UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS

DETECCIÓN DE GENOTIPOS DE *Solanum lycopersicum* L. RESISTENTES AL PERMANENTE DEL TOMATE (*Candidatus* Liberibacter solanacearum)

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA
JESÚS ENRIQUE RETES MANJARREZ

DIRECTOR DE TESIS INTERNO
DR. LEOPOLDO PARTIDA RUVALCABA

DIRECTOR DE TESIS EXTERNO
DR. JOSÉ ANTONIO GARZÓN TIZNADO

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, OCTUBRE DE 2011

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JESÚS ENRIQUE RETES MANJARREZ** BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADACOMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS INTERNO _____

DR. LEOPOLDO PARTIDA RUVALVABA

DIRECTOR DE TESIS EXTERNO _____

DR. JOSÉ ANTONIO GARZÓN TIZNADO

ASESOR _____

DR. JESÚS JOSÉ PORTILLO LOERA

ASESOR _____

DR. JOSÉ GUADALUPE RENDÓN MALDONADO

ASESOR _____

DRA. CLAUDIA DEL ROSARIO LEÓN SICAIROS

ASESOR _____

MC. MOISÉS BARAJAS ORTIZ

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, OCTUBRE DE 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 30 de julio del año 2020, el que suscribe Jesús Enrique Retes Manjarrez, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 01188240, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía Culiacán, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. José Antonio Garzón Tiznado y del Dr. Leopoldo Partida Ruvalcaba y cede los derechos del trabajo titulado "Detección de genotipos de *Solanum lycopersicum* L. resistentes al Permanente del Tomate (*Candidatus* Liberibacter solanacearum), a la Facultad de Agronomía Culiacán, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Jesús Enrique Retes Manjarrez

DOMICILIO: Calle 14 de septiembre # 979, Col. 5 de Mayo. Culiacán, Sinaloa, México.
TELÉFONO: 667-1272018
CORREO ELECTRÓNICO: retesmje@hotmail.com
CURP: REMJ860908HSLTNS06

AGRADECIMIENTOS

A Dios: porque gracias a él nos llenamos de ilusiones y deseos de ser alguien en la vida, por darnos presencia y estar siempre con nosotros, en las buenas y en las malas.

A mi esposa y mi hija: por brindarme siempre su apoyo incondicional en todo momento.

A mis padres: por darme el don de la vida, por estar siempre esperando mi regreso, y por todos sus consejos que me daban en su momento.

A mis hermanos: por brindarme todo su apoyo y compañerismo cuando lo necesite.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y a la Facultad de Agronomía: por brindarme la oportunidad de realizar estudios de posgrado en unos de sus programas reconocidos por el Conacyt.

Al Conacyt: por el apoyo que me proporcionó con la beca.

A la Empresa Vilmorin Inc: por proporcionarnos los recursos y condiciones que hicieron posible nuestro servicio social.

Al Dr. José Antonio Garzón Tiznado: por el gran apoyo que me brindó en la conducción y elaboración de este trabajo, por transmitirnos sus conocimientos y por el tiempo que me dedicó.

Al Dr. Leopoldo Partida Ruvalcaba: por el gran apoyo que me brindó en la conducción y elaboración de este trabajo, por transmitirnos sus conocimientos y por el tiempo que me dedicó.

DEDICATORIAS

A mi esposa y mi hija: por brindarme siempre su apoyo incondicional en todo momento.

A mis padres: por haberme dado el don de la vida, por su enseñanza de fortaleza, su humildad, su amor y por la confianza que siempre han depositado en mí.

A mis hermanos: por la muestra de compañerismo que me han demostrado, por el apoyo que siempre me brindaron, y por la unión que siempre ha existido en la familia.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

ÍNDICE DE CUADROS 1

ÍNDICE DE FIGURAS 2

I RESUMEN 4

II ABSTRACT 6

III INTRODUCCIÓN 1

IV REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

A. Importancia de la enfermedad permanente del tomate 4

1. Permanente del tomate 4

B. Organismos tipo bacteria como agentes infecciosos 7

1. Fitoplasmas 7

2. Rikettsias 12

3. Espiroplasmas 12

4. Bacterias no cultivables 17

5. Bacterias endosimbióticas 22

C. *Bactericera* (Paratrioza) *cockerelli* Sulc 23

1. Daños directos ocasionados por la toxina 27

2. Daños indirectos ocasionados por patógenos 28

D. Diagnóstico de enfermedades en plantas. 29

1. Métodos para la detección e identificación de organismos tipo bacterias no cultivables 29

Pág.

2. Sintomatología 31

3. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos 31

V JUSTIFICACIÓN 41

VI HIPÓTESIS 42

VII OBJETIVOS 42

A. Objetivo general 42

B. Objetivos específicos 42

VIII MATERIALES Y MÉTODOS 43

A. Localización del estudio. 43

B. Clima. 43

C. Suelo 44

D. Área experimental. 44

E. Fecha de siembra en vivero y obtención de plántulas 45

F Formación de las camas de siembra 46

G Fecha de trasplante 46

H Topología 46

I. Conducción de la planta 47

J. Aporque (como labor de cultivo) 47

K. Fertilización 47

L. Establecimiento de la colonia de *B. cockerelli.* 48

1. Recolección de insectos en campo. 48

2 Formación de la colonia en invernadero. 49

Pág.

3 Fuente de inoculo en invernadero. 49

M. Diseño experimental..... 49

N. Tratamientos evaluados..... 50

O. Detección del patógeno. 51

1. Extracción de DNA..... 51

2. Iniciadores para PCR..... 52

3. Amplificación del ADN por PCR..... 53

4. Análisis del ADN en agarosa 1.0 %. 54

5. Microscopía electrónica de transmisión 54

b. Post-fijación 55

c. Deshidratación 55

d. Pre inclusión 55

e. Inclusión..... 55

6. Ultramicrotomía 56

a. Cortes semifinos 56

b. Cortes finos..... 56

P. Análisis estadístico 56

IX RESULTADOS Y DISCUSIÓN 58

A. Área experimental..... 58

Figura 12. A) Excremento (Salerillo) clásico de *Bactericera cockerelli* Sulk. B) Diferentes estadíos ninfales y adultos jóvenes de *B. cockerelli* Sulk. 59

B. Fecha de siembra y obtención de plántulas..... 59

Pág.

C. Conducción de la planta 59

D. Recolección de insectos en campo 60

E. Formación de la colonia en invernadero 60

F. Fuente de inóculo..... 60

G. Detección del patógeno por PCR 60

H. Microscopía electrónica de transmisión 63

1. Enpurpuramiento 64

2 Amarillamiento 64

3 Hoja crujiente 65

4 Enrollamiento de hoja 66

5 Aborto de flor 66

6 Achaparramiento 68

7 Plantas enfermas 69

J Análisis estadístico 69

X CONCLUSIÓN..... 71

XI BIBLIOGRAFIA..... 72

XII. APÉNDICE 90

ÍNDICE DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Clasificación de fitoplasmas en grupos y subgrupos..... 11

Cuadro 2. Clasificación de espiroplasmas en grupos y subgrupos..... 16

Cuadro 3. Productos utilizados en invernadero después de la germinación..... 45

Cuadro 4. Calendario de riegos en invernadero, durante el análisis de la resistencia a *Candidatus* Liberibacter solanacerum, en genotipos de tomate (*Solanum lycopersicon* L.*).* Estación Experimental Vilmorin, Culiacán, Sinaloa, México. 46

Cuadro 5. Fertilizantes usados en fertirriego. 47

Cuadro 6. Descripción de parámetros que se evaluaron para determinar resistencia genética en genotipos de tomate contra *Candidatus* Liberibacter solanacearum. 51

Cuadro 7. Iniciadores que se utilizaron en la amplificación de fragmentos por PCR. 52

Cuadro 8. Condiciones de reacción para la amplificación de fragmentos por PCR. 53

Cuadro 9. Poblaciones promedio de individuos en diferentes estadíos biológicos de *Bactericera cockerelli* Sulk en la fuente de inóculo. 58

Cuadro 10. Observaciones de signos en las plantas de tomate infectadas con "*Candidatus* Liberobacter solanacearum" (valores medios de los rangos). 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Síntomas del permanente del tomate. 5

Figura 2. Fotomicrografía electrónica de trasmisión de tejido de floema infectado con fitoplasmas. 8

Figura 3. Fotomicrografía electrónica de transmisión de un espiroplasma. 13

Figura 4. Fotomicrografía electrónica de trasmisión de tejido de floema de tomate infectado con células de *Candidatus* Liberibacter solanacearum. Se observan cuerpos pleomórficos característicos de *C*.L.s (flechas). 21

Figura 5. Ninfas y huevecillos de *Bactericera cockerelli* Sulk. Se observan diferentes instares ninfales de color naranja y verde, así como huevesillos de color naranja de *B. cockerelli* Sulk. 26

Figura 6. Adulto de *Bactericera cockerelli* Sulk. 27

Figura 7. Hibridación tipo dot blot. Se observan sobre la lámina las manchas circulares oscuras, que indican la detección del patógeno, y donde no se observan indican la detección negativa. 33

Figura 8. Empleo de la PCR en el diagnóstico de fitopatógenos. 36

Figura 9. Fotografía satelital de la estación experimental Vilmorin INC 43

Figura 10. Área experimental donde se llevó a cabo el estudio. 44

Figura 11. Recolección de insectos adultos de *Bactericera cockerelli* Sulk en campo abierto. 48

Figura 12. A) Excremento (Salerillo) clásico de *Bactericera cockerelli* Sulk. B) Diferentes estadíos ninfales y adultos jóvenes de *B. cockerelli* Sulk. 59

Pág.

Figura 13. Amplificación por PCR del ADN de insectos sanos y virulíferos. 61

Figura 14. Amplificación por PCR del ADN de tomate como fuente de inóculo de *Candidatus* Liberibacter solanacearum. 61

Figura 15. Amplificación por PCR del ADN de tomate de los tratamientos Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda con *C*. Liberibacter solanacearum. 62

Figura 17. Fotomicrografía electrónica de tejido de tomate enfermo de *C*.L.s. Flechas indican la presencia de cuerpos pleomorficos dentro de las células. .. 63

Figura 18. Calificaciones promedio de la evaluación de Enrollamiento de hoja, Amarillamiento, Enpurpuramiento y Hoja crujiente. 66

Figura 19. Porcentaje de aborto de flor de los tratamientos evaluados. 67

Figura 20. Porcentaje de achaparramiento entre tratamientos evaluados. 68

I RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue detectar genotipos de tomate resistentes a *Candidatus* Liberibacter solanacearum. Se evaluó la resistencia genética a *C*.L.s. en cuatro variedades comerciales de tomate (Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda) y cuatro líneas (ToA-12, ToA-14, ToA-20 y ToA-43); los cuatro genotipos anteriores fueron seleccionados por su baja incidencia de síntomas (5%) en ciclos pasados en los estados de San Luis Potosí, Michoacán y Baja California, México. Por otra parte se evaluó en invernadero la resistencia a *C*.L.s. de plantas de tomate y se midieron algunas variables morfológicas, así como la detección y amplificación por PCR de un fragmento de 1168 pares de bases del patógeno. La fuente de inóculo y los bioensayos de transmisión se realizaron bajo condiciones de invernadero, para lo cual, tanto el patógeno como el vector *Bactericera cockerelli* Sulc, se colectaron en plantas de tomate y chile en el Sur de Sinaloa, México. La transmisión de planta de tomate en campo a planta de tomate en invernadero fue por insectos que provenían a partir de plantas que mostraban los síntomas característicos en campo. El tejido de plantas enfermas fue analizado por PCR con los pares de iniciadores Oa2/OI2CF y Oa2/OI2CD. Los amplicones fueron clonados en un vector comercial y posteriormente secuenciados. Los resultados mostraron el establecimiento de la fuente de infestación y la reproducción de los

síntomas de la enfermedad en las plantas de tomate expuestas a *B. cockerelli*. El bioensayo de transmisión del patógeno por el insecto fue positivo, lo que se confirmó por síntomas y por la amplificación del producto de PCR de *B. cockerelli*. Las evaluaciones de resistencia genética en invernadero indicaron que los genotipos ToA-12 y ToA-14 fueron resistentes a *C*.L.s. y son candidatos para futuro mejoramiento genético contra este patógeno.

II ABSTRACT

The objective of this research was to detect resistant tomato genotypes to *Candidatus* Liberobacter solanacearum. Genetic resistance to *C*.L.s was evaluated in four tomato comercial hibrids (Pony Express, Shanty, Reserva and Charanda) and four imbreds (ToA-12, ToA-14, ToA-20 and ToA-43), where previous genotypes were selected for their low symptoms incidence (5%) in past cycles in San Luis Potosi, Michoacan and Baja California states of México. Otherwise the resistance to *C*.L.s. was evaluated on tomato plants in a greenhouse where were measured some morfological variables, as well as the detection and amplification by PCR of a fragment of 1063 bp. Inoculum source and the bioassays for transmission were performed under greenhouse conditions, for which both the pathogen and vector (*Bactericera cockerelli* Sulc), were collected in pepper and tomato plants from south Sinaloa, Mexico. Transmission from tomato to tomato plant was performed in a greenhouse through insects from plants that showed the characteristic symptoms of the disease in the field. Tissue from diseased plants was analyzed by PCR with the primers Oa2/OI2CF y Oa2/OI2CD. Amplicons were cloned in a commercial vector and secuenced subsequently. Results showed the establishment of the source of infestation and the reproduction of the disease symptoms in the tomato plants exposed to *B. cockerelli* Sulc. Transmission bioassay of this pathogen by the insect was positive and was confirmed by the classical symtoms and for the PCR product amplification of *B cockerelli.* The genetic

resistance evaluations in the greenhouse indicated that the genotypes ToA-12 and ToA-14 were resistant to *C*.L.s. and are candidates for future genetic breeding program.

III INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es la hortaliza más difundida en el mundo; su cultivo se encuentra reportado en más de 170 países y su demanda aumenta continuamente; a nivel mundial se reportan 4.9 millones de ha/año con una producción de 126 millones de toneladas (FAOSTAT, 2009). En México, el tomate es el principal cultivo hortícola con una superficie cultivada de 53,572.62 ha en el año 2009, con un valor comercial de $12,699,612,000.00. Sinaloa históricamente es el estado de mayor importancia en el país, con una superficie cultivada de 14,907 ha (SIAP/SAGARPA, 2009). La producción nacional de tomate ha tenido altibajos, si bien su tendencia histórica ha sido creciente, los pequeños productores con recursos limitados se han vuelto menos competitivos y, por otra parte, debido a la existencia de factores bióticos como plagas y enfermedades se ha vuelto más problemático el tener éxito en este cultivo. En lo que concierne a plagas, Pacheco (1985) señala que las de mayor importancia a nivel nacional son: Mosca blanca *Bemisia tabaci* y *B. argentifolli*, trips *Frankliniella occidentalis*, gusano alfiler *Keiferia lycopersicella,* gusano del fruto *Helliothis zea* y *H. virescens*, minador de la hoja *Liriomyza spp*., gusano soldado *Spodoptera exigua,* gusano trozador *Agrotis spp*., gusano del cuerno, *Manduca sexta* y *M. quinquemaculata, y* ácaro blanco, *Poliphagotarsonemus latus.* Sin embargo, cada vez son más las plagas que se incorporan en esta lista (González, 1991), dentro de las cuales los insectos transmisores de patógenos han representado un papel primordial por los daños y la distribución de las

enfermedades que llegan a causar. Recientemente se ha sumado como “nueva” plaga a *Bactericera cockerrelli* Sulc (*Paratrioza cockerelli*), la cual se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de las regiones donde se cultiva tomate, y que ha sido descrita como vector (Garzón *et al*., 2009) del agente causal de una enfermedad conocida como “permanente del tomate” (Garzón, 1984), en la cual se ha descrito un organismo tipo bacteria denominado “*Candidatus*” Liberibacter solanacearum (Psyllaourus) (Munyaneza *et al*., 2009); las pérdidas que causan la combinación de este vector y *C.*L.s. son de gran importancia, ya que cada año llega a reducir la producción hasta en un 45% (Garzón *et al*., 1986, 2005 y 2009).

Actualmente, el “permanente del tomate” es una de las enfermedades más importantes del cultivo del tomate en México, ya que cada año llega a reducir la producción hasta en un 45%. La transmisión del agente patogénico ha confirmado su relación con *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* Sulc como vector (Garzón *et al*., 1986, 2005 y 2009), y se le ha asociado con un procarionte no cultivable. Entre los procariontes no cultivables se encuentran los fitoplasmas (Agrios, 2005) y el género Liberibacter en bacterias con este carácter. Entre los fitoplasmas existen, al menos, 50 diferentes (Lee *et al*., 1998) asociados a enfermedades en más de 300 especies de plantas (McCoy *et al*., 1989); sin embargo, como estos patógenos no pueden cultivarse *in vitro,* su definición como agente causal de alguna enfermedad sólo es posible en forma parcial, lo cual se determina por la asociación del patógeno con la enfermedad a través de

la observación al microscopio electrónico de estructuras pleomórficas de un tamaño entre 200 y 800 µm, localizadas en el floema de las plantas (Agrios, 2005) y por el análisis molecular del ADN (Lee *et al., 1998,* 2000). Después de este reporte, se ha observado que el problema ha estado creciendo año tras año, especialmente en el sur de Sinaloa en los cultivos de tomate (Munyaneza *et al.*, 2009) y chile (Munyaneza *et al.*, 2009), de ahí el interés de buscar fuentes de resistencia que sirvan de base en un programa de mejoramiento genético, como una de las estrategias para minimizar este problema.

