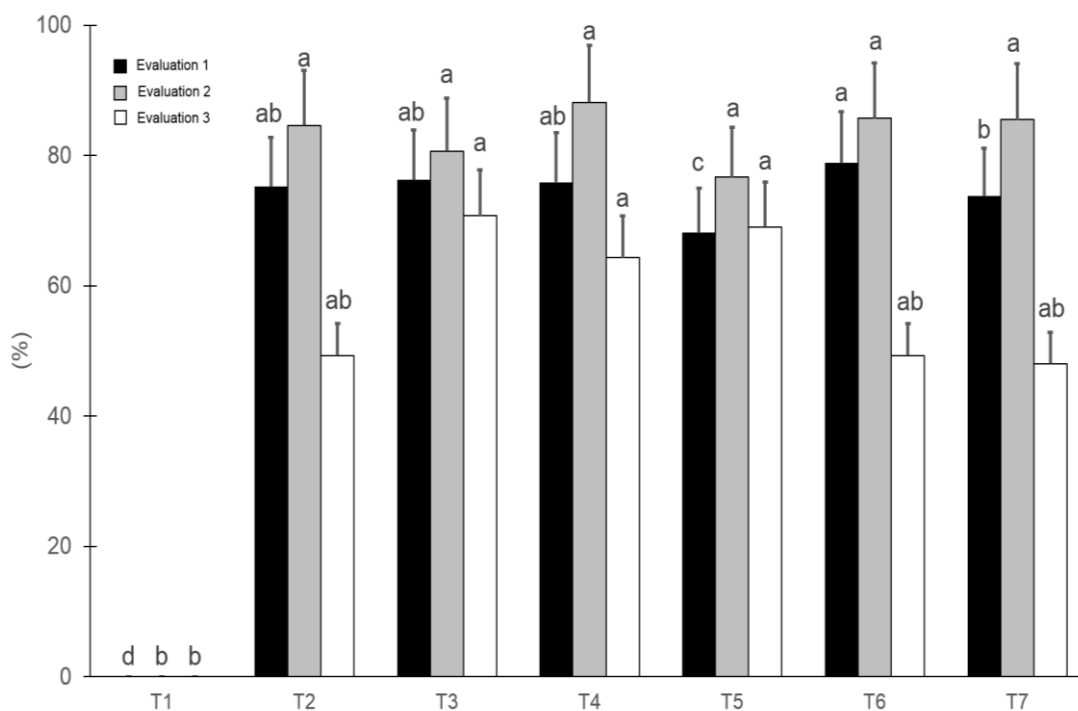


Figura 4. Inhibición de *Sclerotium rolfsii* para los diferentes tratamientos biológicos, en tres muestreos. T1=Testigo, T2= *Trichoderma fasciculatum*, T3= *T. virens* cepa G-41, T4= *T. reesei*, T5= *T. asperellum* cepa CSAEGro-1, T6= *T. asperellum* cepa CSAEGro-2, T7= *Trichoderma* sp. Santa Teresa.

Alvarado y Rivera (2016) evaluaron *in vitro* la eficiencia de cepas de *Trichoderma asperellum* contra *Sclerotium cepivorum* aislado de cebolla; encontraron que la inhibición del crecimiento del patógeno fluctuó de 47.3 a 61.08 %, la máxima inhibición reportada por estos autores es inferior a 69 % obtenida con *T. asperellum* cepa CSAEGro-1, pero con la especie *S. rolfsii*.

John *et al.* (2015) evaluaron la antibiosis *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma asperellum* contra *Sclerotium rolfsii*; encontraron que la inhibición del crecimiento del patógeno osciló de 42.71 a 100.00 %, valores promedios que están dentro del rango y por encima de lo obtenido con la cepa nativa *T. asperellum* CSAEGro-1. Las cepas nativas son una opción importante para integrarlas en un plan de manejo, como se comprobó en el presente estudio, en donde la cepa nativa *T. asperellum* CSAEGro-1, es una de las más sobresalientes en el biocontrol *in vitro* de *S. rolfsii*. Esto concuerda con lo reportado con la cepa *T. asperellum* cepa nativa Csaegro-1, que ha sido evaluada contra aislamientos de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*, aislados de calabaza pipiana, se observó que *in vivo* retrasa la aparición de dichos patógenos entre 4 y 6 días en frutos de calabaza pipiana inoculados (Díaz *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2015).

Ensayo II. Control químico *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*, agente causal de la pudrición de frutos en calabaza

En las cuatro fechas de muestreo se encontraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$) porque todos los fungicidas evaluados suprimieron totalmente el crecimiento de la colonia de *S. rolfsii*, a excepción de tiofanato metílico, en el cual se registró un crecimiento promedio que fluctuó de 0.76 cm en la primera evaluación, a 8.05 cm al final del ensayo (Cuadro 5). En las unidades experimentales del tratamiento testigo, el patógeno tuvo una tasa promedio de crecimiento de 2.1 cm día⁻¹. Al final de este ensayo, se determinó que la mayoría de los fungicidas inhibieron 100 % a *S. rolfsii*, en comparación con la actividad fungistática presentada por del tiofanato metílico (Figura 5).

Cuadro 5. Valores promedios del diámetro de la colonia de *Sclerotium rolfsii*, en el Ensayo II de efecto *in vitro*, usando fungicidas químicos

Trat.	Fungicida	Diámetro (cm) de la colonia de <i>S. rolfsii</i>			
		Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
T1	Testigo	1.25 a [†]	3.53 a	6.93 a	8.40 a
T2	metalaxil	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
T3	pyraclostrobin	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
T4	tiofanato metilico	0.76 b	2.55 b	5.70 b	8.05 b
T5	quintozeno	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
T6	cyprodinil+fludioxonil	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
T7	procloraz	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
Prob.		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
DSH		0.20	0.79	1.00	0.22

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). DMS: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

Khan y Javaid (2015) evaluaron en condiciones *in vitro* el fungicida metalaxil para el control de *S. rolfsii* aislado de garbanzo. Reportaron que este producto logró inhibir 100 % el crecimiento del patógeno. Este resultado es igual al obtenido con el mismo fungicida contra *S. rolfsii* aislado de calabaza pipiana en el presente experimento.

