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



# DETERMINACIÓN DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA DE Candidatus Liberibacter solanacearum EN Bactericera cockerelli Sulc

# COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA REYNALDO MILLÁN CHAIDEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. LEOPOLDO PARTIDA RUVALCABA

CO-DIRECTOR DE TESIS DR. JOSÉ ANTONIO GARZÓN TIZNADO

**CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, ENERO DE 2014** 

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **REYNALDO MILLAN CHAIDEZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

:

#### MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

#### **CONSEJO PARTICULAR**

DIRECTOR DE TESIS	
	DR. LEOPOLDO PARTIDA RUVALCABA
CO-DIRECTOR DE TESIS	
	DR. JOSÉ ANTONIO GARZÓN TIZNADO
ASESOR	
	DR. TOMÁS DÍAZ VALDÉS
ASESORA	
I	DRA. TERESA DE JESÚS VELAZQUEZ ALCARAZ

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, ENERO DE 2014



# 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 20 de enero del año 2020, el que suscribe Reynaldo Millan Chaidez, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 1173272-5, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Jose Antonio Garzón Tiznado y del Dr. J. Enrique Retes Manjarrez y cede los derechos del trabajo titulado "Determinación de transmisión transovárica de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli*", a la Facultad de Agronomía y Medicina Veterinaria y Zootecnia, 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** 

MC. Reynaldo Millan Chaidez

DOMICILIO: Calle Algarrobo 3590 A, Fracc. Urbivillas del Prado. Culiacán, Sinaloa.

TELÉFONO: 667-4910769

CORREO ELECTRÓNICO: reynaldomillan@yahoo.com

CURP: MICR651117HSLLHY08

#### **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 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.

# **ÍNDICE DE CONTENIDO**

	Pág
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I RESUMEN	1
II ABSTRACT	2
III INTRODUCCIÓN	3
IV REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Candidatus Liberibacter spp	4
4.2 Candidatus Liberibacter solanacearum	8
4.3 Organismos tipo bacteria como agentes infecciosos	12
4.3.1 Fitoplasmas	12
4.3.2 Rickettsias	15
4.3.3 Espiroplasmas	17
4.3.4 Bacterias no cultivables	21
4.3.5 Bacterias endosimbióticas	23
4.4 Importancia de insectos vectores de fitopatógenos	25
	Pág.
4.5 Bactericera cockerelli Sulc	25
4.5.1 Bionomia de Bactericera cockerelli	27
4.5.2 Variación genética de Bactericera cockerelli	30
4.5.3 Haplotipos de Bactericera cockerelli	33
4.6 Daños directos, a indirectos causados nor Ractericera cockerelli.	35

4.7 Permanente del tomate	39
4.8 Importancia y tipos de transmisión de fitopatógenos por insectos	42
4.8.1 Transmisión de patógenos en forma transovarica	45
4.8.2 Transmisión de fitoplasmas	45
4.8.3 Transmisión de virus	47
4.8.4 Transmisión de bacterias endosimbióticas	48
4.9 Transmisión de bacterias en ovogénesis de insectos	50
4.10 Diagnóstico de enfermedades de plantas	54
4.10.1 Métodos para la detección e identificación de organismos tipo ba	acteria no
cultivables	.54
4.10.2 Sintomatologia	57
F	Pág.
4.10.3 Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos	58
4.10.4 Hibridación Molecular	59
4.10.5 Reaccion en cadena de la polimerasa PCR	60
4.10.6 Métodos para determinar relaciones filogenéticas	62
V JUSTIFICACIÓN	66
VI HIPÓTESIS	67
VII OBJETIVOS	67
7.1 Objetivo general	67
7.1.1 Objetivos específicos	67
VIII MATERIALES Y MÉTODOS	67
8.1 Localización del estudio	67
8.2 Clima	68

8.3 Suelo	68
8.4 Área experimental	68
8.5 Materiales de laboratorio	69
8.6 Establecimiento de la fuente de inóculo	69
8.7 Colonia de insectos en laboratorio	70
8.8 Experimentos de transmisión transovárica	70
8.8.1 Ensayo con huevecillos de Bactericera cockerelli	70
8.8.2 Ensayo con ninfas y adultos de Bactericera cockerelli	71
8.8.3 Análisis de eficiencia de transmisión de CLso con un huevecillo	73
8.9 Extracción de ADN para insectos	74
8.10 Extracción de ADN para plantas de tomate	74
8.11 Reacción en cadena de la polimerasa	75
IX RESULTADOS	76
9.1 Área experimental	76
9.2 Establecimiento de la colonia	77
9.3 Fuente de inóculo	77
9.4 Detección de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum	77
9.5 Secuenciación y análisis filogenético de CLso	79
9.6 Frecuencia de infección en psilidos por CLso	81
9.7 Eficiencia de transmisión de CLso con un huevecillo de Bactericera	a cockerelli
en plantas de tomate81	
X DISCUSIÓN	83
XI CONCLUSIÓN	86
XII BIBLIOGRAFIA	87

# **ÍNDICE DE CUADROS**

Pág.
Cuadro 1. Clasificación de fitoplasmas en grupos y subgrupos15
Cuadro 2. Clasificación de espiroplasmas en grupos y subgrupos21
ÍNDICE DE FIGURAS
Pág.
Figura 1. (A) Micrografia electrónica de barrido de los conductos de
floema16
Figura 2. (B) Detalles de (A) mostrando células de la bacteria dentro de
floema17
Figura 3. Representación esquematica del genoma de Candidatus Liberibacte
solanacearum21
Figura 4. Fitoplasmas en células del floema de pecíolos de hojas de plantas
mostrando síntomas de amarillez23
Figura 5. Tinción de Giménez de células infectadas por <i>R. rickettsii</i> 26
Figura 6. Fotomicrografia electrónica de transmisión de espiroplasmas, en e
floema de una planta de maíz infectada28
Figura 7. Huevecillos y ninfas de <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc38
Figura 8. Adulto de Bactericera cokerelli Sulc39
Figura 9. Dendograma de poblaciones de Bactericera cockerelli Sulc. basado en
marcadores genéticos43
Figura 10. Planta de tomate con síntomas del permanente del tomate50

Figura 11. Corte de un ovario de Locusta migratoria tenido con hematoxilina-
eosina62
Figura 12. Colonización de bacteria de la línea germinal63
Figura 13. Placa de hibridación por dot blot de hojas jóvenes de tomate70
Figura 14. Huevecillo de Bactericera cockerelli82
Figura 15. Gel de agarosa de productos de PCR
Figura 16. Árbol filogenético de la región 16S r ADN de las bacterias del género
"Candidatus Liberibacter", grupo alfaproteobacteria90
Figura 17. Planta con síntomas del permanente del tomate del ensayo de
eficiencia de transmisión92
Figura 18. Planta de tomate sana (Testigo)93

#### RESUMEN

En la actualidad, conocer la biología e interacción de insectos portadores de patógenos es fundamental para la aplicación de estrategias de un manejo integrado de plagas y enfermedades. En los últimos años, se ha confirmado al psílido Bactericera cockerelli Sulc. como vector específico alfaproteobacteria, no cultivable, restringida al floema llamada Candidatus Liberibacter solanacearum (CLso), la cual se encuentra causando graves daños económicos en la producción de tomate en México, y en diversas partes del mundo, principalmente en Nueva Zelanda y Europa. El objetivo de éste estudio fue determinar la transmisión transovárica de CLso por Bactericera cockerelli en la progenie y conocer la eficiencia de transmisión de CLso de los psílidos emergentes de la nueva generación en plantas de tomate libres de fitopatógenos. Los bioensayos se realizaron en condiciones controladas donde se aislaron huevecillos, ninfas y nuevos adultos emergidos para evaluar el porcentaje de eficiencia de transmisión en plantas sanas. Se utilizaron plantas de tomate cultivar Pony express como fuente de inóculo dentro de jaulas entomológicas. Los resultados de los análisis por PCR fueron positivos para CLso en huevecillos, ninfas y nuevos adultos, con una eficiencia de transmisión del patógeno del 2%. Se tiene suficiente evidencia de que CLso se transmite transováricamente por Bactericera cockerelli, con una baja eficiencia de transmisión de CLso sobre plantas de tomate. Estos datos generan un conocimiento más en la prevención y control de CLso en su vector especifico Bactericera cockerelli.