IV REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. Importancia de la enfermedad permanente del tomate

1. Permanente del tomate

En 1984, Garzón reportó la existencia de una enfermedad que causó un 60% de daños en la producción de tomate en Guanajuato, a la que denominó “permanente del tomate” (PT), cuyos síntomas son hojas quebradizas y enrolladas, aborto de flor, sobrebrotación de yemas axilares, frutos muy pequeños y, por lo tanto, no comerciales, achaparramiento y decaimiento general de la planta (Figura 1). Los síntomas en las plantas de tomate inician con una clorosis de los brotes apicales, las hojas inferiores se enrollan tomando la apariencia de “taco” y presentan una textura quebradiza; de manera normal estas hojas son de color verde intenso y brilloso debido a una menor presencia de tricomas en la lámina foliar. Posteriormente, en las flores se manifiesta una necrosis y son abortadas. La planta es pequeña y de un color verde más intenso que las normales (Garzón, 1986).

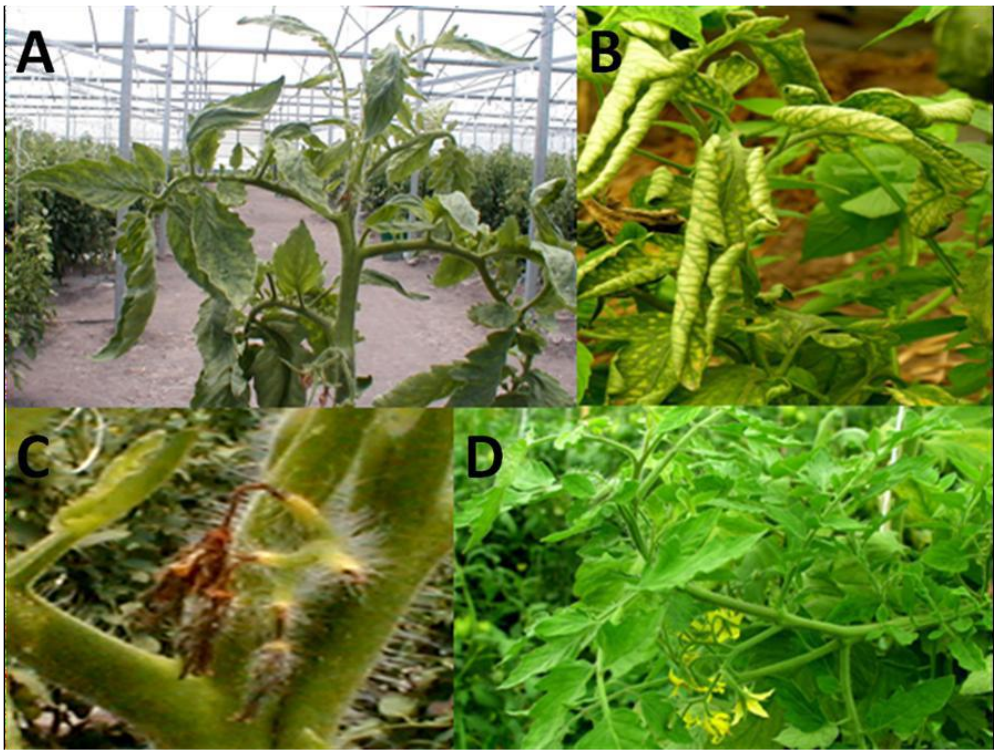

Figura 1. Síntomas del permanente del tomate.

A) Planta con decaimiento. B) Hojas enrolladas hacia arriba. C) Aborto de flor. D) Sobrebrotación de yemas axilares.

La enfermedad del PT, desde 1986 fue asociada al psilido *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* como su vector (Becerra, 1989). Este insecto ocasiona daños directos a la planta al succionar la savia (Munyaneza *et al*., 2007) e indirectos al transmitir fitoplasmas (Garzón *et al*., 2004) o bacterias no cultivables, como *C.* Liberibacter solanacearum (Munyaneza *et al*., 2009). Dichos patógenos están asociados a las enfermedades punta morada en papa o permanente del tomate en jitomate (Garzón, 2002; Garzón *et al.*, 2005; Munyaneza *et al*., 2009).

La etiología de esta enfermedad no estuvo muy clara durante 25 años; sin embargo, el análisis de alineamiento de secuencias de los productos amplificados del gen 16S rRNA de estas plantas, presentó sólo 80% de similitud con fitoplasmas, lo cual no fue un elemento para indicar su relación con este tipo de patógenos (Lee *et al*., 1998); no obstante, con algunas bacterias no cultivables su similitud fue mayor al 98%, de ahí que se haya decidido denominarlas temporalmente como “organismo tipo bacteria no cultivable” además, observaciones al microscopio electrónico describen la presencia de cuerpos pleomórficos en el floema de plantas enfermas de apariencia elongada, más parecidos a bacterias (Delgadillo *et al*., 1999).

La distribución del psilido del tomate es muy amplia, y diversos ejemplares han sido colectados de Arizona, California, Colorado, Idaho, Kansas, Minnesota, Nebraska, Nevada, Nuevo México, Dakota Norte, Oklahoma, Dakota del Sur, Texas, Utath, Wyoming en los Estados Unidos; Alberta Saskatchewan y Columbia británica en Canadá; y Durango, Tamaulipas, D.F., Michoacán en México (Plestch, 1947). En el área agroecológica del CIANO (Sonora y Baja California), Pacheco (1985) lo reportó por primera vez como plaga de algunas solanáceas cultivadas, tales como tomate, chile y berenjena. Otras áreas agrícolas de México, donde se ha reportado a esta plaga son el Noroeste, como plaga potencial de papa, El Bajío, Valle de Arista (San Luis Potosi) y La Comarca Lagunera (Coahuila); también se tiene conocimiento de la presencia de esta plaga en el área tomatera de Morelos, región papera de Arteaga,

Coahuila, área chilera de Delicias, Chihuahua, así como Nayarit, Jalisco, Baja California y Sinaloa (Nava *et al*., 2006).

La enfermedad PT fue reportada por primera vez en 2003 en el Valle de Culiacán, Sinaloa, en forma intensa tanto la enfermedad como el vector en el campo estrella donde se cultiva berenjena y tomate grape. Los síntomas de amarillamiento típicos del PT fueron evidentes y causaron grandes pérdidas económicas debido a la agresividad del problema (López *et al.*, 2003).

B. Organismos tipo bacteria como agentes infecciosos

1. Fitoplasmas

Los fitoplasmas (Figura 2) son parásitos de plantas e insectos vectores, cuyo tamaño depende del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan, pudiendo pasar lentamente a través de los poros de las células del floema.

Entre sus características se pueden mencionar: 1) ausencia de pared celular, 2) genoma con alto contenido de timina (T) y adenina (A), 3) genoma de tamaño pequeño, 4) habitan en el floema de las plantas, 5) tamaño de 0.2-1.0 µm, 6) pleomorfismo, 7) relación filogenética con los *Mollicutes* y 8) asociación con insectos vectores para su transmisión en la naturaleza (Albanese *et al*., 1995).

Sus células están rodeadas por una membrana plasmática trilaminar de aproximadamente 10 nm de grosor, constituida en un 66% de proteinas y 33% de lípidos. En el citoplasma se encuentran los ribosomas para la síntesis

proteínica y una molécula de ADN doble circular; no obstante, también se ha detectado la presencia de ADN extracromosómico (Nishigawa *et al*., 2001). Estos microorganísmos tienen un genoma que mide de 450 a 1180 Kb con alto contenido de genes, presentan un gen único de tRNA isoleucina, común en todos los fitoplasmas (Kirkpatrick *et al*., 1994), y un gen que codifica para una proteína de membrana que es única para cada tipo. Estas proteínas son abundantes en la superficie externa de la célula (Milne *et al*., 1995) y de sus estudios se podría explicar la posible interacción fitoplasma-huésped (Morton *et al*., 2003).

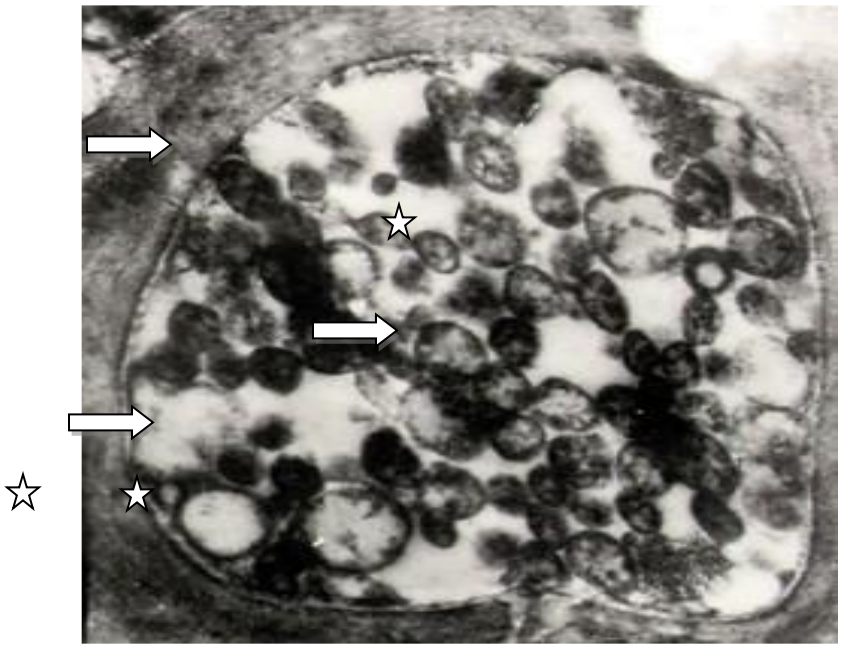

Figura 2. Fotomicrografía electrónica de trasmisión de tejido de floema infectado con fitoplasmas.

Se observan estructuras electrón-densos aproximadas a *C*.L.s. de 1µm (flechas), así como estructuras aparentemente vanas (estrellas) (Albanense *et al*., 1995).

Debido a que no pueden crecer *in vitro*, se ha dificultado la determinación de los caracteres fenotípicos necesarios para su clasificación. Sin embargo, mediante técnicas moleculares se han amplificado secuencias altamente conservadas de regiones de los genes 16S rRNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), productos que al ser sometidos a una digestión del ADN con enzimas de restricción (RFLP´s) ha sido posible diferenciarlos entre sí (Albanese *et al*., 1995); además, han confirmado la ubicación apropiada de los fitoplasmas dentro de la clase de los *Mollicutes,* así como el reconocimiento de éstos en un clado monofilético distinto dentro de esta clase (Davis y Sincalir, 1998).

Se puede decir que existen al menos 75 fitoplasmas distintos ubicados en 14 grupos y cerca de 50 subgrupos (Cuadro 1); cada grupo corresponde aparentemente al menos a una especie. El nombre de los grupos se refiere a la importancia de los síntomas observados en la enfermedad provocada por los fitoplasmas, y el nombre común asignado a éstos es representativo del nombre de la enfermedad de la planta, con la que se asociaron primero (Davis y Sinclair, 1998; Lee *et al*., 1998; Welliver, 1999).

Un solo fitoplasma puede ser el causante de varias enfermedades, las plantas pueden albergar dos o más fitoplasmas diferentes asociados al síndrome de una enfermedad, y se puede dar el caso de infecciones mezcladas como los reportados por Lee *et al*., (2002), en donde dos fitoplasmas pertenecientes al grupo del aster yellows (16S rI-A y 16S rI-O) se encontraron en plantas de soya;

Leyva *et al*., (2002), detectaron los fitoplasmas de punta morada y bola de hilo en la misma planta de papa, y Lee *et al*., (2003) detectaron dos fitoplasmas pertenecientes a los grupos 16S rI-A y 16S rI-B infectando ambos, cultivos de zanahoria, perejil y eneldo.

No obstante que los fitoplasmas se encuentran en bajas concentraciones en el floema de las plantas, les causan numerosas enfermedades y pueden transmitirse entre éllas por medio de injertos e insectos-vectores de las familias Cicadelloidea y Fulgoroidea principalmente, y muy pocos de la Psylloidea (Salazar, 1997; Kummert y Rufflard, 1997; Lee *et al*., 1998; Kakizagua *et al*., 2001).

Las chicharritas adquieren el fitoplasma al alimentarse de una planta infectada, y después de un periodo de incubación de 10-45 días, en los que el fitoplasma se multiplica en el interior del vector, llega a las glándulas salivales y se acumula hasta alcanzar los niveles necesarios como para que el insecto los introduzca a una planta sana al alimentarse de élla. El insecto infectado puede dispersar la enfermedad por el resto de su vida (Lee *et al*., 1998; Welliver, 1999), pero si el fitoplasma no llega a células específicas de las glándulas salivales, el insecto no es infeccioso (Webb *et al*., 1999; Tanne *et al*., 2001).

Cuadro 1. Clasificación de fitoplasmas en grupos y subgrupos.

Grupo 16S rRNA	Subgrupos
16S rI (aster yellow)	**A, B, C, D, E, F, K**
16S rII (peanut witches' broom)	**A, B, C, D**
16S rIII (X-disease)	**A, B, C, D, E, F, G, H, I**
16S rIV (coconut letal yellow)	**A, B**
16S rV (elm yellow)	**A, B, C**
16S rVI (clover proliferation)	**A, B**
16S rVII (ash yellow)	**A, B**
16S rVIII (loofah witches' broom)	**A**
16S rIX (pigeon pea witches' broom)	**A**
16S rX (apple proliferation)	**A, B, C, D, E**
16S rXI (rice yellow dwarf)	**A, B, C**
16S rXII (stolbur)	**A, B**
16S rXIII (mexican periwincle virescence)	**A**
16S rXIV (bermudagrass white leaf)	**A**

Davis y Sinclair (1998); *Lee et al*., (1998).

2. Rikettsias

Las rickettsias son procariontes Gram-negativo pequeños, de forma bacilar, cocoide y con frecuencia pleomórficos, son parecidos a las bacterias, pero son más pequeños, tienen pared más permeable y ondulada, que sólo se multiplican dentro de células huésped con las que mantienen una relación parasitaria o mutualista: en el primer caso están asociados con vertebrados y artrópodos, que pueden actuar como vectores o como huéspedes primarios causando enfermedades en el hombre y en otros huéspedes vertebrados e invertebrados; las formas mutualísticas se encuentran en insectos. Se ha señalado un cierto número de organismos tipo rickettsia (RLOs) asociado a enfermedades vegetales que se transmiten principalmente por injerto e insectos del grupo de los cicadélidos (chicharritas). Se han observado en el xilema de las plantas enfermas, y su característica principal es que son bacterias fitopatógenas que se cultivan con dificultad. Las enfermedades más comunes asociadas con rickettsias son: el amarillamiento, necrosis infecciosa y el mal de Pierce de la vid, la enfermedad “phony” del durazno, la hoja mazuda del trébol, la roseta latente de la remolacha y el raquitismo del retoño de la caña de azúcar (Smith, 1992).

3. Espiroplasmas

Los espiroplasmas son mollicutes pleomórficos que pueden adquirir más de una forma durante su crecimiento activo, ya que pueden observarse como espirales

(Figura 5) con un diámetro de 120 nm y una longitud de 2-4 µm, pudiendo llegar a medir hasta 15 µm en las últimas etapas del desarrollo, también presentan formas redondas u ovoides, con un diámetro de 100-250 nm o más. Carecen de pared celular y flagelos pero tienen movimiento propio, están rodeados por una membrana unitaria constituida por tres capas, requieren de esterol para crecer y son resistentes a la penicilina, pero inhibidos por tetraciclina, eritromicina, neomicina y anfotericina; además, pueden crecer en medios de cultivo artificiales.

Figura 3. Fotomicrografía electrónica de transmisión de un espiroplasma.
Se observa la presencia de un organismo en forma helicoidal característico de espiroplasmas.

Dos de los espiroplasmas más estudiados son *S. kunkelli* y *S. citri*, que se han encontrado asociados con el achaparramiento del maíz y las enfermedades persistentes de los cítricos, respectivamente; atribuidas en un tiempo a virus y

luego a micoplasmas. Estos microorganismos se han encontrado tanto en el floema como en la superficie de las plantas, y se han aislado en cultivo puro a partir de sus hospedantes y de los insectos vectores correspondientes, mientras que los de los cítricos han sido inoculados con éxito a insectos vectores y con éstos a la planta. Por lo que su patogenicidad se ha demostrado mediante los postulados de Koch (Sosa *et al*., 1997; Agrios, 2008).

Los espiroplasmas infectan varias especies de plantas, entre las que se encuentran cítricos, maíz y vinca, induciendo clorosis, achaparramiento, acortamiento de entrenudos, proliferación de vástagos, reducción en el tamaño de hojas, frutos amargos y asimétricos, necrosis del floema y enrojecimiento (Fletcher y Wayadande, 2002). Son transmitidos por ciertas especies de insectos vectores; principalmente cicadélidos y algunos áfidos, y se ha demostrado que también infectan a las abejas (Agrios, 2008). Aún antes de conocerse su verdadera naturaleza, se sabía que los agentes de muchas de esas enfermedades se multiplican en el insecto vector; de ahí que se necesite de un periodo de incubación de varios días para que el insecto que se ha alimentado en la planta enferma pueda pasar el patógeno a una planta sana. Durante este periodo ocurre una verdadera infección en los tejidos del vector, que incluso puede contrarrestarse con tetraciclinas. Se sabe que muchos cicadélidos y áfidos también transmiten virus, y que algunos de éstos se multiplican en el vector, por lo que esta similitud entre la forma de transmisión de ambos tipos de patógeno hace que todavía exista duda sobre la etiología de

algunas enfermedades transmitidas por cicadélidos o áfidos en forma propagativa, cuyo agente causal no ha sido observado; pues podrían ser causadas por virus, fitoplasma o espiroplamas (Gonzáles, 1985). El patógeno que produce el achaparramiento del maíz fue el primer espiroplasma descubierto, es muy parecido al patógeno que produce la enfermedad persistente de los cítricos y es transmitido por varias chicharritas como *Dalbulus elimatus* y *D. maidis* entre otras (Agrios, 2008).