En otros estudios se ha probado la sensibilidad *in vitro* de *S. rolfsii* frente a algunos fungicidas. Por ejemplo, Mahato *et al.* (2014) evaluaron varios fungicidas. De ellos el ingrediente activo metalaxil inhibió 94.04 % el crecimiento del patógeno; este porcentaje es semejante al valor obtenido con metalaxil en el presente trabajo. Estos resultados se deben a que el metalaxil pertenece al grupo de las fenilamidas, que inhibe la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), que afecta el crecimiento micelial, la formación de esporas y la infección del patógeno (Fishel y Dewdney, 2012).

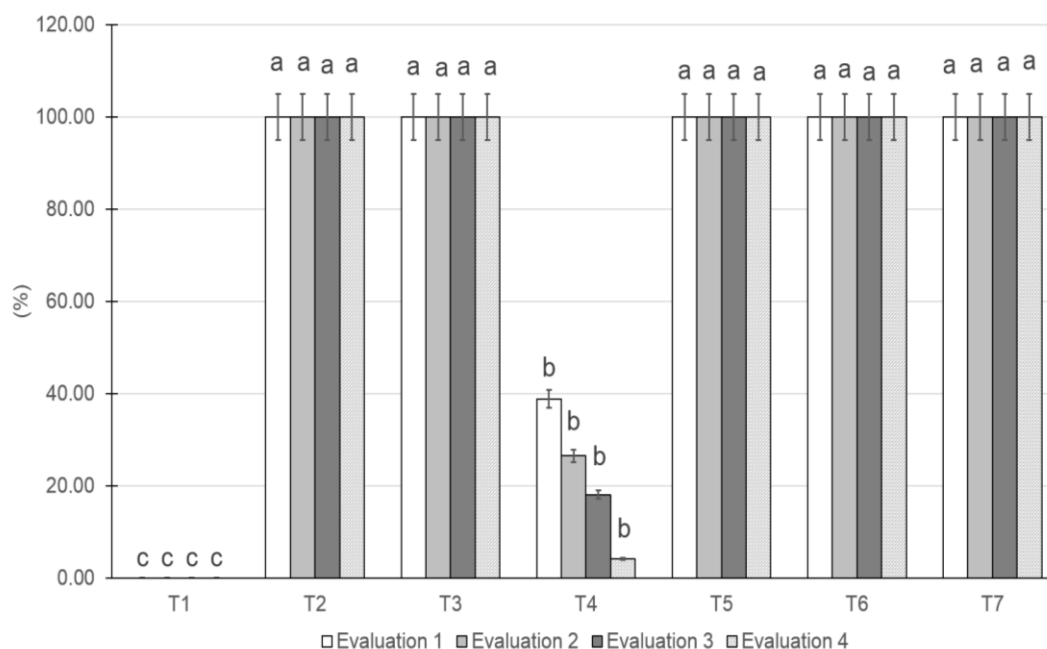


Figura 5. Inhibición de *S. rolfsii* en los tratamientos del Ensayo II, en cuatro evaluaciones. T1= Testigo, T2= metalaxil, T3= pyraclostrobin, T4= tiofanato metílico, T5= quintozeno, T6= cyprodinil + fludioxonil, T7= procloraz.

Liang *et al.* (2015) probaron el efecto del pyraclostrobin sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, y reportaron que se logró cerca de 100 % de inhibición con el uso de ácido salicylhidroxámico. Sin este último la inhibición se reduce significativamente. Por otra parte, Amule *et al.* (2014) reportaron que el uso de pyraclostrobin inhibió 100 % *in vitro* el desarrollo de *S. rolfsii* obtenido de garbanzo. Este resultado es similar a 100 % obtenido con este fungicida en el presente estudio. De acuerdo con Fishel y Dewdney (2012), el pyraclostrobin afecta la respiración mitocondrial que detiene la producción de energía y resulta en la muerte del hongo fitopatógeno.

En el presente estudio se encontró que el tiofanato metílico produce efecto fungistático, porque permitió 95.83 y 4.17 % de crecimiento micelial e inhibición, respectivamente. Estos resultados difieren de lo reportado por Suryawanshi *et al.* (2015), quienes con el uso del fungicida tiofanato metílico obtuvieron 63.81 % de inhibición de *S. rolfsii*; sin embargo, el efecto fungistático de tiofanato metílico

observado en el presente trabajo, coincide con lo que reportaron Manu *et al.* (2012), porque con este mismo producto registraron 0 % de inhibición sobre *S. rolfsii* en condiciones *in vitro*; es decir, el hongo creció 100 % en el medio de cultivo envenenado con el fungicida.

En el presente estudio se determinó que el quintozeno inhibió 100 % el desarrollo de *S. rolfsii*. Este resultado coincide con lo informado por Rondon *et al.* (1995) quienes usaron el PCNB (quintozeno), carboxin + thiram, y oxiclورو de cobre, contra el crecimiento y formación de esclerocios de *S. rolfsii*. Según estos autores el quintozeno fue el tratamiento con mayor efectividad tanto en la inhibición de crecimiento micelial como en la formación de esclerocios. En otra investigación similar, García *et al.* (2012), encontró que en el tratamiento con quintozeno hubo 17.38 y 82.62 % de crecimiento micelial e inhibición *in vitro*, pero del hongo *Rosellinia necatrix* que es habitante del suelo. Fishel y Dewdney (2012) mencionaron que el modo de acción de quintozeno no es ampliamente conocido, pero proponen que interfiere con la síntesis de lípidos y membranas de la célula, lo que afecta directamente el crecimiento micelial de los hongos.

El fungicida SWITCH® 62.5 WG (cyprodinil + fludioxonil) se probó *in vitro* contra el crecimiento micelial de la especie *Sclerotium cepivorum* aislado de ajo (*Allium sativum* L.) por Pérez *et al.* (2015); se encontró que este producto inhibió 1.0 cm el crecimiento micelial del hongo, lo que representó 11.76 % de crecimiento y 88.24 % de inhibición; porcentaje inferior a 100 % de inhibición de *S. rolfsii* registrado en el presente trabajo. Por otra parte, Ayala *et al.*, (2015) estudiaron el efecto de los fungicidas SWITCH® 62.5 WG (cyprodinil + fludioxonil) y Sportak (procloraz) sobre el crecimiento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* aislado de frijol. Reportan 100 % de inhibición de los dos productos; este valor es similar a los obtenidos en estos mismos tratamientos evaluados contra *Sclerotium rolfsii* en esta investigación. Mueller y Bradley (2008) comentaron que el cyprodinil inhibe la síntesis de aminoácidos, e infieren que esto interfiere en la penetración y crecimiento fúngico tanto dentro como fuera de la hoja donde se aplica el producto. Por otra parte, el fludioxonilo neutraliza la vía de transducción de la

señal osmótica, que afecta la germinación de las esporas y crecimiento de micelio. El grupo de los fungicidas azoles, incluye al ingrediente activo procloraz, que tiene un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis del ergosterol, necesario para la formación de las membranas celulares, lo que permite un buen control del patógeno (Fan *et al.*, 2013).