#### ABSTRACT

Today, knowing the biology and interaction of insect vectors of pathogens is essential for the implementation of strategies for integrated pest management. In recent years, it has been confirmed that psyllid Bactericera cockerelli Sulc. as a specific vector of an alphaproteobacteria not cultivable, restricted to the phloem called Candidatus Liberibacter solanacearum (CLso), which is causing serious economic damage in the production of tomato, potato, carrot, celery, onion and tobacco in different countries of the world. The goal of this study was to determine transovarial transmission of CLso by Bactericera cockerelli in progeny and know the transmission efficiency of CLso by psyllid nymphs emerging from offspring hosting on tomato healthy plants. Bioassays were conducted under controlled conditions, were isolated eggs, nymphs and new adults emerged to evaluate the transmission efficiency percentage. Was used the commercial variety named "Pony expres" and the plants were growing as an inoculum source within entomological cages. The results of the PCR analysis were positive for CLso in eggs, nymphs and new adults with a pathogen transmission efficiency of 2%. There is sufficient evidence that CLso is transovarially transmitted by Bactericera cockerelli, with low CLso transmission efficiency of tomato plants. These data generate knowledge on prevention and control of CLso and its specific vector Bactericera cockerelli.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, conocer la biología de los fitopatógenos transmitidos por insectos vectores es fundamental para la aplicación de estrategias en un manejo integrado de plagas y enfermedades (Garzón et al.,2010). Candidatus Liberibacter solanacearum CLso es una alfaprotebacteria secundaria, no cultivable que está ocasionando serios daños económicos en cultivos de solanáceas en México, America central, Estados Unidos y otras partes del mundo especialmente en Nueva Zelanda y Europa, la cual está confirmado como agente asociado a enfermedades económicamente importantes en cultivos de tomate, papa, chile, tamarillo, tabaco y actualmente en liliáceas(Garzón et al., 2008; Liefting et al., 2008,2009; Munyaneza et al., 2008; Abad et al., 2009; Lin et al., 2009). En los últimos años se ha confirmado a *Bactericera cockerelli* Sulc (Hemiptera: Psyllidae) como vector especifico de CLso,el cual se alimenta del floema de las plantas requiere la presencia de endosimbiontes primarios obligados importantes para la supervivencia del insecto. CLso es una bacteria que actúa como endosimbionte secundario que le confiere diferentes características de adaptación y resistencia a ciertos antibióticos ó enemigos naturales del insecto (Tamborindeguy C. et al.,2010). Por regla general en la mayoría de los hemípteros se presenta la transmisión transovárica de endosimbiontes primarios (Buchner P. 1965), como Candidatus Carsonella rudii y Wolbachia endosimbiontes obligados de Bactericera cockerelli, aunado a esto, no se conoce el sistema de transmisión vertical de CLso en la progenie de Bactericera cockerelli Sulc. El objetivo de éste trabajo fué determinar la presencia de CLso en huevecillos de Bactericera cockerelli Sulc.

mediante la técnica de PCR y la eficiencia de transmisión del patógeno por Bactericera cockerelli en plantas de tomate.

#### II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El control de enfermedades de fitopatogenos, y de algunos tipos de procariontes (bacterias no cultivables, fitoplasmas, espiroplasmas, etc.) no se ha podido lograr eficiententemente de forma directa. *Bactericera (=Paratrioza) cockerelli* Sulc, es actualmente uno de los vectores de mayor importancia en papa, tomate y chile en México y en algunas regiones de Estados Unidos de America (Garzón 2002, Liu y Trumble 2007, Munyaneza *et al.*, 2007), por lo que se considera importante la generación de conocimiento relacionado con su forma de diseminación, ya que no existe información sobre la posibilidad de que *C.* Liberibacter solanacearum, asociado a la enfermedad "Permanernte del Tomate", se transmita en forma transovárica por *Bactericera cockerelli* en plantas de tomate.

#### III. HIPÓTESIS

Candidatus Liberibacter solanacearum se transmite transovaricamente por Bactericera cockerelli.

#### IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la transmisión transovárica de CLso por Bactericera cockerelli Sulc.

#### Objetivos específicos

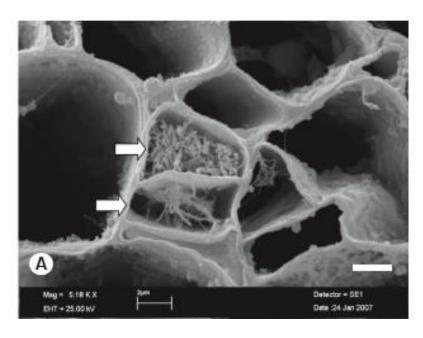
Analizar molecularmente la presencia de *Candidatus* Liberibacter solanacearum en huevecillos.

Conocer la eficiencia de transmisión transovárica de *Candidatus* Liberibacter solanacearum por *Bactericera cockerelli* en plantas sanas de tomate.

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

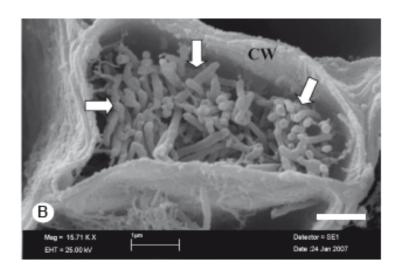
#### 4.1 Candidatus Liberibacter spp.

Las bacterias agrupadas dentro del genero Candidatus Liberibacter, colonizan el floema de sus plantas hospedantes y su imposibilidad para cultivarlas ha imposibilitado su ubicación taxonómica y por tanto se mantienen bajo la condición de Candidatus, término que antecede al género y especie debido a que no se puede tener en una colección biológica. Estas bacterias han sido asociadas con la enfermedad Huanglongbing HLB que afecta a los cítricos cuyo significado en español es "Dragón Amarillo". La bacteria fué observada por primera vez en 1970 afectando el floema de las hojas de Naranja (Lafleche y Bové, 1970), enfermedad que en ese entonces se consideró que era inducida por un organismo tipo micoplasma OTM. Candidatus Liberibacter es una bacteria Gram-negativa (Garnier et al., 1984; Jagoueix et al., 1996) no cultivable que se aloja en los vasos conductores de savia 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). Su caracterización bioquimica es nula, dada la dificultad para aislarla en medio de cultivo puro. La micróscopia electrónica y técnicas citoquimicas, han revelado que la bacteria Ca. Liberibacter, esta rodeada por una membrana celular rodeada compuesta de peptidoglicano, tipica de las gramnegativas (Garnier et al., 1984 ). Después de comparar su secuencia de nucleótidos con otras bacterias registradas en el GenBank, se propuso como miembro de las Eubacterias. El análisis filogenético del gen 16S rRNA indica que estas bacterias pertenecen al grupo de las Alphaproteobacterias donde se encuentran otros miembros como Agrobacterium, Bartonella y Bradyrhizobium, entre otras ( Jagoueix et al., 1994) Estos investigadores propusieron que el organismo que causa el HLB fuera considerado como bacteria, y que los organismos de este nuevo grupo de la división de las Proteobacterias, deberian de recibir el nombre de "Liberibacter" ( del latin liber [corteza] y bacter [ bacteria]. Por otro lado Murray y Schleifer (1994) hicieron una propuesta considerando la morfologia que presenta esta bacteria en los arboles de cítricos en la India y en árboles de cítricos en África proponen tres especies "Candidatus Liberibacter asiaticum", "Candidatus Liberibacter africanum" y "Candidatus Liberibacter americanum", las que son transmitidas por dos insectos vectores : Diaphorina citri y Trioza erytreae. La bacteria está presente en la hemolinfa y las glandulas salivales del insecto vector ( Jagoueix et al., 1994 ).