Desde su primera clasificación en 1976, el grupo de espiroplasmas ha sido modificado con el paso de los años debido a reasignación y descubrimiento de nuevos espiroplamas. Actualmente estos microorganismos se encuentran distribuidos en 34 grupos y 14 subgrupos (Cuadro 2) (Williamson *et al*., 1998).

Cuadro 2. Clasificación de espiroplasmas en grupos y subgrupos.

Grupo	Subgrupos	Especie
I	1, 2, 3	S. citri, S. melliferum, S. kunkelli
	4, 5	
	6	S. insolitum
	7	
	8	S. phoeiceum
II		
III		S. florícola
IV		S. Apis
V		S. mirum
VI		S. ixodetis
VII		S. monobiae
VIII	1, 2	S. syrphidicola, S. chrysipicola
	3	
IX		S. clarkii
X		S. culicicola
XI		S. velocicrescens
XII		S. diabroticae
XIII		S. sabaudiense
XIV		S. corruscae
XV		
XVI	1	S. cantharicola
	2,3	
XVII		
XVIII		S. litorale
XIX		S. lampyridicola
XX		S. leptinotarsae
XXI		
XXII		S. taiwanense
XXIII		S. gladatoris
XXIV		S. chinense
XXV		S. diminutum
XXVI		S. alleghenense
XXVII		S. lineolae
XXVIII		S. platyhelix
XXIX		
XXX		
XXXI		S. montanense
XXXII		S. helicoides
XXXIII		S. tabanidicola
XXXIV		

4. Bacterias no cultivables

Las bacterias fueron observadas por vez primera a fines del siglo XVII, por Anthony van Leeuwenhoek, en 1876. Louis Pasteur y Robert Koch, entre otros, realizaron grandes descubrimientos sobre las bacterias como organismos vivos y su acción, incluyendo el que fueran agentes causales de enfermedades.

Los primeros estudios con respecto a que las bacterias producían enfermedades en las plantas se iniciaron alrededor de 1880; Thomas J. Burril aportó evidencias de que una bacteria era la causa del tizón del fuego del peral y del manzano; poco después se demostró que otras enfermedades de las plantas eran producidas por bacterias. Las aportaciones de E.F. Smith sobre el estudio de las enfermedades bacterianas de las plantas, en particular los marchitamientos bacterianos de las cucurbitáceas, solanáceas y crucíferas, despejaron cualquier duda acerca de la importancia de esos microorganismos como fitopatógenos, y Jan Hendrik Wakker fue el primero en comprobar, mediante los postulados de Koch, que las bacterias causaban enfermedades en las plantas (Agrios, 2008; Dirk, 2006).

Hasta la primera mitad del siglo XX la fitobacteriología fue una ciencia prácticamente descriptiva. Desde la segunda mitad, con el progreso de otras disciplinas tales como bioquímica, fisiología y principalmente biología molecular, las investigaciones tendieron cada vez más a explicar la interacción entre las plantas y los patógenos, por ejemplo, conocer cuáles son las sustancias que produce el hospedero para defenderse de las bacteria, o cuáles son las señales

que intervienen en el reconocimiento de los hospederos por las bacterias. En los últimos años los mayores avances en el conocimiento se han obtenido con el perfeccionamiento y desarrollo de las técnicas moleculares (Dirk, 2006).

Las técnicas de la biología molecular, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han permitido reconocer claramente la existencia de microorganismos no cultivables (Hugenhotz *et al*., 1998; Liesack y Stackebrandt, 1992), ya que a partir de muestras ambientales, de diferentes suelos o del interior de plantas, se puede aislar ADN sin pasar por un paso de cultivo. El ADN se usa como molde para la amplificación de los genes ribosomales existentes en la muestra. Esto se logra con una enzima polimerasa y oligonucleótidos dirigidos a las regiones que se encuentran conservadas de los genes ribosomales en todas las bacterias. Los fragmentos sintetizados se clonan en vectores y se determina la secuencia nucleotídica. Las secuencias obtenidas de los genes del ARN ribosomal se comparan con las existentes en los bancos de datos. Con este enfoque se ha encontrado una diversidad que no se detecta con los métodos de microbiología tradicional (Zehr *et al*., 1998).

Existen programas para verificar que las secuencias obtenidas de ADN ambientales no sean artefactos o quimeras, híbridos de genes de diferentes microorganismos (Komatsoulis y Waterman, 1997). Si las secuencias no se parecen a la de ningún microorganismo existente en más de un 97%, es posible que se trate de una bacteria nueva, tal vez no cultivable. La secuencia obtenida permite también identificar aquellos fragmentos de secuencias exclusivos de

élla, esto es que no se encuentran en ninguna otra especie reportada. Fragmentos correspondientes a estas secuencias particulares se sintetizan en máquinas sintetizadoras de iniciadores (oligos), marcados con nucleótidos fluorescentes, y se utilizan en las muestras originales para visualizar por microscopía el tipo de bacteria que corresponde a los genes en cuestión, de preferencia en microscopios confocales (Komatsoulis y Waterman, 1997).

A las bacterias no cultivables, detectadas por su secuencia de genes ribosomales, se les designa como “candidatos”; algunos ejemplos son *Candidatus* Liberibacter africanus, *Candidatus* Phytoplasma pyri, *Candidatus* Phlomobacter fragaria, entre otros. El término *Candidatus* fue propuesto por Murray y Schleifer en 1994, para aquellos grupos taxonómicos de procariontes de los cuales se dispone de alguna información pero se desconocen las características requeridas por el Código de Nomenclaltura de Bacterias para su ubicación taxonómica correcta (Agrios, 2008).

a. *Candidatus* Liberibacter

Canidatus Liberibacter es una bacteria Gram-negativo (Garnier *et al*., 1984; Jagoueix *et al*., 1996) no cultivable que se aloja en los vasos conductores de sabia o floema de algunos géneros de las rutáceas. Su tamaño varía de 350-550 x 600-1500 nm y un grosor de 20-25 nm. Generalmente son cuerpos en forma de barras y pleomórficos durante su crecimiento (Batool *et al*., 2007). Tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivales de

psílidos vectores, y es transmitida por los psílidos *Trioza erytreae* (Del Guercio) y *Diaphorina citri* Kuwayama. Es una bacteria persistente no propagativa (se reproduce dentro del insecto pero no se transmite a otras generaciones), la bacteria enferma al vector, el vector se alimenta de la planta y le transmite la enfermedad, la bacteria se mueve por el floema y al tapar los vasos floemáticos impide la circulación de los nutrimentos (INISAV, 1999; Hung *et al*., 2004; Doddapaneni *et al*., 2008).

Aunque no ha sido posible hacerlas crecer en medios artificiales, de acuerdo al análisis de la secuencia nucleotídica del gen ribosomal 16S RNA, se han caracterizado como un género nuevo de las α-proteobacterias con el nombre común "*Candidatus*" liberibacter (Jagoueix et al., 1994).

Esta bacteria es la responsable de la enfermedad Huanglonbing, una de las enfermedades más severas de los cítricos en Asia y África, ya que disminuye rápidamente la vida útil de las plantas, afectando plantas jóvenes y adultas, lo que repercute en grandes pérdidas económicas en la industria de los cítricos (Das, 2004). Existen tres formas principales de esta enfermedad que se encuentran asociadas a tres especies, *Ca.* Liberibacter asiaticus (Las), *Ca.* Liberibacter africanus (Laf) y *Ca.* Liberibacter americanus (Lam) (Bové, 2006; Jagoueix *et al*., 1994).

Recientemente, Hansen et al., (2008) y Morris *et al*., (2009), reportaron una especie nueva de Liberibacter, a la que han llamado *Candidatus* Liberibacter psyllaurous y *Candidatus* Liberibacter solanacearum respectivamente, que

posee características diferentes a las de las especies ya conocidas, pues esta nueva especie se ha encontrado infectando solanáceas: papa, tomate y chile, principalmente. Además de haberla encontrado infectando al psílido *Bactericera cockerelli* a quien asociaron como su vector.

Los síntomas de esta enfermedad varían en todas las variedades y condiciones de crecimiento. En tomates, los síntomas incluyen enrollamiento y amarillamiento de las hojas, achaparramiento de la planta y desarrollo disparejo o deforme de la fruta. En chiles, los síntomas incluyen hojas deformadas de color verde claro o amarillo con tallos acortados, caída de flores y muerte repentina de las partes de las plantas (Biosecurity NewZealand, 2008). Estudios recientes en tomate, han demostrado que este organismo se encuentra asociado a la enfermedad conocida como permanente del tomate en Nueva Zelanda (figura 4) (Liefting *et al*., 2009).

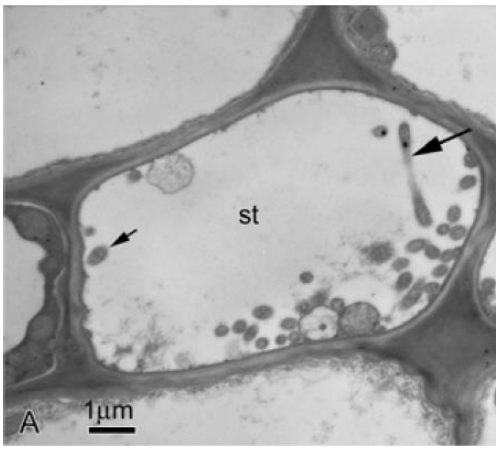

Figura 4. Fotomicrografía electrónica de trasmisión de tejido de floema de tomate infectado con células de *Candidatus* Liberibacter solanacearum. Se observan cuerpos pleomórficos característicos de *C*.L.s (flechas).

5. Bacterias endosimbióticas

Las bacterias endosimbióticas son microorganismos que llevan millones de años de evolución en el interior de insectos, como psílidos, mosquita blanca, áfidos, y gorgojos, estableciendo una relación metabólica muy íntima con éllos, ya que este tipo de insectos se alimentan de la savia de las plantas, la cual es el componente del sistema vascular normalmente usado para transportar azúcares y otros nutrimentos orgánicos. A pesar de la presencia de nutrimentos, el floema usualmente contiene aminoácidos esenciales que no pueden ser sintetizados por animales, así estas bacterias a cambio de azúcares y aminoácidos no esenciales, proveen a sus hospederos de aminoácidos esenciales, esteroles vitaminas y cofactores (Baumann, 2005; Wu y col, 2006). La disponibilidad de nutrimentos en el entorno de las bacterias ha hecho que sus genomas perdieran información y sufrieran una reducción muy drástica en el número de genes. Así, estas bacterias contienen los genomas celulares con menor contenido de genes que se conocen (Baumann, 2005; Wu y col, 2006).

La simbiosis bacteriana está ampliamente distribuida entre los insectos, y se ha estimado que al menos del 15-20% de todos los insectos viven en una relación de este tipo. Este es el caso de la simbiosis mutualista de *Buchnera aphidicola* y *Candidatus Carsonella ruddii* con áfidos y psílidos respectivamente. Estas bacterias simbióticas residen en células hospederas especializadas llamadas bacteriocitos, las cuales forman órganos simbióticos llamados bacteriomas (Buchner, 1965). La transmisión bacterial ocurre de manera vertical pues los

huevos o embriones jóvenes son infectados por microorganismos presentes en la madre. La mayoría de las bacterias parasitarias y simbióticas obligadas intracelulares comparten varias características genómicas, por ejemplo, un alto contenido de A-T, evolución acelerada de la secuencia, y reducción masiva del tamaño del genoma con respecto a sus ancestros de vida libre (Silva y col, 2001). Esta reducción ha llegado a ser tan extrema que algunas cepas de *Buchnera aphidicola* presentan un genoma de 450 Kb (Gil y col, 2002), mientras que el de *Carsonella ruddii* es de 160 KB, siendo este el genoma más pequeño conocido hasta el momento (Tamames y col, 2007).

C. *Bactericera* (Paratrioza) *cockerelli* Sulc

Bactericera (Paratrioza) cockerelli es un insecto que pertenece al orden Hemiptera; sub-orden Sternorrhyncha; superfamilia Psylloidea y la familia, Psyllidae, por lo que se le conoce también con el nombre de psílido, y que junto con las familias Cicadellidae y Fulgoridae, se han descrito como vectores de procariontes (Jensen y col, 1964; Kaloostian y Jones, 1968; Harris, 1980; Kaloostian, 1980; Kawakita y col, 2000; Palermo y col, 2001; Pilkington y col, 2004). En la familia Psyllidae, se han mencionado sólo dos géneros: *Cacopsyla* con varias especies y *Bactericera trigonica* con menor número de especies vectoras(Font y col, 1999).

Los del primer género, se han reportado como transmisores de fitoplasmas asociados a enfermedades en árboles frutales, en donde se describen a

Cacopsylla pyri L. y *Cacopsylla pyricola* (Forster), transmisores del Pear decline phytoplasma (Davis y col, 1992), del grupo 16SrX-C (Lee y col, 1998); *C. melanoneura* (Forster), *C. costales* y *C. picta* transmisores del Apple proliferation phytoplasma (Alma y col, 1997; Frisinghelli y col, 2000; Jarausch y col, 2003) del grupo 16SrX-A (Kummert y Rufflard, 1997) y *C. pruni* como transmisor del European stone fruit yellow phytoplasma (Carraro y col, 1998), grupo 16SrX-B (Lee y col, 1998) y *Bactericera trigonica* como transmisor de un fitoplasma asociado al grupo del Stolbur (16SrXII) en el cultivo de zanahoria (Font y col, 1999; Weintraub y Beanland, 2006); por otro lado, se han descrito dos especies de bacterias no cultivadas restringidas al floema, que causan una enfermedad en cítricos descrita como "Huanglongbing", pertenecientes a la subdivisión α-Proteobacteria y previamente propuestas como "*Candidatus* Liberibacter africanum" y "*Candidatus* Liberibacter asiaticum", las cuales son transmitidas por los psílidos *Trioza erytreae* (del Guercio) y *Diaphorina citri* (Kuwayama, Hocquellect) respectivamente (Jagoueix y col, 1996).

En México se ha relacionado a *Bactericera cockerelli* con dos enfermedades contagiosas: "permanente del tomate" (Garzón *et al*., 2005) y "punta morada de la papa-manchado del tubérculo" (Salas, 2006), y recientemente con la enfermedad de la papa denominada "zebra chip" para la cual la asociación con fitoplasmas no es muy clara (Munyaneza *et al*., 2007).

B. cockerelli.

En México, debido a su parecido con los áfidos, a este insecto se le conoce como “pulgón saltador”. Sus antecedentes datan desde 1947, habiéndose encontrado inicialmente en los estados de Durango, Tamaulipas y Michoacán; posteriormente se le localizó en el Estado de México, Guanajuato y doce estados más. El pulgón saltador tiene un aparato bucal tipo picador-chupador, que está armado con un estilete, formado por dos conductos semejantes a un par de “popotes”, uno para entrada y otro para salida. En la planta, las ninfas (Figura 5) o los adultos (Figura 6) introducen el estilete hasta el floema; por uno de los conductos el insecto succiona la savia y por el otro inyecta su saliva a la planta. El daño causado por este insecto es por un lado de tipo toxinífero o directo y por otro lado indirecto como posible transmisor de un fitoplasma u organismo tipo bacteria (Garzón, 2002; Garzón *et al*., 2005).

Puede colonizar especies de diversas familias de plantas, pero parece ser que tiene un gusto especial por especies de la familia Solanaceae, como son tomatillo (*Physalis ixocarpa*, Brot.), chile (*Capsicum annuum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), siendo estos dos últimos cultivos tan afectados por él, que también se le conoce como psílido de la papa o psílido del tomate (Al-Jabr, 1999).

El psilido del tomate y/o de la papa también se le conoce como salerillo y pulgón saltador. El primer ejemplar fue colectado en 1909 por T.D. Cockerelli

sobre plantas cultivadas de chile bell pepper en Boulder Colorado, y fue posteriormente descrito por Sulc como Trioza cockerelli (Plestch, 1947). Posteriormente Crawford (1911) asignó a la especie el género Paratrioza. Recientemente el género ha sido reasignado como Bactericera y ha sido ubicado como miembro de la familia Triozidae, superfamilia Psilloidea, suborden Homóptera, orden Hemíptera (Bújanos *et al*., 2005). En México se documentó la presencia del "salerillo", *Bactericera* (=*Paratrioza*) *cockerelli* (Sulc), en 1947, hospedando plantas de la familia Solanáceae, en los estados de Durango, México, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (Plestch, 1947). A partir de la década de los setentas, esta especie se considera una plaga primaria de la papa (*Solanum tuberosum* L.), chile (*Capsicum annuum L*) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Garzón *et al.,* 1992; Garzón, 2002).