Ensayo III. Control integrado en campo de *Sclerotium rolfsii*, agente causal de la pudrición de frutos en calabaza

Número de frutos sanos

Se encontró diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.0001$); las medias fluctuaron de 12.25 a 29.75. Se encontró que en el testigo hubo la menor incidencia de frutos maduros sin daños por el patógeno. El mayor promedio se obtuvo con la cepa nativa *Trichoderma asperellum* CSAEGro-1 + metalaxil (T2) (Cuadro 6). Por otro lado, fue en el ciclo Primavera-verano 2015, en donde se cosecharon más frutos sanos (Cuadro 6), porque en este año hubo precipitación escasa, lo que provocó una menor incidencia de daño por el patógeno (Figura 6).

En el análisis combinado, para determinar el efecto de la cepa y fungicida a través de los ciclos de cultivo, el mejor rendimiento se registró en la época Primavera-verano 2015, se obtuvo con la cepa nativa *T. asperellum* cepa CSAEGro-1 y el fungicida metalaxil (Cuadro 7).

Rather *et al.* (2012) probaron el efecto de metalaxil y cepas de *Trichoderma virens*, contra *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, patógenos causantes de marchitez en chile, en condiciones de campo; reportaron que con estos dos tratamientos en forma individual, se registraron promedios de 30 y 51.9 % de incidencia de la enfermedad, respectivamente; pero cuando se utilizó la combinación metalaxil + *Trichoderma virens*, la incidencia de la enfermedad se redujo significativamente a 27.3 %. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo con *Trichoderma asperellum* (CSAEGro-1) + metalaxil, que produjo la menor incidencia de daño por *Sclerotium rolfsii* en frutos de calabaza pipiana en campo y,

consecuentemente, hubo mayor número de frutos sanos. Estos hallazgos demuestran que con la combinación de diferentes métodos de control, se reduce el daño de patógenos, lo cual repercute directamente en la cosecha de más frutos sanos por unidad de superficie cultivada.

Cuadro 6. Análisis combinado a través de los ciclos 2015 y 2016, de los tratamientos incluyendo cepas de *Trichoderma* spp., y fungicidas, sobre la obtención de frutos sanos, dañados y rendimiento de semilla, en el cultivo de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*).

Tratamiento	Variables		
	NFS	NFD	RS (kg)
T1	12.250 e [†]	11.0000 a	367.86 d
T2	29.750 a	2.3750 c	901.64 a
T3	27.625 abc	3.8750 bc	833.82 ab
T4	19.250 d	9.1250 a	588.25 c
T5	26.875 abc	3.1250 bc	825.75 ab
T6	28.125 ab	2.5000 c	883.89 ab
T7	26.875 abc	3.6250 bc	805.79 ab
T8	26.250 abc	3.7500 bc	802.54 ab
T9	27.500 abc	3.5000 bc	831.86 ab
T10	24.125 bc	5.8750 b	729.46 bc
T11	25.500 bc	2.8750 c	815.93 ab
T12	26.625 abc	3.6250 bc	841.54 ab
T13	23.875 c	5.2500 bc	745.32 abc
DSH	4.0067	2.9986	169.3
Ciclo			
Primavera-verano 2015	27.6154 a	1.6346 b	852.02 a
Primavera-verano 2016	22.3269 b	7.6731 a	682.39 b
DSH	0.8182	0.5686	24.477

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). NFS= Número de frutos sanos cosechados en 35 m², NFD= Número de frutos dañados cosechados en 35 m², RS= Rendimiento de semilla en kg ha⁻¹. T1= Testigo, T2= *T. asperellum* (CSAEGro-1) + metalaxil, T3= *T. asperellum* (CSAEGro-1) + pyraclostrobin, T4= *T. asperellum* (CSAEGro-1) + tiofanato metílico, T5= *T. asperellum* (CSAEGro-1) + quintozeno, T6= *T. asperellum* (CSAEGro-1) + cyprodinil + fludioxonil, T7= *T. asperellum* (CSAEGro-1) + procloraz, T8= *Trichoderma virens* (PHC RootMate®) + metalaxil, T9= *Trichoderma virens* (PHC RootMate®) + pyraclostrobin, T10= *Trichoderma virens* (PHC RootMate®) + tiofanato metílico, T11= *Trichoderma virens* (PHC RootMate®) + quintozeno, T12= *Trichoderma virens* (PHC RootMate®) + cyprodinil + fludioxonil, T13= *Trichoderma virens* (PHC RootMate®) + procloraz, DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

Número de frutos dañados

Esta característica presentó diferencias significativas por efecto de los tratamientos, ciclos de cultivo y fungicidas ($P \leq 0.0001$), pero las cepas mostraron un comportamiento similar. En el testigo se registró la mayor incidencia de pudrición de frutos, la cual fluctuó de 2.37 a 11. El menor daño en frutos se obtuvo con el tratamiento *T. asperellum* (CSAEGro-1) + metalaxil (T2) (Cuadro 6). Por otro lado, fue en el ciclo Primavera-verano 2015, cuando se cosecharon menos frutos dañados (Cuadro 7 y Figura 6). Se determinó mediante el análisis combinado, que con el fungicida quintozeno utilizado en el ciclo Primavera-verano 2015, se tuvo el menor daño en frutos; por otro lado, se comprobó que los tratamientos con las cepas *T. asperellum* (CSAEGro-1) y *T. virens* (PHC RootMate®), producen un comportamiento similar respecto a la incidencia de pudrición de frutos (Cuadro 7).