**Figura 1 – A.** Microfrafia electrónica de barrido de los conductos del floema en una sección transversal de una vena de hoja fracturada en congelación de (*Catharanthus roseus*) infectada experimentalmente por *Candidatus* Liberibacter americanus. Uno de los vasos del floema está colonizado por células baciliformes de *Ca*.L americanus (barra= 2μm).

Fuente: http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000600013



**Figura 2 – B.** Detalles de **A**, mostrando las células de la bacteria(flechas) dentro del floema (barra= $1\mu m$ ).

**Fuente**: http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000600013

Actualmente se usan varias técnicas, como PCR, clonación y la secuenciación para su detección y caracterización (Hansen *et al.*, 2008). A finales de 2008 se reportaron nuevas especies *de Ca. Liberibacter* asociadas a solanáceas, como tomate, papa, chile: se indica que el psílido *Bactericera cockerelli*, saltador de la papa, es el responsable de transmitir esta bacteria (Liefting *et al.*, 2008). En el 2010 se reportó la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en zanahoria en el sur de Finlandia; la transmisión ha sido atribuida al psílido *Trioza apicalis*, plaga que comunmente se presenta en el centro y norte de Europa. Los

síntomas observados en ésta hortaliza fueron: amarillamiento, deformación de hojas, clorosis, reducción del tamaño de la planta y proliferación de raices secundarias (Munyaneza et al., 2010) . Generalmente Ca. Liberibacter psyllaourus y Ca. Liberibacter solanacearum son transmitidos por Bactericera cockerelli, insecto polífago que se alimenta del floema de una amplia variedad de especies deplantas en las que se encuentra papa y chile, se reporta que la secreción de la saliva de B. cockerelli, debilita al cultivo e induce el sintoma "yellow psilid " (Blood et al, 1933; Carter 1950; Hansen et al., 2008). El desorden de "yellow psilid", anteriormente fué atribuido a una reacción de la planta, como resultado de las secreciones inyectadas cuando el psílido se alimentaba (Eyer, 1937; Richards y Blood, 1933). Los avances actuales en las técnicas de microbiologia celular han permitido detectar que "yellow psilid" y "zebra chips" son dos enfermedades distintas, siendo la segunda causada por Ca. Liberibacter (Segonda et al., 2009)

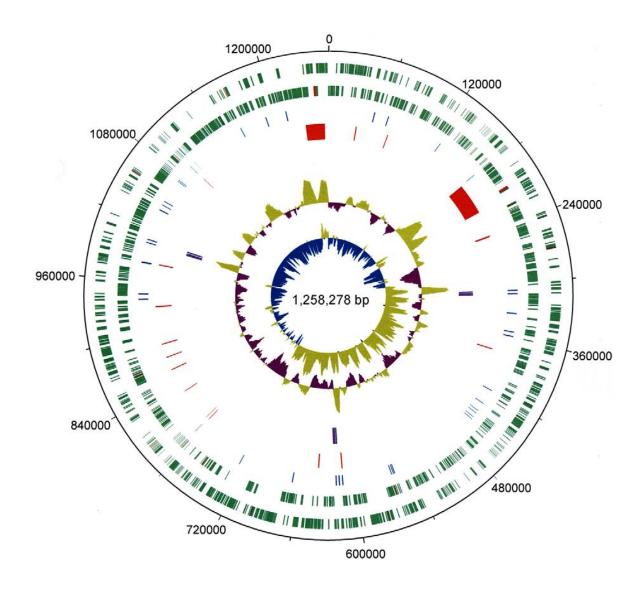
El control de *Ca. Liberibacter* en solanáceas se realiza con el manejo integrado de *Bactericera cockerelli*, debido a que este es conocido como el principal medio de transmisión de la bacteria; cabe considerar que algunas bacterias se transmiten por semilla, por lo tanto existe la posibilidad de que tambien suceda para *Ca. Liberibacter solanacearum* se transmita en forma transovárica

#### 4.2 *Candidatus* Liberibacter solanacearum

Candidatus Liberibacter solanacearum es una alfaproteobacteria, restringida al floema, endosimbionte secundario no cultivable (Secor GA et al., 2009; Levy J. et

al., 2011). En el año 2010 se reporta por primera vez el genoma completo de Candidatus Liberibacter solanacearum una fastidiosa alfa-proteobacteria que es transmitida por el psílido vector Bactericera cockerelli Sulc que se alimenta del floema de las plantas. Investigaciónes sobre ésta enfermedad se ha visto obstaculizada por la falta de métodos de cultivo sólido y a la escasez de información de la secuencia genómica de Ca. L. solanacearum". Se presenta la secuencia del metagenoma de 1.26 Mpb de CLso, basado en la aislamiento de DNA de psílidos de la papa. CLso no es la única especie de Liberibacter que está asociada a enfermedades de plantas. Existen tres especies de Liberibacter filogenéticamente distintas (Lin H, et al 2009 ) que están asociadas con el Huanglongbing (HLB) o enfermedad de los cítricos (Gottwald TR 2010). El genoma de Clas (Candidatus Liberibacter asiaticus) ha sido secuenciado y anotado (Duan Y, et al. 2009). Asi mismo, debido a que las especies de Liberibacter no son cultivables, la información que se tiene acerca de su etiología, fisiología general y modo de patogénesis es muy deficiente. Usando Metagenómica se realizaron ensayos para obtener la secuencia del genoma completo de CLso identificando varias características cromosómicas y haciendo predicciones acerca su fisiología basado en su inventario genético (Lin H et al., 2010). Dos rondas de 454 firosecuencias fueron llevadas a cabo para obtener la secuencia del genoma completo de CLso (accessión del Gen Bank # CP002371). La primera ronda de secuenciación fué realizada usando el método de pirosecuencias estándar de FLX (Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al. (2005)). Esta corrida generó un total de 176,935 lecturas produciendo 36,831,668 pares de bases con una lectura media de longitud de 208 pares de bases. Estas lecturas