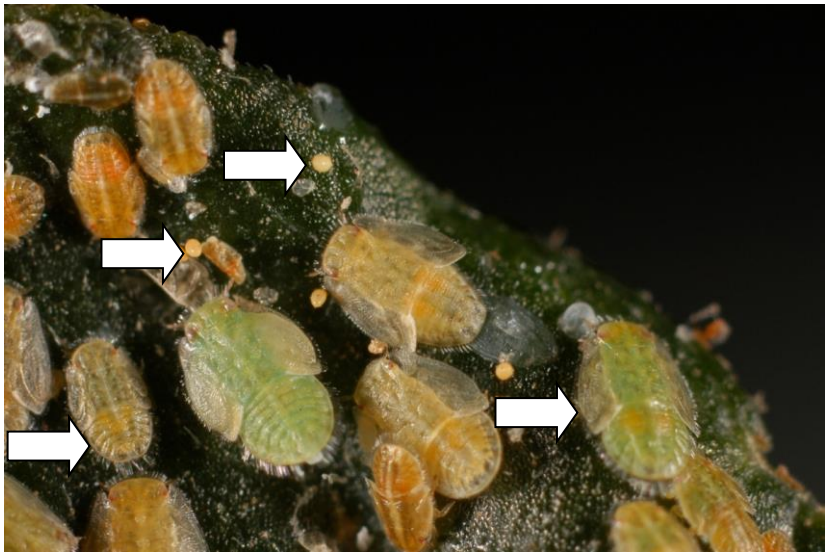

Figura 5. Ninfas y huevecillos de *Bactericera cockerelli* Sulk. Se observan diferentes instares ninfales de color naranja y verde, así como huevesillos de color naranja de *B. cockerelli* Sulk.

Figura 6. Adulto de *Bactericera cockerelli* Sulk.

1. Daños directos ocasionados por la toxina

Los daños toxiníferos provocados por el pulgón saltador fueron dados a conocer por Richards (1928, 1933), que atribuyó la enfermedad del “amarillamiento de la papa” a los procesos de alimentación de las ninfas en la planta, pués por el estilete también inoculan toxinas, lo que se confirmó al retirar las ninfas de las hojas y observar que los síntomas desparecían lentamente; así mismo, la planta tendía a recuperar su color verde normal. Diversos investigadores han aportado mayores elementos sobre el efecto de la toxina de *Bactericera* en las plantas de papa y tomate; sin embargo, en algunos casos éstos son contradictorios y provocan confusión, pués algunos investigadores dicen que además del amarillamiento en papa, “las hojas apicales tienen foliolos ondulados y

morados”, síntomas que están más relacionados con los de la punta morada de la papa que con los causados por la toxina. Otros aspectos contradictorios son los referidos a la disminución y acumulación de almidón en papa reportada por Eyer en 1937 y Leach en 1940, respectivamente (Garzón, 2002).

En el cultivo de tomate, también se dijo que la misma toxina era la causa de una nueva enfermedad sobre los tomates del Sur de Texas, a los que les causaba una disminución en el rendimiento y menor calidad de los frutos, originando grandes pérdidas económicas (Janes, 1936). Daniels (1934) separó los síntomas en: a) primarios, consistentes en un retraso en el crecimiento de la planta con hojas de color púrpura y b) secundarios, con distorsión de follaje, clorosis, estímulos en la floración, menor cantidad de frutos y de tamaño pequeños. Con base en lo anterior, se puede hacer notar que la literatura internacional considera a *Bactericera cockerelli* solamente como un insecto toxinífero.

2. Daños indirectos ocasionados por patógenos

Estudios recientes han mostrado que una nueva especie de la bacteria responsable de la enfermedad Huanglongbing (HBL), *Candidatus Liberibacter psyllaurous*, es transmitida por *B. cockerelli* a algunas solanáceas como la papa y el tomate (Garzón y col. 2009; Hansen y col, 2008).

D. Diagnóstico de enfermedades en plantas.

1. Métodos para la detección e identificación de organismos tipo bacterias no cultivables

El diagnóstico de enfermedades en plantas, históricamente ha tomado como referencia para su desarrollo los postulados de Koch, los cuales describen los criterios para establecer la relación entre un microorganismo y una enfermedad. Éstos fueron formulados por Roberto Koch y Friedrich Loeffler en 1884 y publicados por Koch en 1890 (Evans, 1976), los cuales, aún y cuando se basaron para establecer la etiología entre el ántrax y la tuberculosis, se han generalizado para otras enfermedades, como es el caso de las plantas. Posteriormente estos postulados han sido discutidos por Evans en 1976, en los que se mencionan algunos microorganismos que no pueden ser cultivados, y que por lo tanto deberían de considerarse algunos aspectos inherentes a este tipo de organismos para considerarse como agentes causales. En el caso de enfermedades en plantas, ocasionadas por agentes infecciosos que no se pueden cultivar *in vitro*, entre los que ya se mencionó el caso de rickettsias, fitoplasmas o cierto tipo de bacterias, la implementación de los postulados de Koch es parcial, y se ha considerado la asociación constante, entre el organismo y la enfermedad, así como la evidencia microfotográfica, su presencia en el vector y la planta, y actualmente los estudios del ADN como una parte importante para establecer “la asociación” entre el microorganismo, la

enfermedad en la planta y en su caso el vector. A continuación se enumeran los postulados de Koch (Evans, 1976).

1. Presencia del microorganismo en todas las plantas con la misma enfermedad y su ausencia en las sanas.

2. Aislamiento del microorganismo de la planta enferma y su desarrollo en cultivos *in vitro* para describir sus características.

3. El microorganismo cultivado es inoculado en una planta sana de la misma especie o variedad de la que se aisló y debe causar la misma enfermedad en la planta inoculada.

4. El microorganismo debe de ser reaislado de la planta inoculada en un cultivo *in vitro,* y sus características deben corresponder con las ya descritas.

Uno de los requerimientos más importantes para el manejo adecuado de una enfermedad es la identificación correcta del agente fitopatógeno. Algunas enfermedades pueden diagnosticarse fácilmente mediante una examinación visual, pero otras requieren pruebas de laboratorio para su diagnóstico. Estos procedimientos pueden tomar desde unos cuantos días hasta varias semanas, y en algunos casos poseer escasa sensibilidad.

Afortunadamente, el avance de la biotecnología nos permite emplear nuevos productos y técnicas que se encuentran disponibles para complementar o reemplazar algunos procedimientos clásicos de laboratorio, y de esta manera acelerar la obtención de resultados y permitir una detección temprana. A

continuación se describen elementos fundamentales para la detección de un patógeno determinado en plantas cultivadas.

2. Sintomatología

Debido a que no es posible aislar y hacer cultivos *in vitro* de los organismos no cultivables, lo cual sólo permite que los postulados de Koch se realicen en una forma parcial, una herramienta para su identificación y caracterización puede ser la asociación de las características biológicas de estos patógenos con ciertas enfermedades de las plantas. Los síntomas pueden incluir amarillamiento o clorosis, enrojecimiento precoz de las hojas, esterilidad de las flores, virescencia, filodia, “escoba de bruja”, enanismo generalizado, desarreglos vegetativos, enrollamiento de hojas, necrosis del floema y decaimiento general. Sin embargo, puede resultar un método no muy confiable debido a que algunos de estos síntomas se pueden confundir con otras enfermedades que producen efectos similares. También puede intuirse la existencia de los patógenos en cultivos asintomáticos debido a la presencia de insectos vectores.

3. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos

La imposibilidad de estos organismos para crecer en medios artificiales, hace que su caracterización resulte difícil; sin embargo, con la introducción de los métodos moleculares en la micoplasmología de plantas ya es posible determinar tanto la filogenética, como la relación taxonómica de éstos. Técnicas

moleculares, tales como el uso de hibridaciones tipo dot blot, oligonucleótidos iniciadores universales para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP"s, por su siglas en inglés), han permitido grandes avances en la detección e identificación de fitoplasmas, además de su clasificación filogenética basándose en el análisis de la región 16S RNA ribosomal (rRNA) con secuencias altamente conservadas (Albanese y col, 1995; Lee y col., 1998). Otros genes de fitoplasmas o regiones que se han empleado para su clasificación son los genes de la proteína ribosomal *rp/22* y *rps3*, que aunque son más variables que la región 16S rRNA, los resultados en la clasificación son similares (Schneider y col, 1997).

a. Hibridación molecular

Esta prueba se basa en la capacidad de los ácidos nucleícos para formar híbridos cuando reaccionan con bandas homólogas. En un proceso de incubación con extractos de plantas, estas pruebas detectan la presencia del ácido nucleíco del patógeno, por la formación de híbridos con éstos.

El ácido nucleíco de la planta que contiene el ADN del patógeno se fija a un soporte sólido (filtro o membrana), sobre el cual se agrega la sonda en solución, que reconoce en forma parcial o total la parte homóloga del genoma del patógeno y procede a hibridarse sobre este genoma ya fijado en la membrana. Generalmente se utilizan sondas marcada con P32; sin embargo, se pueden

utilizar métodos no radiactivos, tales como digoxigenina (Genius Kit, Boehringer Mannhim) y biotina (Photo Gene nucleic acid sysems Gibco BRL). La luz emitida por la fuente de energía y la presencia de fluorocromos excitados es detectada por una película fotográfica para rayos “X”. Pueden realizarse varias exposiciones en diferentes áreas de la película de diagnóstico revelando distintas intensidades de manchas oscuras (Figura 7), lo que corrobora la presencia del patógeno en la muestra analizada (Schneider *et al*., 1997).

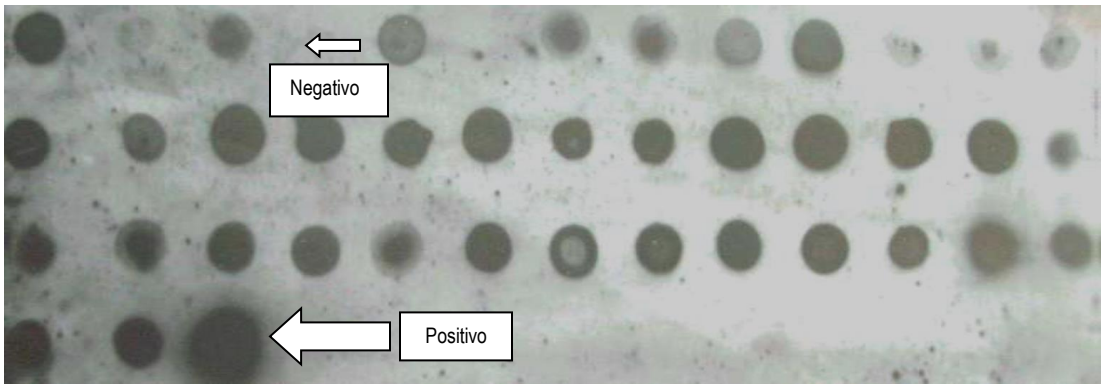

Figura 7. Hibridación tipo dot blot. Se observan sobre la lámina las manchas circulares oscuras, que indican la detección del patógeno, y donde no se observan indican la detección negativa.

El uso de laboratorios especializados con personal capacitado en algunas técnicas de biología molecular, la disponibilidad de sondas, así como tecnología para su multiplicación, extracción, marcado y el costo de los reactivos relativamente altos, son algunas de las desventajas de esta técnica (Schneider *et al*., 1997).

b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN. Se puede utilizar para detectar diminutas cantidades de un fitopatógeno que esté presente en el suelo, tejido, savia, etc. Esta técnica permite multiplicar geométricamente regiones específicas del ADN blanco por medio de ciclos sucesivos de síntesis que ocurren *in vitro*. Los componentes de reacción de la PCR son ADN blanco, desoxinucleótidos, una enzima ADN polimerasa que resiste altas temperaturas y oligonucleótidos iniciadores. Con estos componentes, el ADN es desnaturalizado por calentamiento a más de 90 °C, luego por enfriamiento a menos de 60 °C, se permite la hibridación de los iniciadores y la cadena es extendida por la polimerasa a 72 °C en una solución tampón. En la Figura 8 se indica este proceso, el cual es repetido de 20 a 40 ciclos hasta producir el segmento de ADN deseado (Rosales, 2002). Teóricamente, una copia única de ADN puede ser amplificada millones de veces. Los productos de la PCR son analizados usualmente por medio de electroforesis para así determinar si el ADN blanco fue amplificado. Este nuevo ADN se puede clonar y secuenciar para comparar su similitud con el segmento correspondiente del ADN en prueba, ya que los iniciadores son específicos únicamente para determinadas secuencias del ADN que se analiza (Rosales, 2002).

La PCR ha sido aplicada inicialmente a la detección e identificación de fitoplasmas, virus y viroides. Sin embargo, hongos, bacterias y nemátodos

pueden también ser detectados. En general, la aplicación de esta técnica al diagnóstico de enfermedades en plantas se ha centrado en organismos que no son fácilmente detectados por medio de otros métodos, o en aquellos casos en que la obtención de resultados es lenta (Rosales, 2002).

Se han recibido reportes verbales de diferentes empresas de semillas de que los síntomas del permanente del tomate están presentes en E.U.A. (Texas, Nuevo México, Colorado y California), Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Panamá (Rosales, 2002).

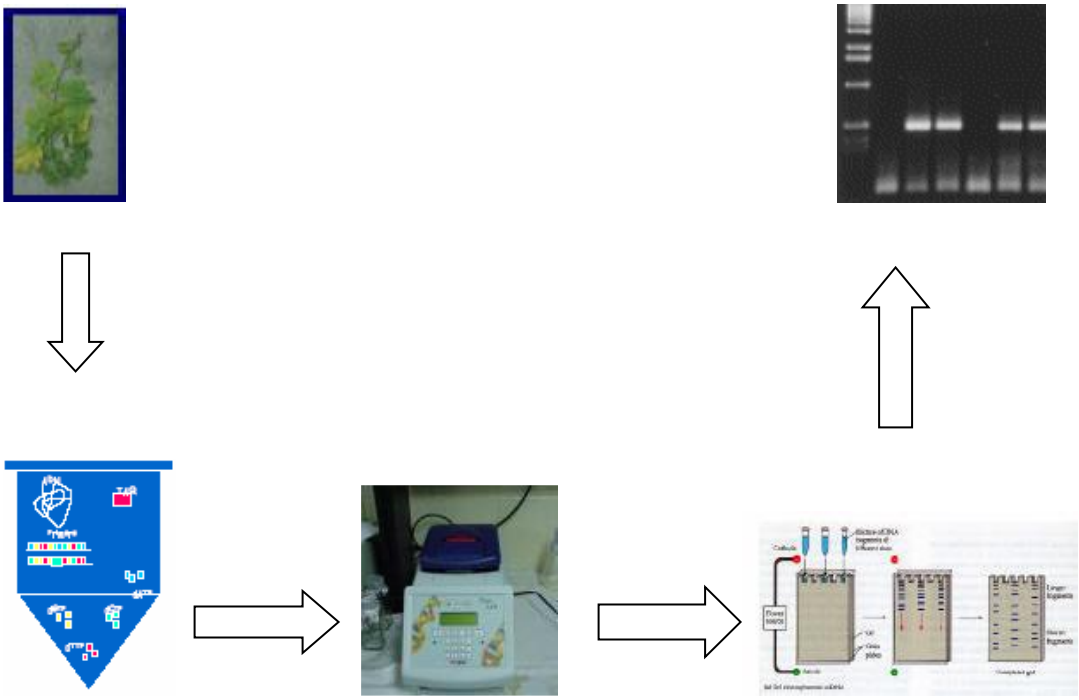

Figura 8. Empleo de la PCR en el diagnóstico de fitopatógenos.
A: muestra problema de donde se extrae ADN, B: microtubo con los componentes de la reacción de la PCR, C: termociclador donde se efectúan los ciclos térmicos de desnaturalización, alineamiento de iniciadores y extensión del ADN, D: electroforesis de ADN, E: visualización de un producto específico amplificado por PCR en un gel de agarosa.

c. Métodos para determinar relaciones filogenéticas

La información filogenética permite identificar relaciones entre organismos debidas a descendencias a partir de un ancestro común. La representación de las relaciones filogenéticas más común es un gráfico de conexiones en forma de árbol, donde se muestran las relaciones entre las especies actuales y sus ancestros. La reconstrucción de árboles filogenéticos requiere del análisis de datos especialmente adecuados, teniendo como herramientas caracteres

macroscópicos, microscópicos, el estudio del desarrollo de los organismos (Embriología), de fósiles (Paleontología), de comportamiento (Etiología), de composición (Bioquímica) y secuencias moleculares (Biología Molecular). Son tres los principales métodos taxonómicos que se manejan para hacer una reconstrucción filogenética: fenético, cladista y sistemática evolutiva (Márquez, 1996; López y Pérez, 1999).

En 1960, Sokal propuso la fenética como método de clasificación que se basa en el criterio de la similitud o diferencia morfológica, anatómica, fisiológica o bioquímica, en donde los caracteres poseen igual valor. Las características de las especies se dividen en caracteres unitarios, se les asignan números y se codifican como más, menos o cero. Los datos se procesan matemáticamente usando un algoritmo que genera una matriz de acuerdo al número de similitudes (o diferencias) que compartan. Con este sistema se da igual peso a un carácter, sin tomar en cuenta cualquier evaluación subjetiva, y no se hace diferencias entre homología y analogía.

El cladismo es un método útil para reconstruir la genealogía de los organismos de modo objetivo y verificable, fue propuesto por Hennig en 1960 y se basa en tres principios: a) los taxones se encuentran unidos en grupos naturales basándose en los rasgos derivados compartidos (sinapomorfias); b) todos los grupos válidos descienden de un ancestro común único (son monofiléticos); y c) el patrón más parsimonioso (el que requiere menor número de pasos para resolver las relaciones entre taxones) es el que tiene mayor probabilidad de ser

correcto. Es decir, se buscan los árboles más sencillos, con menor número de cambios.

Un árbol filogenético elaborado a partir de este método se conoce como cladograma y se basa en las sinapomorfias. El punto de partida (antepasado común) de una rama es un nodo, y las líneas entres nodos son los internodos. En este cladograma se puede detectar lo que se conoce como clado que es el antepasado común de un grupo con todos sus descendientes (López y Pérez, 1999).

La clasificación filogenética tradicional organiza las especies por su grado de parentesco dentro del árbol filogenético, agrupa las especies que comparten caracteres derivados de un antecesor común pero que no necesariamente incluye a todos los descendientes. Esta es la principal diferencia entre la filogenia tradicional y la cladística. Así resulta que los árboles filogenéticos tradicionales incluyen una serie de ramas que se suceden en el tiempo y que tienen la misma categoría taxonómica (López y Pérez, 1999).