Islam *et al.* (2016) probaron especies de *Trichoderma* para el control de la pudrición del tallo de jitomate causada por *Sclerotium rolfsii*; encontraron que con *T. asperellum* se redujo la incidencia de la enfermedad; el efecto fue más consistente cuando el biocontrolador se inoculó en la semilla y se aplicó en el suelo; en el presente trabajo se obtuvo resultado similar, porque el tratamiento con *T. asperellum* (CSAEGro-1) disminuyó la incidencia de pudrición de frutos en calabaza pipiana; aunque el menor daño en frutos se registró con la combinación de *T. asperellum* + metalaxil. Al respecto, Mueller y Bradley (2008) argumentaron que el grupo de las fenilamidas presentan propiedades sistémicas, por lo que cuando penetran en la planta, se transportan sistémicamente hasta los frutos y los protege contra la infección de *S. rolfsii*. En el análisis del efecto de los fungicidas, se determinó que el quintozeno suprimió la incidencia del patógeno y registró menor daño en fruto; el efecto positivo de quintozeno se debe a que afecta la integridad de la membrana y la pared celulares, así como las mitocondrias en los hongos fitopatógenos, lo que hace que disminuya la formación de esclerocios y propágulos infecciosos (Latin, 2011). Asimismo, se encontró que el clima jugó un papel importante en la reducción de daños en el

ciclo 2015, puesto que se registró una precipitación media de solo 145 mm durante el ciclo de cultivo (junio-octubre).

Rendimiento de semilla en kg ha⁻¹

Este componente es el de mayor interés, porque determina la productividad y rentabilidad que puede generar este cultivo. Se encontró diferencia significativa sólo por el efecto de los tratamientos, ciclo de cultivo y fungicidas ($P \leq 0.0001$). La prueba de comparación múltiple de medias detectó que los rendimientos más altos fueron 901.64 y 883.89 kg ha⁻¹, los cuales se obtuvieron con los tratamientos *T. asperellum* (CSAEGro-1) + metalaxil y *T. asperellum* (CSAEGro-1) + cyprodinil + fludioxonil, respectivamente. Se encontró de nuevo que el mayor rendimiento se obtuvo en el ciclo Primavera-verano 2015, porque en éste se presentó menor precipitación, en comparación con el ciclo Primavera-verano 2014 (Cuadro 6 y Figura 6). El efecto individual de los fungicidas permitió conocer que la combinación de cyprodinil + fludioxonil, fue el tratamiento más destacado por obtener el mayor rendimiento de semilla, de 862.71 kg ha⁻¹. A pesar de no haber encontrado diferencia significativa entre las dos cepas evaluadas, se notó que *T. asperellum* (CSAEGro-1) registró un rendimiento de semilla ligeramente superior, que la cepa comercial *T. virens* (PHC RootMate®) (Cuadro 7).

Estos resultados concuerdan con lo postulado por Rather *et al.* (2012), quienes mencionan que la utilización de metalaxil + *Trichoderma* sp. reduce la incidencia de la marchitez en chile (*Capsicum annum* L.) y además promueve un mayor rendimiento. Akgul *et al.* (2011) aplicaron varios fungicidas en campo para el control de *S. rolfsii* patógeno de cacahuete, y encontraron que con el metalaxil disminuyó la incidencia del patógeno y además se incrementó el rendimiento; lo reportado por esos autores coincide con los resultados de campo obtenidos en el presente ensayo, porque con el metalaxil y *Trichoderma*, se produjeron los mayores rendimientos; finalmente, Mouden *et al.* (2016) estudiaron recientemente el efecto de cyprodinil + fludioxonil, en el control *in vivo* de los patógenos de fresa *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*; reportaron que la combinación cyprodinil + fludioxonil fue la más efectiva porque presentó

100 % de inhibición; el excelente control de patógenos con este tratamiento de fungicidas químicos, corrobora que estos productos tienen un gran potencial para utilizarse en el manejo integrado de patógenos, tal como se comprobó en la presente investigación. Según estos ingredientes activos protegieron de la infección a los frutos de calabaza y coadyuvaron a obtener el rendimiento de semilla más sobresaliente en campo. Los resultados obtenidos con *Trichoderma*, se deben a su rápido crecimiento, amplia plasticidad ecológica (Harman, 2004), mecanismos de acción directa (competencia por sustrato, antibiosis y micoparasitismo), los cuales manifiestan su potencial antagonista contra fitopatógenos habitantes del suelo como *S. rolfsii* (Infante *et al.*, 2011); esto incentiva a incorporar especies como *Trichoderma asperellum* en el manejo integrado de este hongo patógeno en condiciones de campo (Hoyos *et al.*, 2008), lo cual permite obtener, como se detectó en el presente estudio, un rendimiento comercialmente aceptable de semilla de calabaza.

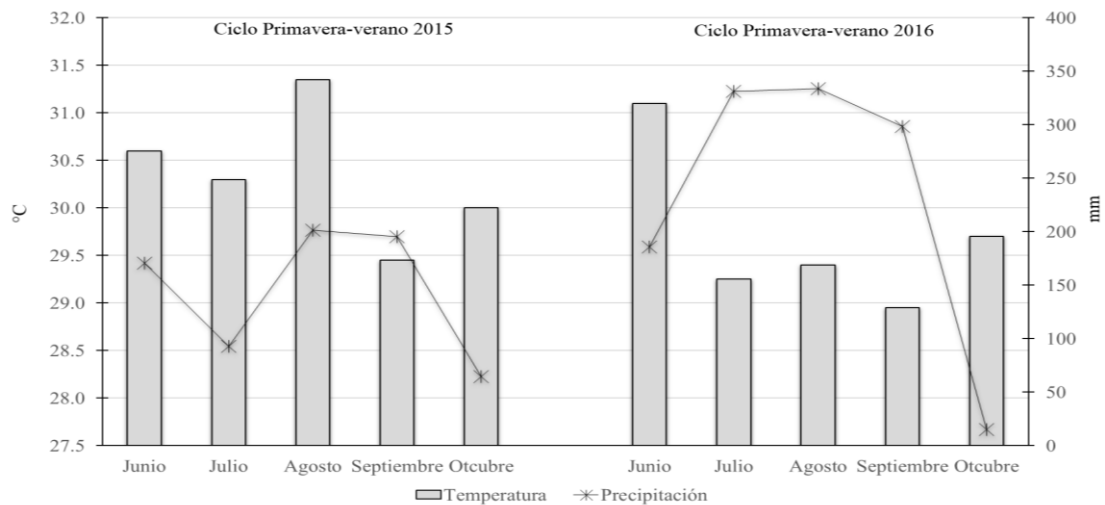


Figura 6. Temperatura y precipitación de los ciclos de cultivo Primavera-Verano 2015 y 2016.

Cuadro 7. Análisis de la estructura factorial sin incluir al tratamiento testigo del ciclo de cultivo 2015 y 2016, cepas de *Trichoderma* spp., y fungicidas, sobre la obtención de frutos sanos, dañados y rendimiento de semilla, en el cultivo de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*).