sufrieron un ensamble de novo dentro de 15,061 clones contiguos cubriendo 5, 535,163 pares de bases con longitudes de clones contiguos entre los rangos de 500 a 55,601 pares de bases. Desde la base de datos, 134 clones contiguos fueron identificados en la homología, búsqueda y posteriormente confirmando la validéz de la secuencias de Candidatus Liberibacter solanacearum. La segunda ronda de secuenciación fue conducida por pirosecuencia de Titanio (Margulies M. et al. 2005). Esta corrida generó 513,784 lecturas con un total de 208,868,707 pares de bases con una lectura de longitud media de 406 pares de bases. Las lecturas totales de secuencias desde la segunda ronda de secuenciación fueron usadas los ensambles de novo, generando 18,147 clones contiguos cubriendo 9,768,772 pares de bases. De éstos 27 clones contiguos de los rangos de 1,000-279,292 pb fueron identificados como homólogos conocidos como secuencias genómicas del DNA de Liberibacter y estas fueron confirmadas posteriormente por PCR. Para conectar y confirmar los clones contiguos de CLso, 350 pares de iniciadores (primers) fueron diseñados por ruta del genoma (genomic walking ) (Lin H. et al. 2008). Los amplicones generados desde éstos primers fueron directamente secuenciados o clonados antes de la secuenciación. En total, se resecuenciaron cerca de 200,000 pares de bases por la secuencia de Sanger. Todos los esfuerzos realizados en estos bioensayos se generaron con éxito en la secuencia del genoma completo y el resultado de ensamble consistió en un cromosoma circular de 1,258,278 pares de bases (Fig.1).



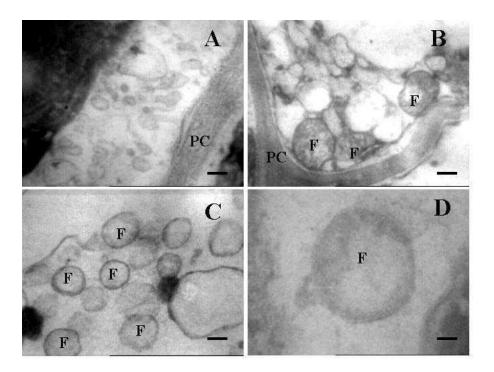
**Figura 3.** Representación esquemática del Genoma de *Candidatus* Liberibacter solanacearum. Representación circular del genoma de 1.26 Mpb. Las lineas con circulos exteriores representan (1) Fwd.CDS genes codificadores de proteinas(verde) y (2) De reversa CDS (verde) con pseudogenes en rojo; tRNA (azul); (4) bacteriófago derivado de regiones y probable remanente del fago(rojo); (5) tres cópias del operon del rRNA (16S, 23S y 5S) (púrpura); (6) % de contenido de (G+C) y (7) y sesgo de GC [(GC/(G+C))]. *Fuente >doi:10.1371/journal.pone.0019135.g001* 

# 4.3 Organismos tipo bacteria como agentes infecciosos

#### 4.3.1 Fitoplasmas

Los fitoplasmas son organismos pleomórficos, sin pared celular, y estan rodeados de una membrana. Su diámetro varía mucho; cuerpos que miden 50

a más de 1,000 nm se han hallado en la mayoría de las enfermedades de este tipo. Los cuerpos de los fitoplasmas contienen un enrejado fibrilar de hebras, que se supone son ADN, y áreas con gránulos semejantes a ribosomas. Estos organismos aparentemente se propagan por fisión binaria (Poncarova-Vorackova et al., 1998 y Miyata y Ogaki, 2006), gemación o fragmentación. Los fitoplasmas son los procariontes más pequeños capaces de replicación autónoma. Éstos 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, 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). 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 múltiplica 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).



**Figura 4.** Fitoplasmas en células del floema de pecíolos de hojas de plantas de uvas mostrando síntomas de amarillez. **A.** Sección de citoplasma de célula de tejido conductor mostrando cuerpos ovoidales y elongados. Barra 1000 nm. **B.** Sección de citoplasma de célula de tejido conductor en proceso de desintegración producto de la presencia de fitoplasmas. Barra 500 nm. **C.** Numerosos cuerpos ovoidales presentes en el citoplasma. Barra 200 nm. **D.** Detalle de fitoplasma encontrado en el citoplasma de tejido conductor. Barra 80 nm. **PC**: pared celular; **F**: fitoplasma. **Fuente**: http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072003000100003

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

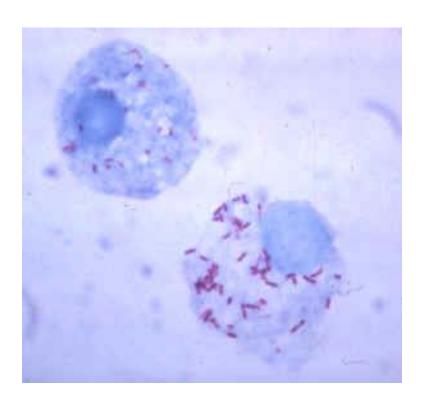
16S rIV (coconut letal yellow)	A, B
16S rV (elm yellow)	A, B, C
16S rVI (clover proliferation)	A, B
16S rVII (ash yellow)	A, B
16S rVIII (loofah witches' broom)	A
16S rIX (pigeon pea witches' broom)	A
16S rX (apple proliferation)	A, B, C, D, E
16S rXI (rice yellow dwarf)	A, B, C
16S rXII (stolbur)	A, B
16S rXIII (mexican periwincle	A
virescence)	
16S rXIV (bermudagrass white leaf)	A

**Cuadro 1**. Clasificación de fitoplasmas en grupos y subgrupos. Davis y Sinclair (1998); Lee *et al.*, (1998

#### 4.3.2 Rickettsias

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).



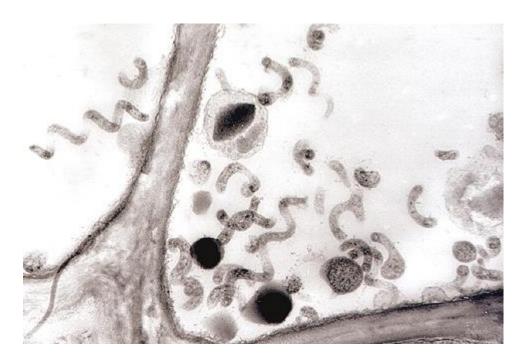
**Figura 5**. tinción de Gimenez de células de la hemolinfa de garrapatas infectadas con R. rickettsii. (CDC) Rickettsia rickettsii, es una pequeña bacteria que tiene que vivir dentro de las células de sus huéspedes. En consecuencia, son difíciles de ver en los tejidos mediante el uso de manchas histológicas de rutina y generalmente requieren el uso de métodos especiales de tinción.

Fuente:" Rickettsial Diseases, including Typhus and Rocky Mountain Spotted Fever (page 2)"

http://textbookofbacteriology.net/Rickettsia\_2.html

#### 4.3.3 Espiroplasmas

Los fitoplasmas, espiroplasmas, micoplasmas y sus organismos relacionados, todos procariotas que carecen de pared celular y que comparten otras características citológicas y moleculares inusuales, forman la clase Molicutes ("molli" - suave; "cute" - piel). Aunque superficialmente similares a las bacterias con pared celular "en forma de L", las cuales han perdido parte o toda su pared celular, los molicutes son taxonómicamente distintos. En un inicio, los investigadores propusieron que los molicutes eran microbios posiblemente los descendientes de bacterias que existieron antes del desarrollo de una pared celular de peptidoglicano. Sin embargo, análisis moleculares posteriores mostraron claramente que los molicutes provenían de antecesores bacterianos Gram positivos con pared celular. El grupo comprende a los organismos celulares autoreplicantes más pequeños y simples, con un diámetro de entre 0.3 y 1.2 µm, y genomas correspondientemente pequeños (108 -109 daltons). 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.