El método más empleado es el cladista pues distingue claramente entre caracteres análogos (simplemente parecidos) que sirven para establecer filogenias y caracteres homólogos (semejaza debida a un mismo origen embrionario a partir de un mismo ancestro), los cuales evidencian una historia evolutiva común (López y Pérez, 1999).

La comparación de secuencias de algunas macromoléculas es la forma más precisa y confiable para inferir relaciones filogenéticas. El empleo de

secuencias lo suficientemente largas evita relacionar equivocadamente a los organismos debido a la convergencia de sus fenotipos. No existe una molécula mejor para los estudios comparativos de secuencias, solo se requiere que la secuencia de la molécula no tenga transferencias genéticas entre especies, que su función sea lo más constante posible y que contenga un número suficiente de residuos que cambien a un ritmo correspondiente con la distancia evolutiva considerada, tal es el caso de las secuencias de las moléculas de rRNA cuyos genes ya se han identificado (Pace *et al*., 1986).

Mediante la comparación de las secuencias 16S rRNA se ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, y la elucidación de sus relaciones naturales. Estas secuencias pueden ser clonadas y detectadas por hibridación con genes que codifican para sondas de rRNA (rDNA) de un organismo diferente y empleando la PCR se puede amplificar específicamente la región a secuenciar. Estas secuencias amplificadas pueden subclonarse para secuenciarse por métodos convencionales, o secuenciarse directamente del amplicón (Pace *et al*., 1986).

Actualmente existen bases de datos como el Proyecto de Base de Datos Ribosomales, el Banco de Genes y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular, que contienen más de 2000 secuencias de rRNA, pertenecientes a una gran cantidad de microorganismos. En éllas se puede realizar una comparación estadística de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las que ya están publicadas, y así elaborar dendogramas, en los que se indique

la posición del nuevo microorganismo recién identificado, para éllo se pueden emplear una gran variedad de métodos y programas computacionales, como son DNASTAR, SeqED y PileUp, para hacer alineamientos; Análisis Filogenético Usando Parsimonia (PAUP) y CLUSTAL X para análisis cladístico; Método de Agrupamiento de Pares con la Media Aritmética no ponderada (UPGMA); y el Método del Vecino más Cercano (Neighbor-Joining) para hacer los árboles filogenéticos; y Bootstrap para valoración de las agrupaciones mediante remuestreos (500-1000) al azar de sitios para un alineamiento; sólo por mencionar algunos (Schneider *et al*., 1997; Montano *et al*, 2000; Davis y Dally, 2001; Harrison *et al*., 2001; Zhang *et al*., 2004).

V JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el control de las enfermedades de tipo viral y de algunos tipos de procariontes (fitoplasmas, spiroplasmas, bacterias no cultivables, etc.) no ha sido posible lograrlo directamente. Por lo que su forma de control está limitada a métodos indirectos como la interferencia en la multiplicación de estos organismos a través de la formación de genotipos resistentes. El PT es una de las enfermedades más importantes del cultivo del tomate en México, ya que cada año llega a reducir la producción hasta en un 45%. Durante 2009 se detectó a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, en los Valles de La Cruz de Elota y Culiacán, asociado a los síntomas del (PT). Esta es una enfermedad que se describió por primera vez en la región de El Bajío, México, y en esa temporada esta enfermedad fue considerada como la más dañina en las siembras de tomate del ciclo primavera-verano; sin embargo, en 2009 fue reportada en siembras de invierno, como ya se mencionó antes para Sinaloa. Existe muy poca información sobre resistencia genética a esta enfermedad, ya que todas las variedades o híbridos que se han sembrado en regiones con problemas, como Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Baja California, Michoacán, Coahuila y Sinaloa, han sido susceptibles. Por tanto, es sumamente importante detectar fuentes de resistencia genética de tomate para empezar un futuro programa de mejoramiento genético de híbridos comerciales, para colaborar con los agricultores en el combate a este patógeno.

VI HIPÓTESIS

Existe germoplasma de tomate resistente a *Candidatus*. Liberibacter solanacearum, causante de la enfermedad permanente del tomate.

VII OBJETIVOS

A. Objetivo general

Detectar genotipos de *tomate* (*Solanum lycopersicum* L.) resistentes a *Candidatus* Liberibacter solanacearum.

B. Objetivos específicos

1. Establecer fuente de inóculo de *Candidatus* Liberibacter solanacearum bajo condiciones controladas.

2. Determinar la presencia del patógeno por microscopía electrónica y detección molecular.

3. Establecer colonia de *Bactericera cockerelli* Sulk, bajo condiciones controladas.

4. Transmitir *C.* Liberibacter solanacearum a genotipos de tomate, por medio del vector *B. cockerelli*.

5. Analizar molecularmente la presencia del patógeno *Candidatus*. Liberibacter solanacearum, en la fuente de inóculo, insectos y genotipos evaludos.

6. Evaluar el daño de *C*. Liberibacter solanacearum sobre los genotipos de tomate.

VIII MATERIALES Y MÉTODOS

A. Localización del estudio.

El experimento se estableció en la estación experimental de Vilmorin Inc, la cual se encuentra ubicada en el km 8 de la carretera Culiacán-Culiacancito en el poblado de La Higuerita, Culiacán, Sinaloa. N. 24º 47' 55'' w. 107º 29' 37'' altura sobre el nivel del mar 30 m (Figura 9).

Figura 9. Fotografía satelital de la estación experimental Vilmorin INC

B. Clima.

De acuerdo a la clasificación de Koppen el clima es BS (h) w (e), descrito como clima subtropical con lluvias invernales, precipitación media anual de 800 mm.

La temperatura media anual es de 28 °C, presentándose la máxima de 45 °C en el verano, y la mínima de 4 °C en el invierno. La humedad relativa atmosférica

media anual es de 68%, presentándose la máxima de 81% en el mes de septiembre, y la mínima de 51% en el mes de abril.

C. Suelo

El suelo, según la clasificación de la FAO es del tipo Aluvión. Se caracteriza por tener una estructura areno limosa, y está constituido principalmente por arena de coloración café claro a gris.

D. Área experimental.

El lugar donde se llevó a cabo el experimento fue un invernadero pasivo, (Figura 10) con dimensiones de 24 m de largo por 20 m de ancho, 5 m de alto, dividido en 4 secciones; en las partes laterales se aplicó cal, y en la parte superior se colocó una malla sombra para regular el paso de los rayos del sol y reducir el riesgo por altas temperaturas.

Figura 10. Área experimental donde se llevó a cabo el estudio.

E. Fecha de siembra en vivero y obtención de plántulas

Se efectuó el día 1 de marzo del 2010; se utilizaron charolas de poliestireno con 200 cavidades, las cuales se desinfectaron con una solución de cloro en relación 1:1, después fueron llenadas con sustrato kekyla; posteriormente se procedió a colocar una semilla por cavidad, por último se optó por cubrir con vermiculita, tapar la semilla depositada por cavidad y se regó.

Cuadro 3. Productos utilizados en invernadero después de la germinación.

ENRAIZADORES		
NOMBRE COMERCIAL	**DOSIS**	**APLICACIÓN**
Rooting	1.0 mL/L de agua	Se aplicó cada 15 días
Fósfacel	1.0 g/L de agua ..	Se aplicó cada 5 días

FUNGICIDAS		
NOMBRE COMERCIAL	**DOSIS**	**ENFERMEDAD**
Ridomil gold 4E(Metalaxil)	0.1 mL/L de agua	Damping Off

INSECTICIDAS		
NOMBRE COMERCIAL	**DOSIS**	**PLAGA**
Confidor 350 SC (Imidacloprid)	1.0 mL/L de agua	Chupadores
Tracer (Spinosad)	0.25 mL/L de agua	Trips y lepidópteros
Actara (Thiametoxan)	0.5 g/L de agua	Chupadores
Bacillus thuringiensis	0.5 mL/L de agua	Lepidopteros

F Formación de las camas de siembra

Consistió en formar surcos en forma de camas de aproximadamente 40 cm de altura y 180 cm de distancia entre ellas, por seis metros de largo.

G Fecha de trasplante

Las plantas en estado de tres hojas verdaderas, obtenidas del vivero, fueron llevadas al invernadero y trasplantadas el 1 de abril del 2010.

H Topología

La plantación fue a doble hilera a una distancia de 50 cm y una separación entre surcos de 1.8 m, con una densidad de cuatro plantas por m^2 y una población total de 480 plantas por el experimento.

Cuadro 4. Calendario de riegos en invernadero, durante el análisis de la resistencia a *Candidatus* Liberibacter solanacerum, en genotipos de tomate (*Solanum lycopersicon* L.*).* Estación Experimental Vilmorin, Culiacán, Sinaloa, México.

Meses	Total de riegos (goteo)	Minutos por riego
Abril	60	30
Mayo	60	30
Junio	60	30
Julio	60	30

Nota: Los riesgos se realizaron diariamente de 8:00 a 8:30 y de 11:00 a 11:30 am.

I. Conducción de la planta

Se llevó a cabo a partir de la primera bifurcación de la planta, y consistió en tirar hilos a lo largo de los surcos por ambos lados para la conducción vertical de ésta durante el desarrollo vegetativo (fajado convencional).

J. Aporque (como labor de cultivo)

Esta actividad se realizó desde el trasplante hasta la etapa de fructificación, la cual se llevó a cabo mecánicamente con la ayuda de un azadón manual, para controlar la maleza que se presentó durante las diferentes etapas de crecimiento del cultivo y al mismo tiempo proporcionar un mejor cubrimiento a la raíz de la planta.

K. Fertilización

Se hizo mediante el sistema de riego por goteo, desde el trasplante hasta la última evaluación. Se suministraron los siguientes fertilizantes.

Cuadro 5. Fertilizantes usados en fertirriego.

NOMBRE COMERCIAL	Dosis/ha
Nitrato de amonio	50 kg
Nitrato de potasio	50 kg
Nitrato de calcio	50 kg
Sulfato de magnesio	50 kg
Ácido fosfórico	30 L
Cloruro de potasio	50 kg

L. Establecimiento de la colonia de *B. cockerelli.*

1. Recolección de insectos en campo.

Se colectaron insectos adultos con un succionador entomológico, y ninfas de *B. cockerelli* con un pincel directamente de plantas de tomate y chile cultivadas bajo condiciones de campo abierto (Figura 11). Los sitios de Sinaloa en donde se colectó fueron: La Cruz de Elota, Valle de Culiacán, Concordia y Escuinapa. Los insectos colectados fueron colocados en plantas de tomate contenidas dentro de jaulas entomológicas mismas que fueron trasladadas por tierra hasta el invernadero en la Estación Experimental Vilmorín, para su posterior empleo en el ensayo de resistencia.

Figura 11. Recolección de insectos adultos de *Bactericera cockerelli* Sulk en campo abierto.

2 Formación de la colonia en invernadero.

Con los insectos se estableció una colonia que fue mantenida en plantas hospederas de tomate (*S. lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annum* L.).

Para formar la colonia del psíllido se utilizaron jaulas de madera con ventanas cubiertas con tela de organza que permitió el paso de luz y aire. Dentro de éllas de colocaron individualmente plantas de tomate y chile en vasos de poliuretano con capacidad de 1.0 L.

3 Fuente de inoculo en invernadero.

Después de haber capturado a los insectos en jaulas, se liberaron dentro del invernadero con plantas de tomate grape y bell pepper tipo lamuyo, para formar la colonia y crear la fuente de inóculo.

La fuente de inóculo fueron 100 plantas de tomate, en una jaula cubierta con malla antivirus calibre 20X40 0 40X40, para evitar otros insectos. Para éllo, insectos procedentes de plantas con los síntomas del PT fueron liberados en plantas sanas de tomate hasta la manifestación de síntomas, que se calculó en 20 días. En estas plantas enfermas se mantuvieron en alimentación los psilidos para que adquirieran el patógeno, y de aquí emplearse para inocular las plantas sanas.

M. Diseño experimental.

Se utilizó el completamente al azar con 6 repeticiones (Steel y Torrie,1988).

N. Tratamientos evaluados.

- 1-ToA-12 (Vilmorin).
- 2- ToA-14 (Vilmorin).
- 3- ToA-20 (Vilmorin).
- 4- ToA-43 (Vilmorin).
- 5- Pony Express (Harris Moran).
- 6- Shanty (Hazera).
- 7- Reserva (Vilmorin).
- 8- Charanda (Vilmorin).

Ñ. Parámetros para el análisis de la resistencia. Los parámetros fueron establecidos en base al síndrome descrito para la enfermedad del “permanente del tomate” (Garzón, 1984), aplicando un valor al nivel de expresión de cada uno de éllos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Descripción de parámetros que se evaluaron para determinar resistencia genética en genotipos de tomate contra *Candidatus* Liberibacter solanacearum.

Parámetro	Significado	Valor
Enpurpuramiento	Hojas con coloraciones purpuras(acumulación de antocianina)	1-Sin coloración púrpura 2- Baja coloración 3- Media coloración 4- Alta coloración 5- Extremada coloración
Amarillamiento	Hojas con coloraciones amarillas (acumulación de xantofila)	1-Sin coloración púrpura 2- Baja coloración 3- Media coloración 4- Alta coloración 5- Extremada coloración
Hoja crujiente	Hojas que se tornan crujientes (al presionarlas)	1- Hoja no crujiente 2- Hoja poco crujiente 3- Hoja medio crujiente 4-Altamente crujiente 5-Extremadamente crujiente
Enrollamiento de hoja	Hojas que se contraen en forma de “taco”	1- Hoja no enrollada 2- Hoja poco enrollada 3- Hoja medio enrollada 4- Altamente enrollada 5- Extremadamente enrollada
Aborto de flor	Absición debido a la enfermedad	Porcentaje de aborto
Achaparramiento	Reducción de tamaño de entrenudos	Porcentaje de plantas que mostraban este síntoma, ya que los genotipos no eran del mismo hábito de crecimiento
Plantas enfermas	Síntomas evidentes de la enfermedad	Porcentaje de plantas que mostraban padecimiento de la enfermedad

O. Detección del patógeno.

1. Extracción de DNA.

La extracción del ADN se realizó por el método Dellaporta (Dellaporta, 1983). Para el caso del presente estudio, a partir de tejido infectivo de plantas de tomate, se realizó extracción total de DNA, empleando el kit comercial Master

Pure Purification Kit. Se maceraron 3.0 g de tejido de planta de tomate, se agregaron 300 µL de solución de lisis y 1.0 µL de Proteinasa K, y se colocó a baño maría a 65 ºC durante 15 minutos, dando agitación con vortex cada 5 min; posteriormente se agregaron 200 µL de proteína de precipitación (MPC), se agitó en vortex y se centrifugó 10,000 rpm por 10 min a 4 ºC, se transfirió en sobrenadante que contiene ácidos nucléicos a tubo nuevo, y se agregaron 500 µL de isipropanol frio y se agito manualmente posteriormente se centrifugo 10,000 rpm por 10 min a 4ºC, enseguida se retiró el isipropanol y se agregó un volumen de etanol, y se centrifugo 10,000 rpm por 5 min a 4ºC, se retiró el etanol y se dejó secar; posteriormente se agregó 50 µL de agua estéril libre de nucleasas.

2. Iniciadores para PCR

El diseño de los iniciadores se realizó en base a las secuencias registradas en GenBank (Munyaneza *et al*, 2009) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Iniciadores que se utilizaron en la amplificación de fragmentos por PCR.

Iniciadores	Secuencia
Oa2/O12cF (5')	GCC TCGCGACTTCGCAACCCAT
Oa2/O12Cd(3')	GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA

3. Amplificación del ADN por PCR.

Para la amplificación de fragmentos de DNA, se empleó la mezcla de reacción que se describe en el (Cuadro 8). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador TECHNE (Modelo:Touchgene gradient), programado para 40 ciclos con temperatura de desnaturalización 15 s a 94 ºC, alineamiento 30 s a 55 ºC, polimerización 1.0 m a 72 ºC, con un precalentamiento a 94 ºC por 2 min y una extensión final de 10 min a 72 ºC (Munyaneza, 2009).

Cuadro 8. Condiciones de reacción para la amplificación de fragmentos por PCR.

Reactivos	Concentración	Volumen (µL)
Agua	Libre de nucleasas	11.75
Buffer PCR	10X	2.0
DNTPs	10mM	0.4
Mg Cl_2	50mM	0.6
Primer 1	20 pmoles	2.0
Primer 2	20 pmoles	2.0
Enzima DNA Taq Pol	5 u/ µL	0.25
ADN	2-100ng	1.0
		20 µL

4. Análisis del ADN en agarosa 1.0 %.

El DNA amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Para éllo, se cargaron 1.0 μL de DNA producto de PCR más 1.0 μL Buffer de carga (azul de bromofenol 0.025%, xilenocianol 0.025% y glicerol al 30%), y como buffer de corrida se usó TAE 1X. El gel se corrió a 80 V/45 minutos.

Finalmente el DNA teñido con Bromuro de Etidio (0.5 μg/mL) fue observado y analizado en un transiluminador de luz UV Spectroline (Modelo: Slimline Series). La imagen del DNA en el gel fue capturada en un equipo automático para capturas de imagen a partir de luz UV.

5. Microscopía electrónica de transmisión

a. Fijación

Las muestras fueron colectadas de plantas de tomate sano y enfermo. Las cuales fueron seccionadas en tamaños de 0.25 cm, empleando un bisturí, y fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión, siguiendo el orden que se muestra a continuación.