	Variables		
	NFS	NFD	RS
Ciclo			
Primavera-verano 2015	28.6667 a [†]	1.1458 b	885.60 a
Primavera-verano 2014	23.3958 b	7.1042 a	715.36 b
DSH	0.7957	0.7974	24.619
<i>Trichoderma</i>			
<i>T. asperellum</i> (CSAEGro-1)	26.4167 a	4.1042 a	806.52 a
<i>T. virens</i> (PHC RootMate [®])	25.6458 a	4.1458 a	794.44 a
DSH	1.4487	0.6902	51.395
Fungicida			
metalaxil	28.0000 a	3.0625 b	852.09 a
pyraclostrobin	27.5625 ab	3.6875 b	832.84 a
tiofanato metílico	21.6875 c	7.5000 a	658.86 b
quintozeno	26.1875 ab	3.0000 b	820.84 a
cyprodinil + fludioxonil	27.3750 ab	3.0625 b	862.71 a
procloraz	25.3750 b	4.4375 b	775.55 a
DSH	2.428	1.7429	104.78

[†]Valores de medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). NFS= Número de frutos sanos cosechados en 35 m², NFD= Número de frutos dañados cosechados en 35 m², RS= Rendimiento de semilla ha⁻¹ en kg. DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

CONCLUSIONES

Mediante características morfológicas, patogénicas y moleculares, se identificó a *Sclerotium rolfsii* como patógeno causante de la pudrición algodonosa de frutos de calabaza pipiana.

En condiciones *in vitro* las cepas *Trichodera virens* G-41 (PHC RootMate®) y *T. asperellum* cepa CSAEGro-1, y los fungicidas metalaxil, pyraclostrobin, quintozeno, cyprodinil + fludioxonil y procloraz, presentaron efecto fungicida en el desarrollo *S. rolfsii*, y el de tiofanato metílico solo efecto fungistático.

En campo, los tratamientos *T. asperellum* (CSAEGro-1) + metalaxil, y *T. asperellum* (CSAEGro-1) cyprodinil + fludioxonil, protegieron la sanidad de frutos y favorecieron el incremento del rendimiento de semilla en el cultivo de calabaza pipiana.

En el ciclo Primavera-verano 2015 se presentó menor precipitación y consecuentemente, se favoreció el aumento del rendimiento de frutos y semilla en el cultivo de calabaza pipiana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización del presente trabajo. J. F. Díaz-Nájera reconoce con gratitud el apoyo incommensurable otorgado por el Dr. S. Ayvar-Serna, Dr. A. Mena Bahena y el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, al Dr. O. Alvarado-Gómez y al laboratorio Biociencia S. A. de C. V. por facilitar las instalaciones para la realización del proyecto de investigación, y al Instituto de Horticultura así como al personal administrativo y de apoyo, por brindar las facilidades para culminar este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akgul, D. S., Ozgonen, H., Erkilic, A. (2011). The effects of seed treatments with fungicides on stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc., in peanut. Pak. J. Bot. 43(6): 2991-2996.
- Alvarado, M. L. Rivera, M. W. (2016). Molecular identification of *Trichoderma* spp. in garlic and onion fields and *in vitro* antagonism trials on *Sclerotium cepivorum*. Rev. Bras. Cienc. Solo. 40: 1-9.
- Amule, R., Gupta, O., Mishra, M. (2014). Techniques for screening of chickpea genotypes against collar rot, its management through host plant resistance and fungicides. Legume Res. 37(1): 110-114.
- Apáez, B. P., Escalante, E. J. A. S., Rodríguez, G. M. T. (2013). Producción de vaina verde en frijol chino y tipo de espaldera en clima cálido. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 129-140.
- Ayala, A. Q. A., Cortez, M. E., Apodaca, S. M. Á., Leal, L. V. M., Valenzuela, E. F. A., Palacios, M. C. A. (2015). Producción de vaina verde en frijol chino y tipo de espaldera en clima cálido. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11: 2145-2156.
- Ayvar, S. S., Mena, B. A., Durán, R. J. A., Cruzaley, S. R., Gómez, M. N. O. (2007). La calabaza pipiana y su manejo integrado. Folleto técnico. Fundación Produce de Guerrero, A. C. Campo Experimental Iguala. CSAEGro. Iguala, Gro. México. 26 p.
- Díaz, N. J. F., Alvarado, G. O. G., Leyva, M. S. G., Ayvar, S. S., Michel, A. A. C. and Vargas, H. M. (2015). Identification and control of fungi causing fruits rot in pipiana pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber). African Journal Agricultural Research 10(11): 1150-1157.
- Díaz, N. J. F., Vargas, H. M., Ayvar, S. S., Alvarado, G. O. G., Solís, A. J. F., Durán, R. J. A., Díaz, C. H. L. y Hernández, A. A. (2014). Identificación

morfológica y por PCR de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de frutos de calabaza pipiana y su manejo en invernadero. *Biotecnia* 16(3): 17-21.

Fan, J., Urban, M., Parker, J. E., Brewer, H. C., Kelly, S. L., Hammond-Kosack, K. E., Fraaije, B. A., Liu, X., Cools, H. J. (2013). Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *The New Phytologist*. 198: 821-835.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fishel, F. M., Dewdney, M. M. (2012). Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) Classification scheme of fungicides according to mode of action. PI94. University of Florida. 7 p.

García, E. (2005). Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4^a. Edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 217 p.

García, V. R., González, D. J. G., Domínguez, A. G., Ayala, E. V., Aguilar, M. S. (2012). *Rosellinia necatrix* en *Rosa* sp. y su evaluación a sensibilidad de fungicidas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18(1): 39-54.

Garza, O. S., Núñez G. H. C., Serrano, A., E., Huez, L. M. A., López E. J. (2010). Comportamiento diferenciado de líneas, híbridos y criollos de calabaza arota (*Cucurbita argyrosperma* Huber) en primavera y otoño. *Biotecnia* 12(3): 3-13.

Hall, T. (2004). BioEdit version 7.0.0. Isis Pharmaceuticals Inc. 192 p. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/biodoc.pdf>.

Harman, G. E. (2004). Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84: 377-393.