**Figura 6**. Fotomicrografía electrónica de transmisión de espiroplasmas, en el floema de una planta de maiz infectada.

Photograph courtesy: R. E. Davis, USDA-ARS, Beltsville, MD

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).

Grupo	Subgrupos	Especie
	1, 2, 3	S. citri, S. melliferum, S. kunkelli
	4, 5	
I	6	S. insolitum
	7	
	8	S. phoeiceum
II		'
III		S. florícola
IV		S. Apis
V		S. mirum
VI		S. ixodetis
VII		S. monobiae
\ ////	1, 2	S. syrphidicola, S. chrysipicola
VIII	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		

Cuadro 2. Clasificación de espiroplasmas en grupos y subgrupos

#### 4.3.4 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 fuel 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 mas a explicar la interacción entre las plantas y los patógenos, por ejemplo, conocer cuales 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. 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. Ésto 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 ó 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 ella, 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 24 las muestras originales para visualizar por microscopía el tipo de bacteria que corresponde a los genes en cuestión, de preferencia en microscopios confocales. 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 procariotes 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.

#### 4.3.5 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 et al., 2001). Esta reducción ha llegado a ser tan extrema que algunas cepas de Buchnera aphidicola presentan un genoma de 450 Kb (Gil et al., 2002), mientras que el de Ca. Carsonella ruddii es de 160 KB, siendo este el genoma más pequeño conocido hasta el momento (Tamames y col, 2007).

# 4.4 Importancia de insectos vectores de fitopatógenos

Los insectos son los más cosmopolitas, polífagos y variados organismos vivos en la tierra, y muchas especies están involucradas en algún tipo de asociación simbiótica con microorganismos, principalmente bacterias (Buchner P. 1965; N.A Moran 2006). Algunos insectos asociados con bacterias que transmiten enfermedades importantes en los cultivos agricolas, incrementan en gran relevancia estas interacciones simbióticas. La amplia distribución de insectos

puede, de hecho, ser en relación con las asociaciones bacterianas que permiten a los insectos explotar diferentes fuentes de nutrición.

#### 4.5 Bactericera 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 et al., 1964; Kaloostian y Jones, 1968; Harris, 1980; Kaloostian, 1980; Kawakita et al., 2000; Palermo et al., 2001; Pilkington et al., 2004). Fué descrito originalmente como Trioza cockerelli por Sulc en 1909 con especímenes colectados sobre plantas de chile en Boulder, Colorado (Sulc 1909) y se reportó como plaga de importancia económica en varias regiones de Estados Unidos desde 1900 (Pletsch 1947). Se piensa que es originario de Norteamerica donde se identificaron dos biotipos, el nativo y el invasor (Liu et al., 2006 a), y se reporta que este último es menos susceptible a algunos insecticidas comparado con el biotipo nativo (Liu y Trumble 2007). Por otro lado, Pletsch (1947) lo reportó en México en las primeras décadas de 1900. No obstante, este insecto se registró como problema serio hasta la década de los ochenta en los cultivos papa y tomate, y mas recientemente en tomatillo y chile (Garzon et al., 1992, Leyva-Lopez et al.,2002, Garcia 2007).

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 es actualmente uno de los insectos plaga de mayor importancia en papa, tomate y chile, en México y en alguna regiones de Estados Unidos de America (Garzón 2002, Liu y Trumble 2007, Munyaneza et al., 2007). Causa daños directos sobre las plantas hospederas como extracción de savia, inyección de tóxinas por la alimentación de las ninfas (Carter 1939, Cranshaw 2007), y la secreción de mielecilla y en consecuencia el crecimiento de hongos (fumaginas ) los cuales obstruyen el proceso de fotosíntesis (Essig 1917, Hoy y Nguyen 2001, Hodkinson, 2009). No obstante, la razón principal que este insecto es de importancia económica se debe a los daños indirectos con la transmisión de enfermedades (Richards 1928, Leyva-Lopez et al., 2002, Hansen et al., 2008, Liefting et al., 2008, Crosslin et al., 2009).

#### 4.5.1 Bionomia de Bactericera cockerelli Sulc

El psílido de la papa es un insecto migratorio que no sobrevive a los inviernos en las Grandes Llanuras de los Estados Unidos sin refugio artificial, particularmente los Altos Llanos ubicados en Nebraska, Colorado, Kansas y Dakota del Sur. La temperatura es un factor crítico en brotes de este insecto pues no toleran altas temperaturas, prefiriendo 26°C. Se ha mostrado alta mortalidad en huevos y ninfas a una exposición continua por 2 horas a 38°C, mientras que temperaturas mayores a 30°C reducirán o cesarán la ovoposición, incubación y supervivencia de ninfa (Abdullah, 2008). En el sur de México y Centroamérica, no puede sobrevivir

a temperaturas de verano por lo que migra al norte por los Grandes Llanos y la costa occidental. Es capaz de sobrevivir un año al sur de Texas y Norte de México donde las temperaturas son óptimas y el alimento está disponible continuamente. El hábito característico, sin embargo, ha sido la migración hacia el norte durante la primavera y el verano, y su dispersión es facilitada enormemente por el viento que le permite ser llevado a grandes distancias (Abernathy, 1991; Knowlton and Janes, 1931). El ciclo de desarrollo de B. cockerelli consiste en tres etapas: huevo, ninfa y adulto. De acuerdo con Abdullah (2008), el período de pre-cópula de B. cockerelli varía de 3.8 - 5 días, el período de pre-ovoposición va desde 5.9 a 8.0 días. El período de incubación para la etapa de huevo es de 6.7 días (5.7 - 8.2 días), con un período ninfal de 21.9 (19.1 - 23.8 días) teniendo un período total de desarrollo en promedio de 28 días. La supervivencia de huevos, ninfa y el total (todas las etapas) es de 62.7, 47.3 y el 40.6 %, respectivamente. El ciclo de vida completo a 26 °C requiere 35 días. En lo que respecta a la fecundidad, la hembra puede poner 230 huevos, viviendo la hembra un promedio de 45 días, mientras que el macho solo 22 días (Abdullah, 2008)



**Figura 7.** Huevecillos y ninfas de *Bactericera cockerelli* Fuente:http://ceventura.ucdavis.edu/Vegetable\_Crops/Tomato\_Psyllid.htm

La etapa adulta de B. cockerelli es parecida a una chicharrita y mide aproximadamente 3 mm de largo y mantienen sus alas en forma de techo sobre su cuerpo. Poseen una coloración verde los dos primeros días para posteriormente cambiar a una tonalidad negra con marcas color blanco, una franja paralela sobre el primer segmento abdominal y otra marca en forma de "Y" invertida cerca de la orilla del abdomen. El fémur de las patas posteriores se encuentra agrandado lo que les permite saltar al ser molestados. En general son muy activos por lo que se les conoce también como pulgón saltador (Mena, 2004). Los huevos son de color amarillo-naranja de forma ovoide que se encuentran suspendidos individualmente de filamentos delgados por lo regular a lo largo de los márgenes de la hoja apareciendo al final de tallos cortos (Mena, 2004). Las ninfas, además del adulto son la forma perjudicial de este insecto. Son diminutas de color café claro cambiando posteriormente a verde pálido a medida que crecen, son planas, oblongas o redondas. Pasa por cinco estadios ninfales y pueden encontrarse en el envés de las hojas (Mena, 2004).