Las muestras fueron incubadas en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.2 durante 2 hrs, a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el fijador y las muestras fueron lavadas con cacodilato de sodio 0.1 M por tres veces.

b. Post-fijación

Las muestras fueron incubadas durante una hora con OsO_4 al 1% en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4, y nuevamente fueron lavadas con cacodilato de sodio para retirar todo el exceso del OsO_4.

c. Deshidratación

Se procedió con la deshidratación, que consistió en someter la muestra en una serie de alcoholes de diferentes concentraciones (50, 70, 90 y 100) durante 10 minutos cada uno; para concluir mediante el empleo de óxido de propileno durante 20 minutos.

d. Pre inclusión

Se retiró el óxido de propileno de las muestras, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en una resina epóxica y óxido de propileno en proporciones de 1:2, 1:1 y 2:1, consecutivamente. Después se agregó la resina fresca y se incubó durante 2 h en el Rotator (Pelco R2). Después de las 2 h se retiró la resina y nuevamente se incubó toda la noche en el Rotator a temperatura ambiente.

e. Inclusión

Se retiró completamente la resina de preinclusión y se agregó la resina pura en los moldes, y se colocó la muestra en la posición deseada. Una vez ubicada, se colocó el molde en la estufa a 60 ºC durante 48 h (Brauer, 2003).

6. Ultramicrotomía

Los bloques incluidos en la resina epóxica fueron preparados para realizar los cortes semifinos de 0.7 µm de espesor.

a. Cortes semifinos

Se utilizó un ultramicrótomo Ultracut E (Reichert-Jung) y cuchillas de vidrio. Los cortes se recuperaron empleando una asa de alambre, se colocaron sobre un portaobjetos libre de partículas de polvo y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5%, y se observaron mediante un microscopio óptico Primo Star (Zeiss), para delimitar el área de interés.

b. Cortes finos

Los cortes finos de 70 nm de espesor se obtuvieron empleando el mismo ultramicrótomo con una cuchilla de diamante. Se colectaron con una asa de alambre y se colocaron sobre una rejilla de cobre de 200 mesh. Posteriormente, los cortes se contrastaron con acetato de uranilo en agua al 2.5% durante 20 min y con citrato de plomo durante 1 min., se lavaron con agua destilada filtrada y se dejaron secar a temperatura ambiente. El examen ultraestructural fue realizado utilizando un microscopio de transmisión JEM-1400.

P. Análisis estadístico

Los conteos de las observaciones realizadas en las plantas de tomate se transformaron en rangos y se sometieron a análisis de varianza con la prueba

de Kruskal y Wallis (Daniel 2002); la comparación de los valores medios de los rangos se hizo con la prueba de Dunn (Dunn, 1964), y para éllo, se utilizó el procedimiento RANK y GLM, del paquete computacional SAS (SAS, 2002). El nivel de alfa para aceptar diferencia estadística fue máximo 0.05.

IX RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Área experimental

La colonia se estableció satisfactoriamente, ya que se detectaron los estadíos correspondientes al ciclo biológico del insecto (huevecillos, ninfas, exuvias y adultos en hojas) en la fuente de inóculo (Cuadro 9). En la misma área confinada se observó que la población del insecto migró uniformemente hacia los tratamientos (Figura 12), obteniéndose una aceptable distribución del patógeno que se reflejó en la incidencia de la enfermedad en el100% de los genotipos.

Cuadro 9. Poblaciones promedio de individuos en diferentes estadíos biológicos de *Bactericera cockerelli* Sulk en la fuente de inóculo.

Chile (Lamuyo)		Tomate grape	
Huevecillos:	140/hoja	Huevecillos:	195/hoja
Ninfas:	50/hoja	Ninfas:	238/hoja
Adultos jóvenes:	24/hoja	Adultos jóvenes:	26/hoja
Adultos maduros:	31/hoja	Adultos maduros:	40/hoja
Exuvias:	77/hoja	Exuvias:	31/hoja

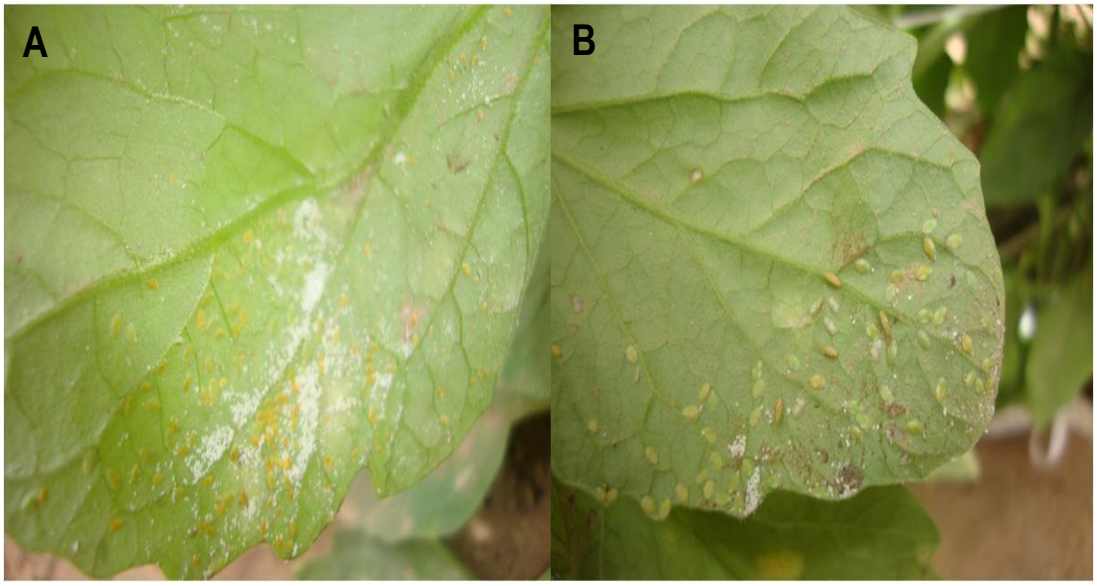

Figura 12. A) Excremento (Salerillo) clásico de *Bactericera cockerelli* Sulk. B) Diferentes estadíos ninfales y adultos jóvenes de *B. cockerelli* Sulk.

B. Fecha de siembra y obtención de plántulas

Se obtuvieron las plántulas a los 33 días de sembrado la semilla en una etapa de 4-5 hojas verdaderas.

C. Conducción de la planta

Después de plantada, cuando ésta llegó a la primera bifurcación, se empezó a guiarlas mediante hilos que iban de un extremo del surco al otro por ambos lados (fajado convencional), con el cual se logró una conducción que nos permitió trabajar en las evaluaciones de resistencia genética. Se considera apropiado para estudios posteriores sobre *Candidatus* Liberibacter solanacearum.

D. Recolección de insectos en campo

La metodología de obtención de insectos procedentes de plantas enfermas de campos comerciales funcionó, ya que se logró capturarlos sin lastimarlos y transportarlos sin problemas hasta el lugar del estudio. Los insectos se encontraron virulíferos, ya que se logró detectar al patógeno por PCR

E. Formación de la colonia en invernadero

Los insectos se establecieron en plantas de tomate tipo grape y de chile tipo lamuyo, bajo invernadero, encontrándose oviposturas desde el primer día de haberse liberado, con las cuales se logró una reproducción masiva de *Bactericera cockerelli* Sulk.

F. Fuente de inóculo

La metodología de obtención de insectos procedentes de plantas enfermas de campos comerciales funcionó, ya que se logró trasmitir al patógeno a las plantas que se tenían para fuente de inóculo, comprobando la presencia del patógeno en las plantas por el método de PCR. Los primeros síntomas se observaron alrededor de los 20 días después de haber liberado los insectos.

G. Detección del patógeno por PCR

La amplificación del ADN de *Candidatus* Liberibacter solanacearum en insectos (Figura 12), plantas de tomate como fuente de inóculo (Figura 13) y en los

tratamientos (Figura 14), fue positiva, lo que implica que todo el procedimiento fue adecuado, y por lo mismo se recomienda para trabajos futuros.

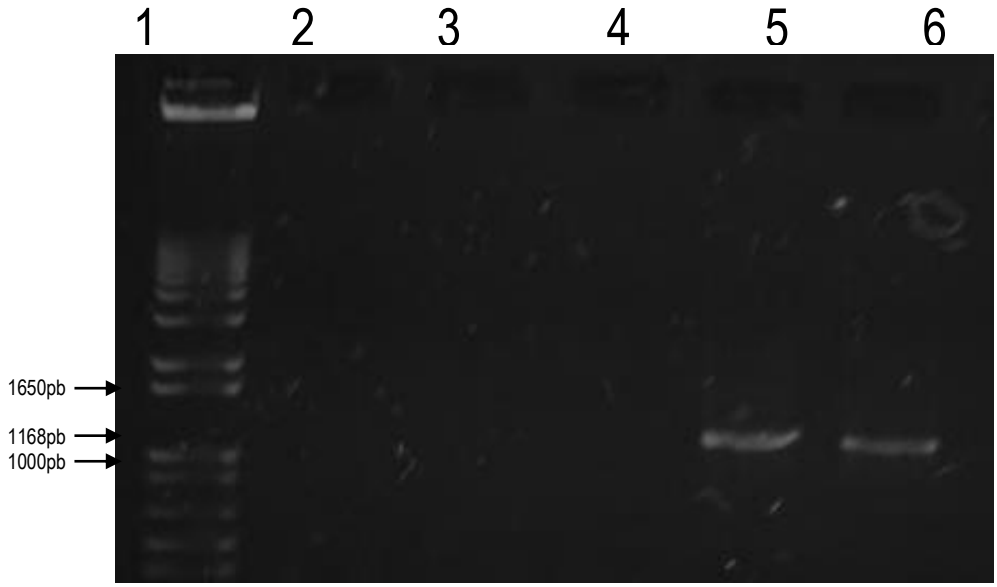

Figura 13. Amplificación por PCR del ADN de insectos sanos y virulíferos.
Línea 1. MPM; 2-4 insectos negativos; 5 y 6 insectos positivos.

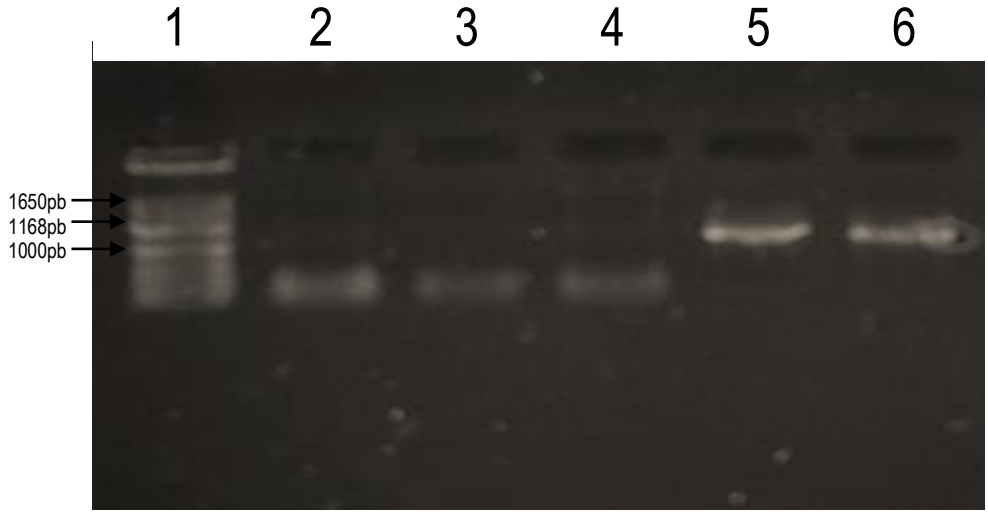

Figura 14. Amplificación por PCR del ADN de tomate como fuente de inóculo de *Candidatus* Liberibacter solanacearum.
Línea 1 MPM; 2-4 controles negativos; 5 y 6 plantas positivas de tomate.

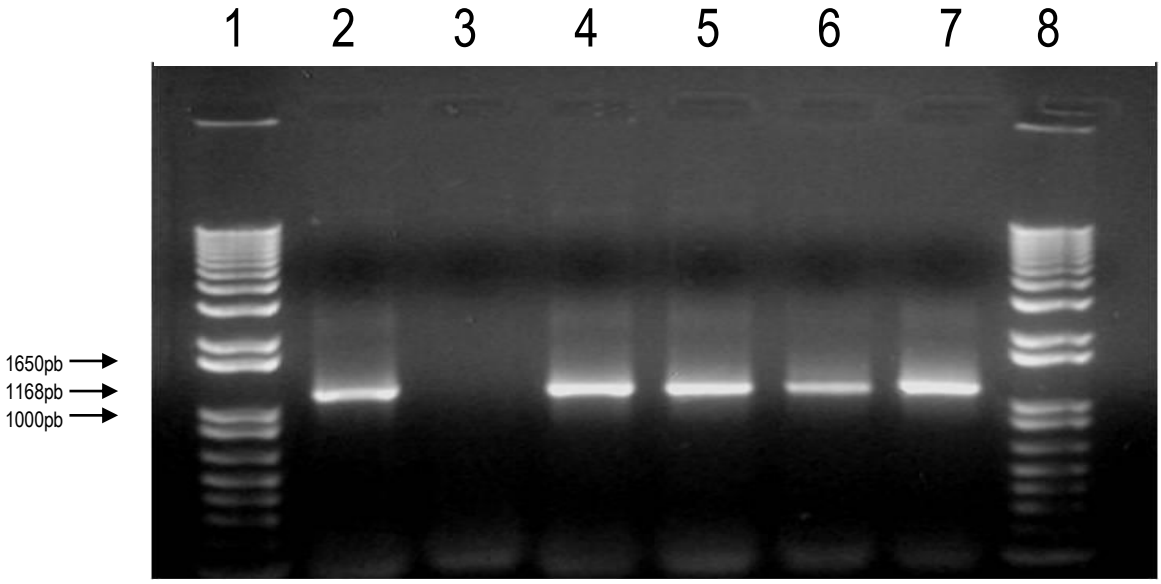

Figura 15. Amplificación por PCR del ADN de tomate de los tratamientos Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda con *C*. Liberibacter solanacearum.
Línea 1= MPM; 2= Control positivo; 3= Control negativo; 4= Pony Express; 5= Shanty; 6= Reserva; 7= Charanda; 8= MPM.

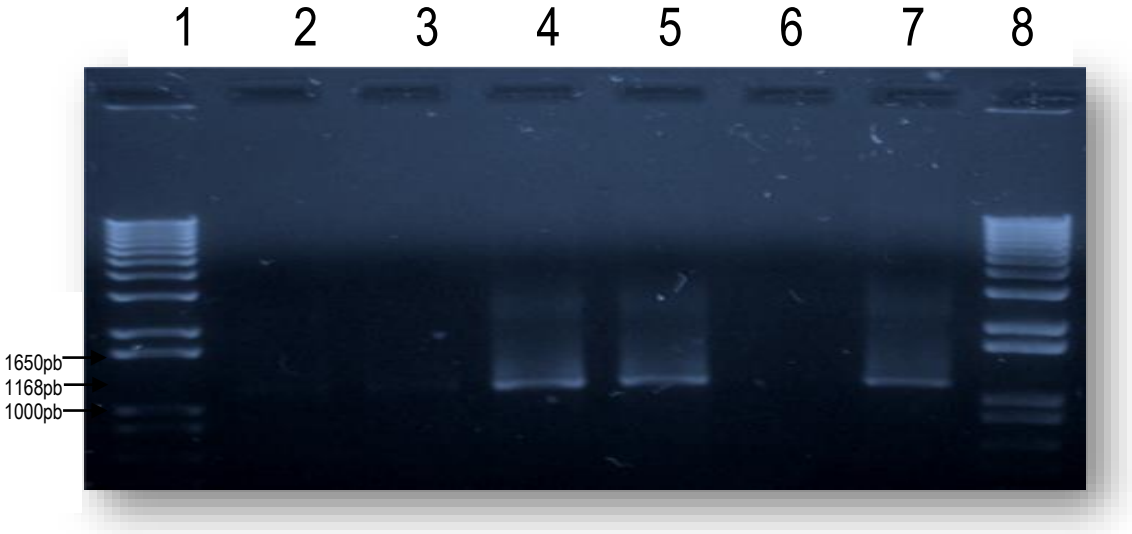

Figura 16. Amplificación por PCR del ADN de tomate de los tratamientos ToA-12, ToA-14, ToA-20 y ToA-43 con *C*. Liberibacter solanacearum.
Línea 1= MPM; 2= ToA-12; 3= ToA-14; 4= ToA-20; 5= ToA-43; 6= Control negativo; 7= Control positivo; 8= MPM.

H. Microscopía electrónica de transmisión

Se detectó a *Candidatus* Liberibacter solanacearum en una muestra de tejido de plantas de tomate enfermas (Figura 16), observándose con nitidés las estructuras alargadas del patógeno; en la Figura 4 (Liefting *et al*., 2009) donde aparece la micrografía del *C*.L.s., es bastante similar a la que se obtuvo en esteestudio.