- Hirpara, D. G., Gajera, H. P., Hirpara, H. Z., Golakiya, B. A. (2017). Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc.: evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonists. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 27: 22-28.
- Hoyos, C. L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., Sergio, O. (2008). Evaluation of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* under *in vitro* and greenhouse conditions. Agron. Colomb. 26(3): 451-458.
- Infante, D., González, N., Reyes, Y., Martínez, B. (2011). Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo. Revista Protección Vegetal 26(3): 194-197.
- Islam, M. M., Delwar, M., Hossain, M. N., Naoki, H. (2016). Biological control of tomato collar rot induced by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma* species isolated in Bangladesh, Archives of Phytopathology and Plant Protection DOI:10.1080/03235408.2016.1265243
- John, N. S., Anjanadevi, I. P., Nath, V. S., Sankar, S. A., Jeeva, M. L., John, K. S., Misra, R. S. (2015). Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of Amorphophallus – A polyphasic approach. Biological Control 90: 164–172.
- Khan, I. H., Javaid, A. (2015). Chemical control of collar rot disease of chickpea. Pak. J. Phytopathol. 27(01): 61-68.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33(7): 1870–1874.
- Latin, R. (2011). Practical Guide to Turfgrass Fungicides. APS Press. St. Paul, Minnesota U.S.A. 270 p.

- Liang, H. J., Di, Y. L., Li, J. L., You, H., Zhu, F. X. (2015). Baseline sensitivity of pyraclostrobin and toxicity of SHAM to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 99: 267-273.
- Mahato, A., Mondal, B., Dhakre, D. S., Khatua, D. C. (2014). *In vitro* sensitivity of *Sclerotium rolfsii* towards some fungicides and botanicals. Scholars Academic Journal of Biosciences 2(7): 467-471.
- Manu, T. G., Nagaraja, A., Chetan, Janawad, S., Hosamani, V. (2012). Efficacy of fungicides and biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii* causing foot rot disease of finger millet, under in vitro conditions. Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences 1(2): 46-50.
- Mouden, N., Chliyah, M., Benkirane, R., Ouazzani, A. T., Douira, A. (2016). Chemical control of some strawberries fungal pathogens by foliar fungicides under *in vitro* and *in vivo* conditions. International Journal of Recent Scientific Research 7(2): 9037-9051.
- Mueller, D. S., Bradley, C. A. (2008). Field Crop Fungicides for the North Central United States. North Central Integrated Pest Management Center. 29 p.
- Mukherjee, M., Horwitz, B. A., Sherkhane, P. D. (2006). A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens* evidence from analysis of genes under expressed in a mutant of defective in morphogenesis and antibiotic production. Current Genet. 50: 193-202.
- Parmar, H. J., Bodar, N. P., Lakhani, H. N., Patel, S. V., Umrana, V. V., Hassan, M. M. (2015). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during in vitro antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut. 9(6): 365-372.
- Patil, N. N., Waghmo de M. S., Gaikwad, P. S., Gajbhiye, M. H., Gunjal, A. B., Nawani, N. and Kapadnis, B. P. (2014). Potential of *Microbispora* sp. V2 as biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii*, the causative agent of

- southern blight of *Zea mays* L. (Baby corn) in vitro studies. Indian Journal of Experimental Biology 52(1): 1147-1151.
- Pérez, M. L., Belmonte, V. J. R., Núñez, Palenius, H. G., Guzmán, M. R., Mendoza, C. B. (2015). Sensibilidad de especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 256-267.
- Punja, Z. K., Damiani, A. (1996). Comparative growth, morphology and physiology of three sclerotium species. Mycologia 88(5): 694-706.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G., Adams J. G. C. (1982). Influence of nutrition, environment and the isolate on basidiocarp formation, development and structure in *Athelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. Mycology 74(6): 917-926.
- Rather, T. R., Razdan, V. K., Tewari, A. K., Shanaz, E., Bhat, Z. A., Hassan, M. G., Wani, T. A. (2012). Integrated management of wilt complex disease in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) Journal of Agricultural Science 4(7): 141-147.
- Rondon, A., Flores, Y., Soto, E. and Mujica, Y. (1995). Chemical control *in vitro* and in the greenhouse of the fungus causing white rot. Revista de la Facultad de Agronomía 12(1): 1-13.
- Saccardo, P. A. (1931). *Sclerotium rolfii* (1500 pp). Pavia, Italy: Sylloge Fungorum XXII.
- Shoresh, M., Harman, G. E. (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. Plant Physiol. 147: 2147-2163
- Sohbat, B., Reza, A., Saeed, A. (2015). Anti-fungal properties of 43 plant species against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*, Archives of Phytopathology and Plant Protection 48(4): 336-344.

- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2015). SAS Inc. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute in corporation, Cary, N.C. USA: Author.
- Suryawanshi, A. P., Borgaonkar, A. S., Kuldhar, D. P., Dey, U. (2015). Integrated management of collar rot (*Sclerotium rolfsii*) of brinjal (*Solanum melongena*). Indian Phytopath. 68(2): 189-195.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.
- Watanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A. Inns, D. H. Gelfland, J. J. Sninsky, And T. J. White (eds.). PCR Protocols. Pp.315- 322. Academic Press. San Diego, CA.
- Zitter, T.A., Hopkins, D.L., and Thomas, C.E. (2004). Plagas y Enfermedades de las *cucurbitáceas*. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa. 88 p.

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN GENERAL

CAPÍTULO IV.

DISCUSIÓN GENERAL

Las calabazas son de las primeras plantas domesticadas en Mesoamérica (Smith, 1997). La familia de las cucurbitáceas, incluye a *Cucurbita*, que es un género neotropical del que se reconocen 20 especies distribuidas desde Estados Unidos de América (EUA) hasta Argentina, en regiones tropicales y subtropicales (Renner y Schaefer 2016).

México es uno de los principales países productores de calabaza (*Cucurbita* spp. L.) de las cuales se aprovechan como alimento las flores, guías, semillas, fruto tierno y maduro (Stephens, 2009). Las frutas inmaduras se consumen como vegetales; la fruta madura es dulce y se usa para hacer productos de confitería; las semillas, ricas en aceite, también se usan en México, se mezclan con miel para preparar postres conocidos como palanquetas; la flor y las guías tiernas, también son comestibles son usadas para preparar quesadillas. Otros usos son en la medicina tradicional (Pérez, 2016), planta fitorremediadora e incluso para fines decorativos (Srbinoska *et al.*, 2012). *Cucurbita* spp. se cultiva en todo el mundo y es un cultivo económicamente importante para muchos países (Pérez, 2016).