Figura 8. Adulto de Bactericera cockerelli Sulc

Fuente: http://weslaco.tamu.edu/research-programs/entomology/

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 7) o los adultos (Figura 8) 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 et al., 2002, 2005).

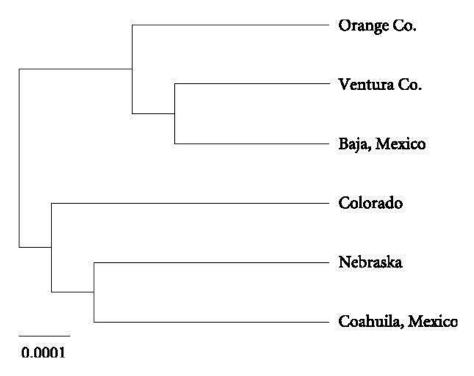
Recientemente el género ha sido reasignado como *Bactericera* y ha sido ubicado como miembro de la familia Triozidae, superfamilia Psilloidea, suborden Homóptera, orden Hemíptera (Bújanos *et al.*, 2005). En México se documentó la presencia del "salerillo", *Bactericera* (=*Paratrioza*) *cockerelli* (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, 2002).

# 4.5.2 Variación genética en Bactericera cockerelli

Romney (1939) indicó que este insecto desarrolló grandes poblaciones con migraciones primaverales en el sur de Arizona de Enero a Mayo sobre plantas silvestres del género Lycium. Típicamente, B. cockerelli luego migró a Colorado, Nebraska y otros estados del norte. Pletsch (1947) después indicó que el origen anual de las poblaciones ocurrió en el sur de Texas (cerca del Río Grande) o incluso de México que posteriormente migraron a Arizona y Nuevo México. Sin embargo, a partir del 2001 comienzan a presentarse brotes al sur de California, zonas donde infestaciones de este insecto son históricamente raras. Estos antecedentes llevaron a investigaciones que tenían por finalidad el determinar si estos nuevos brotes eran el resultado de un simple rango de expansión en su distribución o la evolución de un nuevo biotipo de B. cockerelli. Esto fue posible utilizando secuencias repetidas de marcadores (ISSR) así como las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), un espaciador interno transcrito (ITS2) y del gen wsp (Liu et al. 2006) el cual codifica para una proteína de superficie que ha sido utilizado en la caracterización de diferentes líneas del endosimbionte Wolbachia, (Van Meer et al. 1999) cuyo árbol filogenético derivado de ADN ribosomal 16S-23S concuerda con el filograma derivado del hospedero B.

cockerelli, demostrando una coespeciación de los endosimbiontes con sus hospederos (Thao et al. 2001). Para ello se estudiaron poblaciones de B. cockerelli provenientes de California, Colorado y 11 Nebraska, EUA, así como Baja California y Coahuila, México. Encontrando que las poblaciones de estudio se encuentran divididas en dos grupos (Figura 5), uno formado por las poblaciones del centro de Estados Unidos y este de México y el otro formado por el oeste de Norte América. Con ello, corroboraron su hipótesis inicial que establecía que los nuevos brotes en la parte oeste de Estados Unidos de América corresponden a un nuevo biotipo el cual tiene sus orígenes en Baja California, México. Dicho trabajo confirma también las migraciones de B. cockerelli, al agruparse las poblaciones del este de México y centro de EUA. En un estudio posterior Jackson et al. (2009) demostraron mediante el uso de marcadores ISSR la cercanía genética entre B. cockerelli de Coahuila, México y Texas, EUA, evidenciando con ello las migraciones que este insecto realiza al norte entrada la primavera, así como las diferencias genéticas estadísticamente significativas entre dichas poblaciones y B. cockerelli de Guatemala.



**Figura 9.** Dendrograma de poblaciones de *B. cockerelli* basado en marcadores genéticos (Liu *et al.* 2006)

# 4.5.3 Haplotipos de Bactericera cockerelli Sulc

Las diferencias sutiles entre diferentes poblaciones de una especie de insectos, como preferencia de alimentación, resistencias o el comportamiento de apareamiento, se pueden aislar poblaciones creando un biotipo único (Diehl and Bush 1984). En los últimos años se han descrito diferentes haplotipos del psílido de la papa por las variaciones genómicas estables del gen CO1, con marcadores moleculares ISSR (Inter simple sequence repeats) y el gen de *Wolbachia wsp.* Estudios realizados con el psílido de la papa del gen citocromo B ha sido identificado el polimorfismo de un solo nucleótido, indicando que el gen CO1 es el mejor objetivo disponible para la diferenciación genética (Powell *et al.* 2012). Usando la técnica de (High-resolution melting análisis-HRM) con el gen CO1, tres

haplotipos del psílido han sido reportados en los Estados Unidos. Los haplotipos han sido identificados por la regiones geográficas en las cuales se encontraron: Centro, Noroeste y Oeste. A la fecha el haplotipo del Noroeste ha sido encontrado solo en Idaho, Oregon y Washington (Swisher et al. 2012, 2013; K. D. Swisher dato no publicado). El haplotipo del Oeste ha sido encontrado desde Baja California, Sur de California y Nuevo mexico hasta Idaho, Oregon y Washington. El haplotipo central ha sido identificado en el Este de Mexico y desde Texas hasta Dakota del Norte y Wyoming (Liu et al. 2006; Chapman et al. 2012; Swisher et al. 2012, 2013). Comprendiendo la temporal y la dinámica población espacial de Bactericera cockerelli se puede proveer la infiltración dentro de los patrones de migración ó tendencias de hibernación, temporalmente los datos de haplotipos han sido usados para identificar cuanto tiempo la población de psílidos han existido en una región geográfica especifica(Swisher et al. 2013). Espacialmente los datos de haplotipos han sido utilizados para identificar regiones geográficas especificas donde una población unica de psílidos ha existido, asi como el territorio donde el psílido parece que se está expandiendo (Swisher et al. 2012, 2013). Como las enfermedades que están vinculadas con Bactericera cockerelli extendiéndose a diferentes países y continentes, conociendo los haplotipos del insecto que está presente puede ser crucial para comprender como el psílido se está movilizando hacia nuevas regiones. Por ejemplo, después de la introducción de Bactericera cockerelli en el interior de Nueva Zelanda, se cree que fue causado por importación de material ilegal a esa región. En las investigaciones se concluye que fué el haplotipo del Oeste (Thomas et al., 2011). Esta información sugiere que las plantas que se transportan ilegalmente probablemente vienen del Oeste de los estados Unidos y no del Este de México o area central de Estados Unidos. Usando high-resolution melting (HRM) y análisis de secuencias del DNA de una porción del gen mitocondrial CO1 de *Bactericera cockerelli*, los psílidos originarios de México, El Salvador, Honduras y Nicaragua fueron identificados con el haplotipo Central (Swisher *et al.*, 2013).