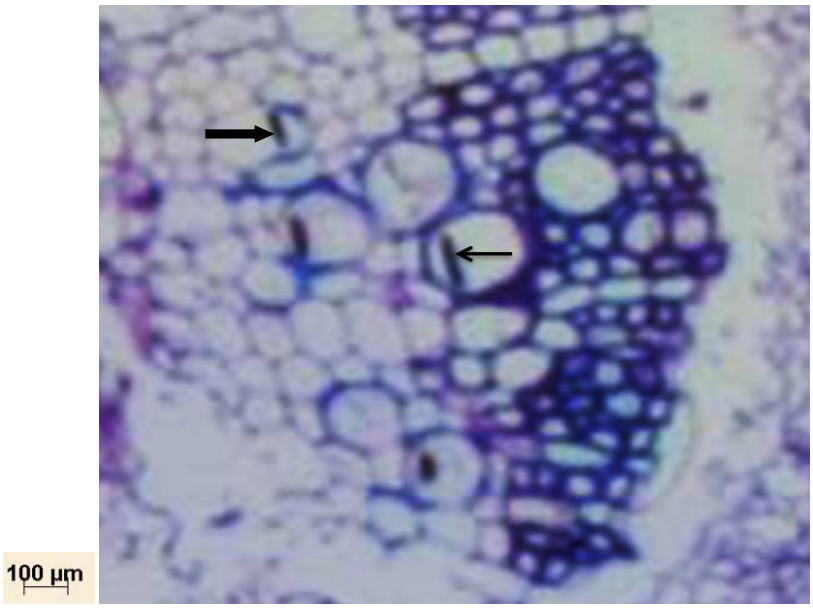

Figura 17. Fotomicrografía electrónica de tejido de tomate enfermo de *C*.L.s. Flechas indican la presencia de cuerpos pleomorficos dentro de las células.

I Análisis de resistencia genética

Se obtuvo diferencia estadística significativa ($p \leq 0.01$) dentro de cada una de las siete variables evaluadas en cada genotipo (Cuadro 10), determinando las calificaciones por escala del 1 al 5 en los parámetros: enpurpuramiento, amarillamiento y hoja crujiente. La calificación de 1 significa asintomática, 2

síntomas ligeros, 3 síntomas visibles, 4 síntomas severos y 5 síntomas extremadamente severos (marchitez); en los otros parámetros, aborto de flor, achaparramiento y plantas enfermas, la evaluación fue diferente, ya que ésta se definió en base a porcentajes. Estas lecturas se realizaron dos meses y medio después de la infestación (15/julio/2010), lo que permitió encontrar diferencias entre la sensibilidad de los genotipos a la enfermedad, lo cual es fundamental en el mejoramiento genético de híbridos resistentes a enfermedades.

La descripción se presenta a continuación:

1. Enpurpuramiento

En el Cuadro 10 se puede observar que en relación al enpurpuramiento de hojas los genotipos ToA-12 y ToA-14 fueron los menos afectados ya que ToA-12 tuvo disminuciones de 47.4, 78.9, 86.9, 83.2, 81.3 78.8 y 87.4% con respecto a los genotipos ToA-14, ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda; mientras que en ToA-14 el enpurpuramiento disminuyó con los respectivos 59.9, 75.1, 68.1, 64.4, 59.7 y 76.1% en relación a ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda.

La acumulación de antocianina en las hojas nuevas, afectadas por la presencia del patógeno mostró color violáceo especialmente en la región apical de la planta, donde también se observó crecimiento filiforme. Esto último no se reporta en la literatura aunque es muy común observarlo en cultivos comerciales donde el clima es más fresco que en Sinaloa.

2 Amarillamiento

El genotipo ToA-12 presentó amarillamiento foliar con disminuciones de 45.7, 81.2, 85.0, 82.5, 79.2, 82.7 y 87.7 en comparación con ToA-14, ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda respectivamente; No obstante, ToA-14 también tuvo un amarillamiento del follaje estadísticamente igual que ToA-12, pero con 65.4, 72.4, 67.7, 61.7, 68.2 y 77.3% menos que los respectivos genotipos ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda (Cuadro 10).

Este tipo de pigmentación se observó más intenso entre las nervaduras de las hojas; es decir, el tejido adjunto a lo largo de las nervaduras se observó verde clorótico. Fue bastante común observar que el amarillamiento predominó en el tercio superior de la planta.

3 Hoja crujiente

Esta variable fue en valores absolutos y desde el punto de vista estadístico, igual en los genotipos ToA-12 y ToA-14, por lo que ambos tuvieron porcentajes de 81.0, 80.4, 73.6, 71.6, 79.9 y 82.4% menos en comparación con ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda en el mismo orden (Cuadro 10).

Lo quebradizo de las hojas no se ha considerado en evaluaciones con relación a otras enfermedades que dañan el follaje, aunque el fenómeno se menciona pero sin que se hayan hecho evaluaciones, como en esta investigación

4 Enrollamiento de hoja

Los tratamientos ToA-12 y ToA-14 mostraron diferencia estadística entre tratamientos (Cuadro 10), siendo los menos afectados en este parámetro (Figura 17). Al observar las hojas, se evaluó el enrollamiento de ellas, síntoma que Garzón en 1984 menciono como característico en el descubrimiento de esta enfermedad.

Calificación del 1 al 5 de Enrollamiento de hojas, Amarillamiento, Enpurpuramiento y Hojas crujientes

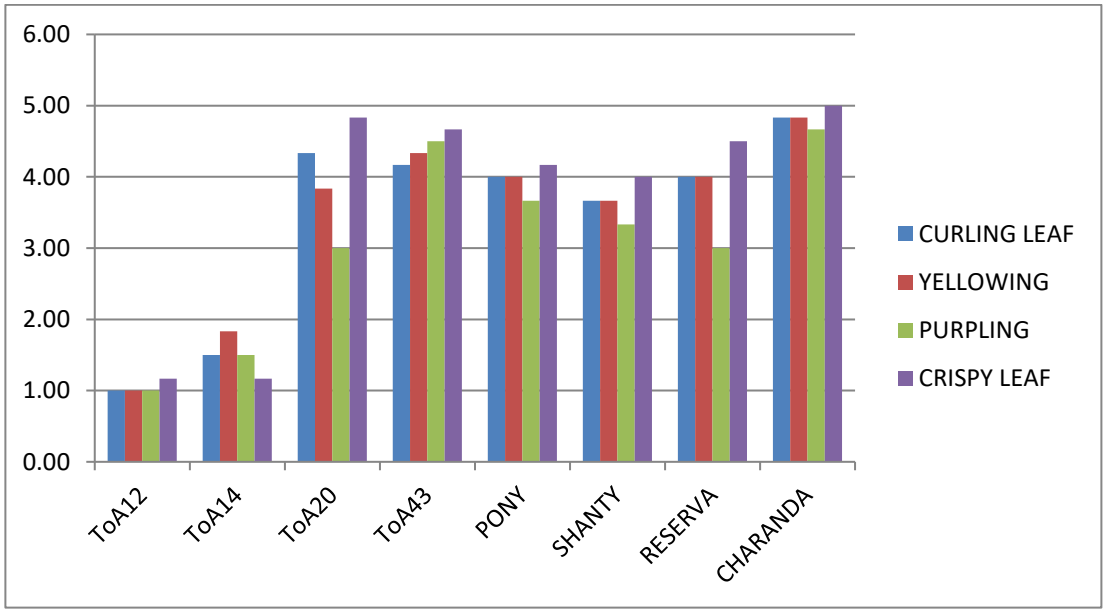

Figura 18. Calificaciones promedio de la evaluación de Enrollamiento de hoja, Amarillamiento, Enpurpuramiento y Hoja crujiente.

5 Aborto de flor

Este fenómeno ocurrió con claras diferencias estadísticas entre los genotipos, pero en este caso fue ToA-14 el genotipo menos afectado, en el que la aborción de flores disminuyó 62.9, 81.7, 73.4, 78.8, 81.2, y 82.4% comparado con lo que

se observo en ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda, respectivamente; aunque le siguió ToA.12 con disminuciones de 42.3, 71.5, 58.6, 67.1, 70.7 y 72.6% en relación a los mismos genotipos (Cuadro 10). Cabe mencionar que durante esta etapa de las plantas la temperatura llego a ser ≥ 33 °C, y quizás tuvo consecuencias en el aborto de flores. Pero también los materiales son genéticamente diferentes, de tal manera que en el enpurpuramiento y amarillamiento que ocaciona el patógeno, afecto el proceso de fotosíntesis y, en consecuencia, la acumulación de materia seca y la aborción de flores. Esto último indica que el patógeno también juega un papel importante en la caída de flores, como lo menciona Garzón (1984).

También se considera importante mencionar, que fue común observar que las plantas enfermas mostraron amarillamiento más intenso en el área de absición del pedúnculo en comparación con las plantas sanas.

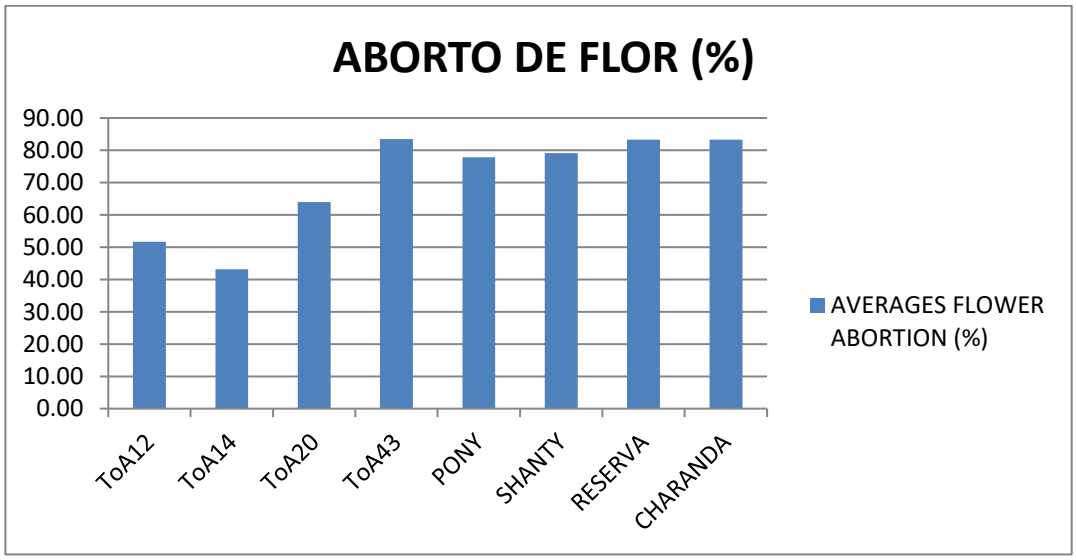

Figura 19. Porcentaje de aborto de flor de los tratamientos evaluados.

6 Achaparramiento

La respuesta de los genotipos en esta variable se puede notar en el Cuadro 10, de donde se pudo estimar que ToA-12 tuvo la menor frecuencia de plantas con achaparramiento, de tal forma que el problema disminuyó 41.8, 79.8, 84.1, 84.4, 84.2, 76.1 y 83.5% comparado con los promedios que se observaron en los genotipos ToA-14, ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda, respectivamente. Sin embargo, otras disminuciones importantes también se observaron en ToA-14, en donde la frecuencia de plantas disminuyó 65.4, 72.7, 73.2, 72.8, 59.0 y 71.7% en comparación con los respectivos materiales ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda.

% ACHAPARRAMIENTO

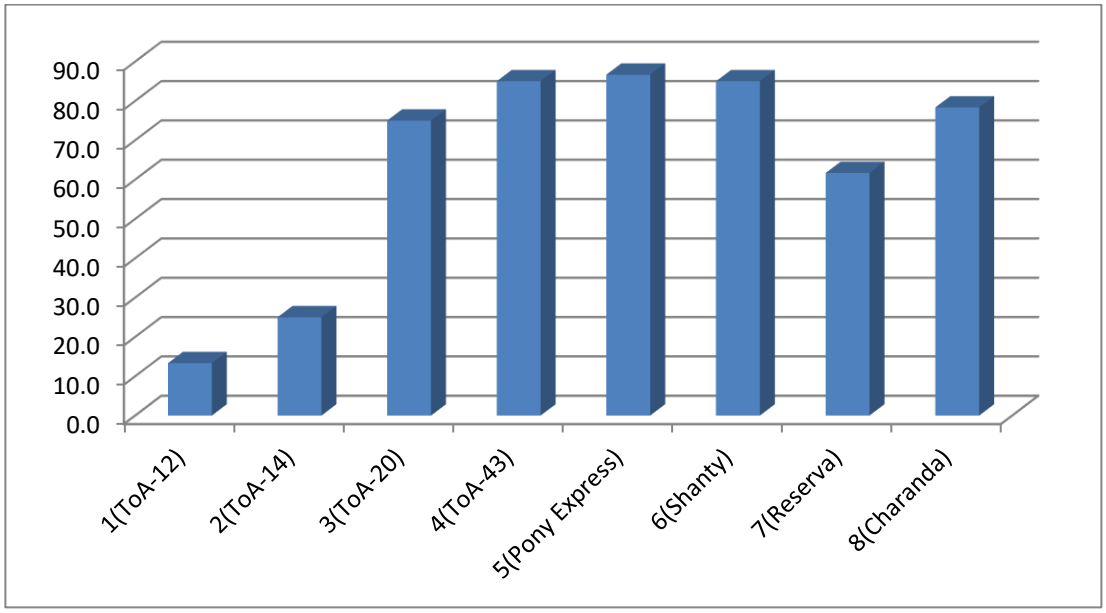

Figura 20. Porcentaje de achaparramiento entre tratamientos evaluados.

7 Plantas enfermas

Los promedios de esta variable se pueden notar en el Cuadro 10, de donde se estimó que en ToA-12 el número de plantas enfermas fue 38.7, 63.9, 81.0, 82.9, 81.7, 83.3 y 84.4% menos con respecto a ToA-14, ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda, en el mismo orden. No obstante en ToA-14 también se observaron disminuciones importantes, las que llegaron a ser de 41.1, 69.0, 72.1, 70.1, 72.8 y 78.6% en relación a los promedios observados en ToA-20, ToA-43, Pony Express, Shanty, Reserva y Charanda. Lo Anterior permite deducir que los genotipos ToA-12 y ToA-14 fueron poco afectados por *Candidatus* Liberibacter solanacearum y por tanto los más resistentes.

J Análisis estadístico

En el Cuadro 10 se puede observar que en todos los parámetros antes mencionados, se detectó diferencia estadística significativa, donde los tratamientos ToA-12 y ToA-14 fueron los mejores. Esto evidencia según el rigor experimental que estos últimos tratamientos fueron menos afectados por la influencia *Candidatus* Liberibacter solanacearum.

Cuadro 10. Observaciones de signos en las plantas de tomate infectadas con "*Candidatus* Liberobacter solanacearum" (valores medios de los rangos).

Parámetro	Genotipos de tomate							
	ToA12	**ToA14**	**ToA-20**	**ToA-43**	**Pony Express**	**Shanty**	**Reserva**	**Charanda**
Enpurpuramiento	**5 d**	**9.5 cd**	**23.7 bc**	**38.1 ab**	**29.8 ab**	**26.7 ab**	**23.6 bc**	**39.7 a**
Amarillamiento	**5 d**	**9.2 cd**	**26.6 ab**	**33.3 ab**	**28.5 ab**	**24 bc**	**28.9 ab**	**40.6 a**
Hoja crujiente	**6.5 c**	**6.5 c**	**34.2 ab**	**33.1 ab**	**24.6 ab**	**22.9 b**	**31.3 ab**	**37 a**
Aborto de flor	**10.1 cd**	**6.5 d**	**17.5 bcd**	**35.5 a**	**24.4 abc**	**30.7 ab**	**34.5 ab**	**36.9 a**
Achaparramiento	**5.3 c**	**9.1 bc**	**26.3 ab**	**33.3 a**	**34 a**	**33.5 a**	**22.2 abc**	**32.2 a**
Plantas enfermas	**5.7 c**	**9.3 c**	**15.8 bc**	**30 ab**	**33.3 a**	**31.1 ab**	**34.2 a**	**36.6 a**

abcd; Literales diferentes en renglón, indican diferencia estadística, con la prueba de Dunn ($p < 0.05$).

X CONCLUSIÓN

- El método para establecer la fuente de inóculo fue el adecuado al detectar a *Candidatus* Liberobacter solanacearum en las plantas de tomate enfermas

- El método para establecer la colonia de *Bactericera cockerelli* Sulk fue el correcto al registrarse con éxito el ciclo completo del insecto.

- Las evaluaciones de resistencia genética en invernadero indicaron que los genotipos ToA-12 y ToA-14 fueron más resistentes a *Candidatus* Liberobacter solanacearum y son candidatos para futuro mejoramiento genético contra este patógeno.

XI BIBLIOGRAFIA

Agrios GN. 2005. Plant pathology. Academic press. 5st ed. p 922.

Agrios GN. 2008. Enfermedades de las plantas causadas por procariotes. Espiroplasmas. En Fitopatología. 2ª. Edición. Limusa. México.

Albanese G, La Rosa R y Ochoa Corona F. 1995. Organismos similares a los micoplasmas (MLO). Nuevos criterios para su clasificación taxonómica y situación actual de su conocimiento en Venezuela. Una revisión. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ), 13:493-502.

Alma A, Bosco D, Danielli A, Bertaccini A y Vibio M. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants.Insects and Molecular Biology, 6:115-121.

Batool A, Iftikhar Y, Mughal SM, Khan MM, Jaskani MJ, Abbas M y Khan IA. 2007. Citrus greening disease – A mayor cause of citrus decline in the world – A review. Horticultural Science (Prague), 34:4:159-166.

Baumann P. 2005. Byology bacteriocyte associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. Annual Revews of Microbiology, 59:155-189.

Becerra-Flora A. 1989. Biología de *Paratrioza cockerelli* Sulc y su relación con la enfermedad del “Permanente del tomate” en el Bajío. Tesis de Licenciatura. Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro, México. p 55.

Biosecurity New Zealand. 2008. New bacterium affects fresh tomatoes and capsicums. http://www.biosecurity.govt.nz/pests/surv-mgmt/resp/tom-cap-bacterium

Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive , newly-emerging, centrury old disease of citrus. Journal of Plant Pathology, 88:7-37.

Buchner P. 1965. Endosymbiosis of animal with plant microorganisms. Interscience New York. John Wiley. pp 909.