Las enfermedades constituyen un importante factor reductor del rendimiento alcanzable de los cultivos agrícolas sobre los que inciden. En *Cucurbita* spp., las causadas por begomovirus y hongos habitantes del suelo son las más difíciles de manejar (Sáez *et al.*, 2016; Mahadevakumar *et al.*, 2016).

La Fitopatología como ciencia, persigue reducir en lo posible las pérdidas económicas que ocasionan dichas enfermedades y, con este objetivo, establece que es necesario un adecuado conocimiento de la biología de los agentes fitopatógenos y de la epidemiología de las enfermedades que causan para poder diseñar medidas y estrategias de control adecuadas y eficientes (Jiménez *et al.* 2003).

La unidad fundamental de estudio de esta tesis abordó el estudio de i) diagnóstico de la especie de mosca blanca vector de virus, ii) identificación con técnicas moleculares, de patogenicidad y filogenia al virus asociado al rizado de la hoja de calabaza, al vector y a la maleza *Proboscidea louisianica*, como reservorio natural, iii) estudiar la transmisión y patogenicidad del virus en calabaza, iv) conocer la incidencia y dinámica poblacional de mosca blanca en el cultivo, v) evaluar el efecto de diferentes grupos de insecticidas sobre mosca blanca, incidencia y severidad de virosis en los genotipos Depredador y Grey Zucchini en dos años de cultivo, vi) identificar al agente causal de la pudrición de frutos en calabaza, evaluar *in vitro* y en campo cepas de *Trichoderma* spp. y fungicidas durante dos ciclos consecutivos de cultivo.

La mosca blanca es una de las plagas de insectos de mayor importancia agrícola a nivel mundial. Aunque este insecto ha sido tradicionalmente considerado un grupo de especies hermanas con aproximadamente 33 biotipos (Brown, 2010), el análisis genético reciente sugiere que la mosca blanca *Bemisia tabaci* es un complejo de especies que comprende quizás 24 o más especies morfológicamente indistinguibles. *B. tabaci* se distingue de otras moscas blancas por sus características fenotípicas variables, que incluyen el rango de hospedantes, la fecundidad, la dispersión, la capacidad de vectorización de begomovirus (Sáez *et al.*, 2016). El diagnóstico del presente trabajo permitió identificar a la población de mosca blanca como *Bemisia tabaci* en base a características fenotípicas de la ninfa. *B. tabaci* causa daño directo a través de la alimentación del floema y la inyección de toxinas. El daño indirecto ocurre a través de la transmisión de begomovirus como SLCV, como se observó en este estudio.

Los begomovirus son una gran variedad de virus de plantas que infectan una amplia variedad de plantas como malezas, cultivos y plantas ornamentales y causan una notable pérdida para la agricultura y la horticultura en todo el mundo. Las malas hierbas están ampliamente dispersas en todo el mundo y tienen una gran adaptabilidad ambiental, y han permitido la supervivencia

de *virus* y se propagan en ausencia de los principales cultivos. Las malezas desempeñan un papel crucial en la propagación de muchos virus de plantas al actuar como fuentes de inóculo y acortar el período de aparición de virosis en nuevos ciclos de cultivo esto porque cumplir tres roles, no excluyentes, en la epidemiología de estas enfermedades: servir como reservorio de los virus, como reservorio de los insectos vectores, o de ambos a la vez (Wisler y Norris, 2005). El presente trabajo es un aporte importante porque se identificó molecularmente y por medio de filogenia, al *Squash leaf curl virus* (SLCV) en la maleza *Proboscidea louisianica* por primera vez en México y los síntomas de virosis en la maleza fueron deformación de hojas, presencia de rugosidades, mosaicos amarillos, reducción en el tamaño, y clorosis abultamiento y clorosis foliar marginal.

El SLCV es un begomovirus transmitido por el vector *Bemisia tabaci* e induce retraso severo del crecimiento y enrollamiento de la hoja en plantas de calabaza y causa pérdidas severas en la producción de cucurbitáceas (Taha *et al.*, 2016). En esta investigación los análisis de PCR, secuenciación y filogenia comprobaron que las muestras de hojas sintomáticas obtenidas en el Valle de Cocula, Guerrero México, estaban infectadas con el SLCV. Los programas de manejo de plagas deben basarse en el conocimiento preciso de los principales factores responsables de los cambios en la dinámica de la población insectil objetivo. Los parámetros del ciclo biológico estimados en diferentes condiciones bióticas o abióticas proporcionan las herramientas básicas para comprender los cambios y comportamiento de las especies de plagas y para determinar la agregación y comportamiento de las poblaciones de *B. tabaci* dentro de los campos de cultivo, se necesita comprender con precisión la dinámica espacial y temporal del insecto y la transmisión de begomovirus como factores limitantes en la producción comercial de calabaza (Naranjo *et al.*, 2010). La incidencia de *B. tabaci* se manifestó en todas las etapas fenológicas y se relacionó con la temperatura. La severidad de SLCV presentó una tendencia creciente y se correlacionó con la temperatura, los resultados obtenidos corroboran lo que reportó Curnutte *et al.* (2014) estos autores evaluaron el efecto de la temperatura sobre el

comportamiento biológico de *B. tabaci*; reportaron que la oviposición, la supervivencia de las ninfas y la reproducción fueron afectadas significativamente por la temperatura, además de que una temperatura de 30-32 ° C es favorable para el desarrollo de *B. tabaci*.

El control de *B. tabaci* se logra principalmente a través de insecticidas químicos. Sin embargo, las preocupaciones sobre el desarrollo de resistencia han llevado a la investigación de métodos de control alternativos, incluido el uso de aceites botánicos y minerales (petróleo) (Yang *et al.*, 2010), e incluso aplicación de insecticidas de diferente grupo y modo de acción, como se observó en el presente trabajo en donde se comprobó que durante los ciclos invierno-primavera del 2014 y 2015, en los genotipos Depredador y Grey Zucchini, la aplicación de insecticidas del grupo neonicotinoides, botánicos, aceites parafrínicos, cetoenoles y piretroides, solos y mezclados afectaron adultos y ninfas de *B. tabaci*, lo que provocó la menor incidencia y severidad del Squash leaf curl virus en Calabaza.