## 4.6 Daños directos e indirectos ocasionados por Bactericera cockerelli

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 tóxinas, 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 tóxina 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. En el caso de la enfermedad de los citricos o Huanlongbing el daño directo es causado por las ninfas y los adultos de Diaphorina citri al extraer grandes cantidades de savia de las hojas y peciólos, debilitando las plantas, introduciendo sustancias tóxicas en los tejidos causando amarillamiento en las hojas donde se encuentran alimentandose; impidiendo la óptima producción fotosintética en la planta y debilitando aún más su crecimiento. Sin embargo, esa "tóxina" nunca ha sido aislada y el desorden metabólico pudiera ser debido a la posible presencia de metabolitos producidos por las ninfas del insecto e introducidos por éste al momento de alimentarse(Richards y Blood, 1933; Rubio et al. 2006). Dicha enfermedad es reportada como amarillamiento del psílido "psyllid yellows". La saliva del insecto contiene peroxidasas, β-glucosidasas, y otras enzimas potenciales que generan una señal (Miles,1999) que parece inducir la transcripción de genes asociados con la producción de ácido salicílico o jasmónico, (Miles, 1999) así como la transcripción de genes relacionados con el estrés (Moran y Thompson, 2001). El grado del daño depende de la cantidad de tóxina, relacionada con la infestación del insecto y la etapa de crecimiento de la planta. Estudios previos revelan que al menos 30 ninfas del psílido por planta pueden causarle los síntomas (Blood et al. 1933), mientras que Carter (1950) indica que los síntomas pueden ocurrir sobre plantas alimentadas de una sola ninfa. Los síntomas tóxicos aparecen al cabo de cuatro a seis días después de la inyección en una infestación alta pero por lo general esto toma de dos a tres semanas. Cuando la planta es joven, aun encrecimiento, esta será atrofiada y clorótica. Los entrenudos serán más cortos causando un aspecto de roseta, mientras que los nudos espesarán. En ocasiones, tubérculos aéreos aparecerán en nodos. Los efectos fitotóxicos del insecto sobre el floema varían debido a la poca difusión de la tóxina y la destrucción localizada de la clorofila, provocando malformaciones de tejido como el rizar de la hoja (Chapman, 1985). Sin embargo, el daño causado por este psílido es uno de los pocos casos donde los efectos tóxicos son sistémicos y la planta entera es afectada (Carter, 1939).

El mayor daño o impacto económico de *Bactericera cockerelli* es indirecto, el que se deriva de la transmisión del permanente del tomate. La principal enfermedad de la papa es la punta morada, originalmente descrita en Estados Unidos y transmitida por chicharritas. A una enfermedad similar en papa observada en México, se le asignó el mismo nombre y estudios moleculares del ADN concluyeron que es causada por un fitoplasma del grupo del Aster yellows (Leyva-López y col, 2002) y que a diferencia de los reportes de Estados Unidos, en México la punta morada de la papa parecer ser transmitida por *B. cockerelli* y no por chicharritas (Garzón, 2002, Garzón *et al.*, 2005; Salas-Marina, 2006).

Estudios recientes han mostrado que una nueva especie de una bacteria no cultivable denominada *Candidatus Liberibacter solanacearum (psyllaurous)*, es responsable de la enfermedad "Permanente del tomate" y "Punta morada de la

papa manchado del tubérculo" (Zebra Chip) (Munyaneza et al., 2007 y 2009) y es transmitida por *Bactericera cockerelli* (Garzón *et al.*, 2009).

Estudios recientes han mostrado que una nueva especie de la bacteria responsable de la enfermedad Huanglongbing (HBL) en los cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, es transmitida por *Diaphorina citri*. Que ataca principalmente a las rutáceas , causando pérdidas económicas importantes en todas las regiones citricolas del mundo.

Se han detectado las enfermedades causadas por hongos como tizón tardío (*Phytophthora infestans Mont de Bary*) ó la pudrición blanca de fruto (*Botrytís cinerea Pers.*), asi como daños causados por cenicillas o por bacterias como el cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*). Finalmente, se presentan las enfermedades causadas por virus transmitidos por áfidos, trips y mosquita blanca, o por agentes infecciosos transmitidos por Paratrioza

#### 4.7 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 clorósis 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). La enfermedad del PT, desde 1986 fue asociada al psílido *Bactericera* (*Paratrioza*) cockerelli como su vector (Becerra, 1989). Este insécto ocasiona daños directos a la planta al succionar la savia (Munyaneza et al., 2007) e indirectos al transmitir fitoplasmas (Garzón et al., 2004) ó 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 et al., 2002, 2005; Munyaneza et al., 2009).



**Figura 10.** Sintomas del permanente del Tomate A)Planta con decaimiento. B) Hojas enrolladas hacia arriba. C) Aborto de flor. D) Sobrebrotación de yemas axilares.

Fuente : Jose antonio Garzón Tiznado,"Situacion de la paratrioza mosquita blanca y otros vectores de virus y patogenos", 2004.

La etiología de esta enfermedad no es muy clara, ya que observaciones al microscópio electrónico, describen la presencia de cuerpos pleomórficos en el floema de plantas enfermas; sin embargo, el análisis de alineamiento de secuencias de los productos amplificados del gen 16S rRNA, de éstas plantas, presentó sólo 80% de similaridad con fitoplasmas, lo cual no es un elemento para indicar su relación con este tipo de patógenos (Lee, com. pers.); no obstante, con algunas bacterias no cultivables su similaridad fué mayor al 98%, de ahí que se haya decidido denominarlas temporalmente como "organismo tipo bacteria no cultivable".

Este patógeno se ha asociado al insecto *Bactericera cockerelli* en plantaciones de tomate donde la enfermedad está presente (Becerra-Flora, 1986 y Garzón *et al.*, 2005) y consistentemente se ha mencionado que *B. cockerelli* es inductor de una enfermedad no contagiosa conocida como "amarillamiento de la papa", la cual se describe como un producto de la tóxina secretada por las ninfas durante el proceso de alimentación en las plantas (Richards y Blood, 1933). *B. cockerelli* pertenece a la familia Psylloidea, que junto con la familia Cicadellidea y Fulgoridea, se han descrito como vectores de procariotes (Jensen *et al.*, 1964; Kaloostian y Jones, 1968; Harris, 1980; Kaloostian, 1980; Kummert y Rufflard, 1997; Kawakita *et al.*, 2000; Palermo *et al.*, 2001; Pilkington *et al.*, 2004).

La distribución del psílido 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)

## 4.8 Importancia y tipos de transmisión de patógenos por insectos

La transmisión por vectores de patógenos de plantas es un fenómeno muy específico en el que están implicados agentes biológicos que interaccionan específicamente con el vector. Sin embargo, a pesar de la importancia que tiene este mecanismo en la dispersión de los patogenos de plantas en la naturaleza, los

determinantes y mecanismos por los que vectores específicos son capaces de correspondientes patógenos distintas propagar sus entre plantas comprendidos parcialmente. Los conceptos básicos describir para las interacciones entre virus y vector fueron por primera vez introducidos por Watson y Roberts en 1939 (Watson & Roberts, 1939) quienes acuñaron los términos de transmisión "no persistente" y "persistente" que hacían referencia al tiempo que el vector era capaz de transmitir un patógeno tras su adquisición.

La transmisión de fitopatógenos por insectos es la forma más importante de diseminación de patógenos en la naturaleza, este modo de transmisión genera un alto grado de dependencia entre el hospedante y el simbionte (Douglas 1996, Wernegreen 2002), incluyendo insectos del orden Hemiptera los que se han reconocido como vectores por un tiempo más largo. En el Orden Hemiptera se han registrado insectos vectores en las Familias: Aphididae, Cicadellidae, Delphacidae, Pseudococcidae, Aleyrodidae, Psyllidae y Membracidae. El mayor número de virus transmitidos por insectos chupadores se encuentra entre los áfidos ó pulgones y le siguen en importancia los saltahojas, las moscas blancas y los saltones de plantas. Al entrar a considerar la transmisión de patógenos por insectos es importante resaltar las relaciones que existen entre los patógenos y sus insectos vectores. Este no es un proceso accidental, es biológico, con estrechas relaciones entre el patógeno y el vector. Los fitopatógenos, las plantas y sus vectores han evolucionado juntos por más de 200,000.000 años.