Bujanos M., R., J. A. Garzón T. y A. Marin J. 2005. Manejo integrado del pulgon saltador *Bactericera =(Paratrioza) cockerelli (*Sulc) (Hemiptera: Triozidae) en los cultivos de solanáceas en México. Segunda convención Mundial de Chile. pp. 93-99.

Carraro L, Osler R, Loi N, Ermacora P, and Refati E, 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. Journal of Plant Pathology, 80:233-239.

Daniel, W. W. 2002. Bioestadística Base para el análisis de ciencias de la salud. Cuarta Edición. Editorial Limusa Wiley. México.

Daniels LB. 1934. The tomato psyllid and the control of psyllid yellows of the potatoes. Colorado Agricultural College. Bulletin 410.

Das AK. 2004. Rapid detection of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) disease using PCR. Current Science, 87:9.

Davis DL, Guise CM, Clark MF y Adams AN. 1992. Parry´s disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by Cacopsylla pyricola. Plant Pathology, 41:195-203.

Davis RD y Sinclair WA. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. Phytopathology, 88:1372-1376.

Davis RE y Dally EL. 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of *flavescence dorée*-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. Plant Disease, 85:7:790-797.

Delgadillo, S.F., Cárdenas, S.E., Valdominos, G., García, R.Q., Nieto, D.A. y Garzón, T.J.A., 1999. Alteraciones histológicas causadas por fitoplasma asociado al “permanente” del jitomate (*Lycopersicon escullentum* Mill.) en Guanajuato. XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Guadalajara, Jal., México. Resúmenes. P 320.

Dellaporta SJ, Word J y Hicks JB. 1983. A plant DNA minipreparation, versión II. Plant Molecular Biology Report, 1:19-21.

Dirk Janse Jacob. 2006. Phytobacteriology and diagnosis of bacterial diseases of plants. En Phytobacteriology: principles and practice. Edition ilustrated. ISBN 1845930258, 9781845930257.

Doddapaneni H, Liao H, Lin H, Bai X, Zhao X, Civerolo EL, Irey M, Coletta-Filho H y Pietersen G. 2008. Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of de citrus huanglongbing (HBL)-associated bacterium *Candidatus* Liberibacter. BMC Research Notes. 1:72, http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/72

Dunn, O. J., 1964. Multiple contrast using rank sums. Technometrics. 6:241-252.

Evans AS. 1976. Caution and disease. The Henle-Koch postulates revised. Yale Journal of Biology and Medicine, 49(2): 175-195.

FAOSTAT. 2009. www.faostat.fao.org

Fletcher J y Wayadande A. 2002. Fastidious vascular-colonizing bacteria. The Plant Health. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-1358.

Font I, Abad P, Albinana M, Espino AI y Dally EL. 1999. Amarilleos y enrojecimientos en zanahoria: una enfermedad a diagnostico. Botánica y Sanidad Vegetal. Plagas, 25:405-415.

Frisinghelli C, Delaiti L, Grando MS, Forti D y Vendimian ME. 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. Journal of Phytopathology, 148:425-431.

Garnier M, Danel N y Bové M. 1984. The greening organism is a gram negative bacterium. En Proceddings of 9th Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologist. Riverside, University of Californa. p 115-124.

Garzón TJA, Garza CA y Bujanos MR. 1986. Determinación del insecto vector de la enfermedad de tipo viral “permanente del tomate” (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la región del Bajío. En: XIII Congreso Nacional de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chis. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 30.

Garzón, T. J. A. 2002. Asociación de *Paratrioza cockerelli* Sulc con enfermedades en papa (*Solanum* tuberosum)y tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill. Ex Fawnl) en México. Eds: Garzón T. J. A; Urías, M. C. R; García, Q. R; Romero, E. J; Zamudio, L. J. C; Gálvez, R. J. B. Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. Memoria. Primera edición. SAGARPA-INIFAP-CESAVESIN. Culiacán, Sinaloa, México. 100 p.

Garzón, T. J. A; Becerra, A. F; Marín, A. J; Mejía, C. A. y Byerly, K. F. M. 1992. Manejo integrado de la enfermedad “permanente del tomate, *Lycopersicum esculentum* (L) Karst, en El Bajío. En: Urías.M; C., Rodriguez-M., R. y Alejandre-A., T. (de.).

Áfidos como vectores de virus en México, contribución a la ecología y control de áfidos en México. Volumen Y. Centro de Fitopatología A. C. 30 p.

Garzón, T.J.A., 1984. Enfermedad del “Permanente” del jitomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en Celaya, Gto. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, S.L.P. 1984. Resúmenes, Soc. mex. Fitopatología A.C. P 138.

Garzón-Tiznado JA, Cárdenas-Valenzuela OG, Bujanos-Muñiz R, Marín-Jarillo A, Becerra-Flora A, Velarde-Felix S, Reyes-Moreno C, González-Chavira M y Martínez-Carrillo JL. 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad „Permanente del tomate‟ en México. Agricultura Técnica en México, 35:1:58-69.

Garzón-Tiznado JA, Garzón-Ceballos JA, Velarde-Félix S, Marín-Jarillo A, Cárdenas-Valenzuela OG. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al “permanente del tomate” por el psílido *Bactericera cockerelli* SULC en México. Entomología Mexicana, 4:672-674.

Garzón-Tiznado JA. 2002. El “pulgón saltador” o la *Paratrioza*, una amenaza para la horticultura de Sinaloa. Taller sobre Paratrioza cockerelli Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Memoria, 9-12.

Gil R, Sabater-Muñoz B, Latorre A, Silva FJ y Moya A. 2002. Extreme genome reduction in Buchnera spp.: Toward the minimal genome hended for symbiotic

life. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99:4454-4458.

González Luis Carlos. 1985. Micoplasmas, espiroplasmas y rickettsias fitopatógenas. En Introducción a la fitopatología. Ed. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 45-47.

González, I. A. 1991. *Lycopersicum esculentum* Mill.; Aspectos relevantes para su cultivo en México. U. A. Ch. Dpto. de parasitología agrícola. Chapingo, México.

Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer y Paine TD. 2008. A new huanglongbing species, “Candidatus Liberibater psyllaurous”, found to infet tomato and potato, is vectored by the psyllid Bactericera cockerelli (Sulc). Applied and Enviromental Microbiology, 74:18:5862-5865.

Harris KF. 1980. Aphids, leafhoppers and planthoppers, in: Vectors of plant pathogens. Harris KF y K Maramosch (editores). 1980. Nueva York, Academic Press. p 1-13.

Harrison NA, Womack M y Carpio ML. 2001. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. Plant Disease, 86:676-681.

Hugenholtz P, Pitulle C, hershberger KL y Pace NR. 1998. Novel division level bacterial divesity in a yellowstone hot spring. Journal of Bacteroiology, 180:366-376.

Hung TH, Hung SC, Chen CN Hsu MH y Su J. 2004. Detection by PCR of *Candidtus* Liberibacter asiaticus, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllidas: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathology, 53:96-102.

INISAV (Instituto de Investigacines de Sanidad Vegetal). 1999. La enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (Diaphorina citri Kuwayama). Boletín Técnico (La Habana). 5:1.

Jagoueix S, Bové JM y Garnier M. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, 44:379-386.

Jagoueix S, Bové JM y Garnier M. 1996. PCR detection of the two „Candidatus" liberobacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes, 10:43-50.

Janes MJ. 1936. *Paratrioza cockerelli* (Sulc) on tomatoes in Southwest Texas. Journal of Economic Entomology, 30:2:379.

Jarausch B, Schwind N, Jarausch W, Kresal G, Dickler E and SeemÜller E, 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. Plant Disease, 87:101.

Jensen DD, Griggs WH, Gonzalez CQ y Schneider H. 1964. Pear decline virus transmisión by pear psylla. Phytopatology, 54:1346-1351.

Kakizagua S, Oshima K, Kuboyama T, Nishigawa H, Jung H, Sawanayagi T, Tsuchizaki T, Miyata S, Ugaki M y Namba S. 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. Phytopathological Society, 14:9:1043-1050.

Kaloostian GH y Jones LS. 1968. Pear leaf curl virus transmited by pear psylla. Plant Diseases. 52:924-925.

Kaloostian GH. 1980. Psyllids in: Vectors of plant pathogens. Harris KF y Maramorosch (editores). 1980. Nueva Cork, Academia Press. Pp 87-91.

Kawakita H, Saiki T, Wei W, Mitsuhashi W y Watanabe K. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. Phytopatology, 90:909-914.

Kirkpatrick BC, Smart C, Gardner S, Gao JL, Ahrens U, Maurer R, Schneider B, Lorenz KH, Seemuller E, Harrison N, Namba S y Daire X. 1994. Phylogenetic

relationship of plant irthogenic MLOs stablished by 16/23 S rDNA spacer sequences. IOM Letters, 3:218-229.

Komatsoulis GA y Waterman MS. 1997. A new computational method for detection of chimeric 16S rRNA artifacts generated by PCR amplification from mixed bacterial poputations. Applied Environmental Microbiology, 63:2338-2346.

Kummert J y Rufflard G. 1997. A preliminary report on the detection of phytoplasmas by PCR. Biochemica, 1:22.

Lee I-M, Davis RE y Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology, 54:221:255.

Lee I-M, Gundersen-Rindal DE y Bertaccini A. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. Phytopatology, 88:12:1359-1366.

Lee I-M, Gundersen-Rindal DE, Davis RE. y Bartoszyk IM. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 48:1153-1169.

Lee I-M, Martín M, Botner KD, Dane RA, Black MC y Troxclair N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in varios crops in Texas. Phytopathology, 93:11:1368-1377.

Lee ME, Grau CR, Lukaesko LA y Lee I-M. 2002. Identification of aster yellows phytoplasmas in soybean en Wisconsin bsed on RFLP analysis of PCR-amplified products (16S rDNAs). Canadian Journal of Plant Pathology, 24:125-130.

Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., and Clover, G. R. G. 2009. A new '*Candidatus* Liberibacter' species associated with diseases of solanaceous crops. Plant Dis. 93:208-214.

Liesack W y Stackebrandt E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an australian terrestrial environment. Journal of Bacteriology, 174:5072-5078.

López CEJ y Pérez SG. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 26:45-56.

López M.,M., R. Gastélum L., M. C. Olivas O., J. L. Corrales M. 2003. Experiencia con *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Homoptera: Psyllidae) en tomate grape variedad "Santa" y berenjena *Solanum melongena.* En: memorias VI Congreso Internacional en ciencias Agricolas. UABC-ICA, CESVBC, FUNACIÓN PRODUCE BC, SAGARPA. Mexicali, B.C. pp. 670-675.

Márquez E. 1996. http://prof.usb.ve/ejmarque/investiga/r1.html

McCoy RE, Caudwell A, Chang CJ, Chen TA, Chiykowski LN, Cousin MT, Dale JL, DeLeeuw GTN, Golino DA, Hackett KJ, Kirkpatrick BC, Marwithz R, Petzold H, Sinha RC, Sugiura M, Whitcomb RF, Yang IL, Zhu BM. y Seemuller E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In The Mycoplasmas.. Editado por RF Witcomb y JG Tully. New York Academic Press. 5:545-560

Milne RG, Ramazo E, Lenzii R, Masenga V, Sarindu S y Clark MF. 1995. Pre- and postembedding immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and bermudagrass whiteleaf. Netherlands Journal of Plant Pathology, 101:57-67.

Montano HG, Davis RE, Rally EL. Pimentel JP y Brioso PST. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. Plant Disease, 84:4:429-436.

Morris J, Reed P y Sansford C. 2009. CSL information note: Candidatus liberibacter solanaearum -a new bacterium associated with a disease of tomatoes, capsicums, and potatoes in New Zealand. http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/canLibSol.pdf

Morton A, Davies DL, Blomquist CL y Barbara DJ. 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. Molecular Plant Pathology, 4:2:109-114.

Munyaneza JE, Crosslin JM y Upton JE. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera:Psyllidae) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United State and Mexico. Journal Economic Entomology, 100:3:656-663.

Munyaneza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, De la Rosa Lozano G y Sánchez A. 2009. First Report of "*Candidatus* Liberibacter psyllaurous" in Potato Tubers with Zebra Chip Disease in Mexico. Plant Disease, 93:5:552.

Munyaneza JE, Sengoda VG, Garzón-Tiznado JA, Cárdenas-Valenzuela OG. 2009. First Report of "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" in tomato plants in Mexico. Plant Disease, 93:10:1076.

Munyaneza JE, Sengoda VG, Garzón-Tiznado JA, Cárdenas-Valenzuela OG. 2009. First Report of "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" in pepper plants in Mexico. Plant Disease, 93:10:1076.

Nava, C.U. 2002. Muestreo, monitoreo y umbrales económicos del psílido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Eds: Garzón, T.J.A; Urías, M.C.R; García, Q.R; Romero, E. J; Zamudio, L.J.C; Gálvez, R.J.B. Taller sobre *¨Paratrioza cockerelli*

Sulc. Memoria. Primera edición. SAGARPA-INIFAP-CESAVESIN. Culiacán, Sinaloa, México. 100 p.|

Nishigawa H, Miyata S, Oshima K, Sawayanagi T, Komoto A, Kuboyama T, Matsuda I, Tsuchizaki T y Namba S. 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. Microbiology, 147:507-513.

Pace N, Olsen G y Woese C. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. Cell, 45:325-326.

Pacheco, M. F. 1985. Plagas de los cultivos agricolas en Sonora y Baja California. SARH. Primera edición. México, D.F. 414 p.

Palermo S, Arzone A, Bosco D. 2001. Vector-pathogen-host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers *Macrosteles quadripunctulatus* and *Euscelidus variegatus*. Entomology Experimental Applied, 99:347-354.

Pilkington L, Gurr GM, Fletcher MY, Nikandrow A y Elliott E. 2004. Vector status of three leafhopper species for Australian Lucerne yellows phytoplasma. Australian Journal Entomology, 43:366-373.

Pletsch, D. J. 1947. The potato psyllid Paratrioza cockerelli (Sulc), its biology and control. Mont. Agric. Exp. Stn. Bull. 446:95.

Richards BL y Blood HL. 1933. Psyllid yellows of the potato. Journal of Agriculture Research, 46:189-216.

Richards BL. 1928. A new and destructive disease of the potato in UTA and its relation to the potato psylla. Phytopathology, 18:140-141.

Rosales VIM. 2002. Diagnóstico de enfermedades en plantas: uso de herramientas moleculares. Actualización técnica y generación de redes de colaboración para el desarrollo de proyectos comunes en fitopatología (FP-V-2002-1-A-028). Fundación para la Innovación Agraria e Instituto de Investigaciones Agropecuarias. La Platina.

SAGARPA. 2009. www.sagarpa.gob.mx

Salas-Marina MA. 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de fitoplasma de la punta morada de la papa. Tesis de Maestría. UAAAN. Saltillo, Coah., México. p 49.

Salazar LF. 1997. Un Factor negativo para la producción de semilla de Papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). InfoPapa_2.

Schneider B, Gibb KS, y Seemuller E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongtion factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. Microbiology, 143:3381-3389.

SIAP-SAGARPA. 2009. www.siap.sagarpa.gob.mx

Silva FJ, Latorre A y Moya A. 2001. Genome size reduction through multiple events of gene disintegration in Buchnera APS.Trends in Genetics. 17:11:615-618.

Smith IM. 1992. Mollicutes y Organismos tipo Rickettsia. En Manual de enfermeades de las plantas. Publicado por Mundi-Prensa-Libros, ISBN 8471143585, 9788471143587. España, 148-168.

Sosa-Moss C, Perdomo-Roldán F, Brathwaute Chad y Salazar-Cruz JJ . 1997. Micoplasama y espiroplasmas. Espiroplasma. En Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Publicado por Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultrura, México. 215-216.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). 2002. User's Guide Statistics. Cary, North Carolina. 646 pp. (Version 9.0).

Steel, R. G. D.; Torrie, J. H. 1988. Bioestadística principios y procedimientos. 2da edición. Editorial Mg Graw-Hill/Interamericana de México, S.A. DE C.V. pp132-140.

Tamames J, Gil R, Latorre A, Peretó J, Silva FJ t Moya A. 2007. The frontier between cell and organelle: genome análisis of Candidatus Carsonella rudíi. BMC Evolutionary Biology, 7:181.

Tanne E, Boudon-Padieu E, Clair D, Davidovich M, Melamed S y Klein M.2001. Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. Phytopathology, 91:8:741-746.

Webb DR, Bonfiglioli RG, Carraro L, Osier R y Symons RH. 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. Phytopathology, 89:10:894-901.

Weintraub GP y Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology, 51:91-111.

Welliver R. 1999. Diseases caused by phytoplasmas. Regulatory Horticulture. Plant Pathology, 25:1: 17-22.

Williamson DL, Whitcomb RF, Tully JG, Gasparich GE, †Rose DL, ‡Carle P, Bové JM, Hackett KJ, Adams JR, Henegar RB, Konai M, §Chastel C y French FE. 1998. Revised group classifiction of the genus Spiroplasma. Internationa Journal of Bacteriology, 48:1-12.

Wu D, Daugherty SC, Van Aken SE, Pai GH, Watkins KL, Khouri H, Tallon LJ, Zaborsky JM, Dunbar HE, Tran PL, Moran NA y Eisen JA. 2006. PloS Biology, 4:6:1079-1092.

Zhang J, Hogenhout SA, Nault LR, Hoy CW y Miller SA. 2004. Molecular and symptom analysis of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. Phytopathology, 94:8:842-849.

Zhehr JP, Mellon MT y Zani S. 1998. New nitrogen fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (nifH) genes. Applied Environmental Microbiology, 64:3444-3450.

XII. APÉNDICE