En el presente estudio, se reporta a *Sclerotium rolfsii* como el patógeno que causa pudrición de frutos de *Cucurbita argyrosperma* observada en trópico en el sur de México, la morfología, patogenicidad y secuenciación, permitieron realizar su identificación. Se sabe que *S. rolfsii* infecta muchas plantas de cultivo económicamente importantes en diversas etapas de su crecimiento y desarrollo. Al respecto, Mahadevakumar *et al.* (2016) reportaron que *S. rolfsii* provoca pudrición de la fruta en *C. maxima*, la incidencia del patógeno aparece como una lesión impregnada de agua en la superficie de la fruta seguido por el desarrollo de grandes áreas podridas con abundante crecimiento micelial blanco de crecimiento rápido, todos esos signos patológicos son similares a los observados cuando el patógeno infecta a *C. argyrosperma*. Por otra parte en condiciones *in vitro* *Trichoderma virens* G-41, *T. asperellum* CSAEGro-1, metalaxil, pyraclostrobin, quintozeno, cyprodinil + fludioxonil y procloraz, presentaron efecto fungicida sobre el patógeno. John *et al.* (2015) evaluaron la antibiosis *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma asperellum* contra *Sclerotium rolfsii*; encontraron que la inhibición del crecimiento del patógeno osciló de 42.71 a 100.00%, valores

promedios que están dentro del rango y por encima de lo obtenido con la cepa nativa *T. asperellum* CSAEGro-1. Khan y Javaid (2015) evaluaron en condiciones *in vitro* el fungicida metalaxil para el control de *S. rolfsii* aislado de garbanzo. Reportaron que este producto logró inhibir 100% el crecimiento del patógeno. Este resultado es igual al obtenido con el mismo fungicida contra *S. rolfsii* aislado de calabaza pipiana en el presente experimento.

En condiciones de campo, *T. asperellum* CSAEGro-1 + metalaxil y *T. asperellum* + cyprodinil + fludioxonil, protegieron la sanidad de frutos e incrementaron el rendimiento de semilla. Estos resultados concuerdan con lo postulado por Rather *et al.* (2012), quienes mencionan que la utilización de metalaxil + *Trichoderma* sp. disminuye la incidencia de la marchitez en chile (*Capsicum annum* L.) y además promueve un mayor rendimiento.

Por todo lo descrito anteriormente, se deberían tomar en cuenta las medidas de manejo pertinentes para hacerle frente a las infecciones encontradas en las cucurbitáceas, como ya se ha indicado, por el SLCV así como las infecciones producidas por *Sclerotium rolfsii*, ya que de lo contrario podrían dar lugar a importantes pérdidas económicas.

En consecuencia, la meta de esta Tesis Doctoral fue el de generar conocimiento sobre la estructura y diversidad genética y patogénica de *Squash leaf curl virus* y *Sclerotium rolfsii* que infectan a *Cucurbita* spp., en Guerrero, México y otras zonas del mundo que comparten las mismas condiciones de clima, en la confianza de que ello permitirá establecer las bases científicas para el desarrollo de estrategias eficientes para el manejo integrado de esos fitopatógenos. Hasta la fecha no consta en la literatura científica que se hayan realizado investigaciones con esta aproximación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Taha, O., Farouk, I., Abdallah, A., Abdallah, N. A. (2016). Use of Posttranscription Gene Silencing in Squash to Induce Resistance against the Egyptian Isolate of the *Squash Leaf Curl Virus*. International Journal of Genomics <http://doi.org/10.1155/2016/6053147>
- Naranjo, S. E., Castle, S. J., De Barro, P. J. and Liu, S. S. (2010). Population Dynamics, Demography, Dispersal and Spread of *Bemisia tabaci*. In P. A. Stansly and S. E. Naranjo [eds.] *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer, London.
- Khan, I. H., Javaid, A. (2015). Chemical control of collar rot disease of chickpea. Pak. J. Phytopathol. 27(01): 61-68.
- Rather, T. R., Razdan, V. K., Tewari, A. K., Shanaz, E., Bhat, Z. A., Hassan, M. G., Wani, T. A. (2012). Integrated management of wilt complex disease in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) Journal of Agricultural Science 4(7): 141-147.
- John, N. S., Anjanadevi, I. P., Nath, V. S., Sankar, S. A., Jeeva, M. L., John, K. S., Misra, R. S. (2015). Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus* – A polyphasic approach. Biological Control 90:164–172.
- Curnutte, L., Simmons, A. and Abd-Rabou, S. (2014). Climate change and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): impacts of temperature and carbon dioxide on life history. *Ann Entomol Soc Am* 107:933–943.
- Pérez, G. R. M. (2016). Review of *Cucurbita pepo* (Pumpkin) its Phytochemistry and Pharmacology. Med. Chem. 6: 012-021.
- Sáez, C., Martínez, C., Ferriol, M., Manzano, S., Velasco, L., Jamilena, M., López, C. y Picó, B. (2016). Resistance to tomato leaf curruco New Delhi virus in *Cucurbita* spp. Ann. Appl. Biol. 169: 91-105.

- Mahadevakumar, S., Yadav, V., Tejaswini, G. S., Janardhana, G. R. (2016). Morphological and molecular characterization of *Sclerotium rolfsii* associated with fruit rot of *Cucurbita maxima*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 145: 215–219.
- Smith, B. D. (1997) The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*. 276: 932-934.
- Wisler, G. C. and Norris, R. F. (2005). Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Sci.* 53: 914-917.
- Renner, S. S. and Schaefer, H. (2016). Phylogeny and evolution of the *Cucurbitaceae*. In: Grumet, R., Katzir, N., Garcia-Mas, J., editors. *Genetics and genomics of Cucurbitaceae*. New York (NY): Springer International Publishing.
- Stephens, J. M. (2009). Pumpkin *Cucurbita* spp. University of Florida Cooperative Extension, Gainesville, In: <http://edis.ifas.ufl.edu/mv116>.
- Srbinska, M., Hrabovski, N., Rafajlovska, V., Sinadinović-Fišer, S. (2012). Characterization of the seed and seed extracts of the pumpkins *Cucurbita maxima* and *Cucurbita pepo* from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 31: 65-78.
- Jiménez, D.R. M., Castillo, C. P., Jiménez, G. M. M., Landa, del C. B. B., Mercado, B. J., Navas, C. J. A., Pérez, A. E., Rodríguez, J. D., Bejarano, A. J. (2003). Sanidad vegetal y profesión fitopatológica en las formas de agricultura del Siglo XXI. *Phytoma* 148: 16-27.
- Brown, J. K. (2010). Phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. p 31–67. In: Stansley, P. A., Naranjo, S. E., (ed). *Bemisia: bionomics and management of a global pest*. Springer, New York, NY.