En un estudio de psílidos alimentándose de plantas de naranja infectada con Candidatus Liberibacter asiaticus , fué posible detectar Ca. L. asiaticus en extracciones de psílidos individuales conteniendo mas de 25 psílidos examinados por PCR convencional de un fragmento de 226 pares de bases entre tufB y sec E genes (Hung, T.H, Hung, S.C., Chen,C.N, Hsu,M.H., y Su, H.J. 2004). *Ca. L. asiaticus* fue detectable de ninfas individuales del 3 er instar al 5 to instar respectivamente. La transmisión transovárica de *Ca. L. asiaticus* no fué detectada en el vector *Diaphorina* citri (Xu, C.F. Li,K.B y Ke. C. 1988), pero ha sido reportado al menos un reporte que esta ocurriendo en *Trioza* erytrae (Van Den Berg *et al.*,1992).

En estudios anteriores con plantas de cítricos se demostró que un pequeño numero de psílidos en este *caso D. citri* puede pasar transováricamente la bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* inmediatamente después de emerger como adultos inoculando a plantas sanas, si estos nacieron de una hembra portadora de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Stelinski *et al.*, 2010).

La evidencia de transmisión transovarica del *Tomato Yellow Leaf Virus* (TYLV) en mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), se confirmó que el insecto transmite el virus de una manera circular y persistente ; llegando a determinar la presencia de DNA del TYLV en la progenie , tanto en huevecillos como en ninfas y hasta en adultos; esta generación es capaz de inocular el virus en plantas sanas y producir los síntomas típicos de la enfermedad, de ahí que el TYLV, puede ser transmitido a través del huevecillo por al menos dos generaciones de insectos. Aún en la ausencia de plantas hospederas disponibles; la mosquita blanca puede servir como reservorio del virus entre las etapas de crecimiento del cultivo ( Ghanim *et al.*, 1997 ). Existen reportes de transmisiones verticales por artropodos como: el

Fitoplasma de la hoja blanca de la caña por *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Huanboonsong *et al.*, 2002), Fitoplasma enanismo de la mora por el vector *Hishimonoides sellatiformis* (Kawakita *et al.*, 2000), y por los psilidos *Cacopsylla melanoneura y Cacopsylla pruni* causando daños importantes en los cultivos de la pera en el centro de Europa transmitiendo los patogenos *Ca. fitoplasma mali* y *Ca. fitoplasma prunorum* (Tedeschi *et al.*, 2006). En el campo de la veterinaria se presentan enfermedades por insectos que son altamente importantes por la gran pérdida de ganado como es el caso de Babeasis (Piroplasmosis) enfermedad producida por el protozoo intraeritrocito *Babesia* que se transmite por picadura de garrapatas infestadas. Las *Babesias* se introducen en el vector por picadura a un animal enfermo, allí se multiplican y pasan a las glándulas salivales, el germen se transmite a los huevos de la garrapata (infección vertical), (Fidel Hernandez Rubio, 1997).

## 4.8.1 Transmision de patógenos en forma transovárica

## 4.8.2 Transmisión de Fitoplasmas

Aunque los patógenos de plantas y simbiontes procariotas pueden ser transmitidos en forma transovárica, en el caso de los fitoplasmas no se pensaba que se transmitian directamente del vector hembra a la progenie. Sin embargo, en años recientes, varios estudios han reportado instancias de transmisión transovárica de fitoplasmas. En *Scaphoideus titanus Ball* (un vector del GY en Europa) hembras infectadas fueron introducidas sobre plantas sanas para ovipositar; ninfas y adultos transferidos en plantas sanas, resultaron infectados y

transmitido el fitoplasma (Alma et al., 1997). Kawakita et al. (2000) observó por micróscopia electrónica el fitoplasma en los ovarios y otros tejidos de un saltahojas (Hishimonoides sellatiformis Ishihara) y confirmó su presencia por PCR. Se encontró tambien fitoplasmas en huevecillos expuestos sobre hojas de la mora de saltahojas adultos infectados y del ninfas del primer instar provenientes de ésos huevecillos. Mitsuhashi et al., (2002) encontró Wolbachia coexistiendo en todos los tejidos con el fitoplasma, sugiriendo que éste procarionte puede estar asociado con la infección del fitoplasma. Individuos infectados de Matsumuratettix hiroglyphicus, Matsumura se ha estado criando hasta dos generaciones sobre tejidos de plantas de caña de azúcar libres de fitoplasmas (Hanboonsong et al., 2002). La presencia de Ca. Phytoplasma prunorum fue reciéntemente detectada en huevecillos de hembras infectadas del vector el psílido Cacopsylla pruni Scopoli sobre ramas de planta de ciruelo y subsecuentemente en ninfas y adultos recién emergidos. En éste caso las plantas donde los insectos fueron emergidos resultaron positivas analizadas por PCR anidado (Tedeschi et al., 2006).

#### 4.8.3 Transmisión de virus

La transmisión transovárica del arbovirus en flebotómos se ha sospechado ya que en repetidas ocasiones se han aislado ó detectado virus en flebotómos machos ( Veranie et al., 1988 ). Tesh y Modi en 1987, consiguieron transmitir experimentalmente el virus de la Toscana en trece generaciones consecutivas de *P. perniciosus* a lo largo de 23 meses sin que se apreciaran cambios biológicos en el virus tras los sucesivos pases. Las hembras infectadas transováricamente fueron capaces de trasmitir el agente infeccioso mediante picadura a animales

susceptibles. La infección cronica de P. perniciosus con el virus de la Toscana no afectó ala tasa de eclosión de insectos. Cuando se hacen emparejamientos aleatorios, la tasa de infección por V Tos en las siguientes generaciones va disminuyendo, lo que sugiere que el V Tos no puede mantenerse en la naturaleza entre la población de flebotómos exclusivamente mediante transmision transovarica (Tesh y Modi, 1987). Todos los tenuivirus son transmitidos por una o más especies de saltahojas de manera propagativa circulativa. Los vectores saltahojas pueden adquirir el virus despues de alimentarse con un minimo de 15 minutos a seis horas, y requieren un periodo de latencia de una a tres semanas antes de que puedan transmitir el virus y éstos pueden transmitir el virus toda su vida mientras que se alimenten de su hospedador en pocos minutos hasta unas cuantas horas. Todos los Tenuivirus excepto el rice grassy stunt virus, son transmitidos transováricamente de un treinta a un cien por ciento a la progenie del vector. (Agrios, 2005). Cabodevilla et al., demostró que la transmisión transovum de S. exigua nucleopoliedrovirus (SeMNPV) es una característica común en poblaciones de campo de S. exigua en España. En su estudio, un número de genotipos que se transmiten verticalmente, se aislaron y caracterizaron por su propiedades insecticidas. Entre ellos, el genotipo SeVTAI1 mostraron gran capacidad para inducir infecciones persistentes en comparación con otros genotipos asociados a la transmisión via horizontal, y la prevalencia de una infección encubierta inducida fue detectable hasta cinco generaciones después del establecimiento.

#### 4.8.4 Transmisión de Bacterias endosimbióticas

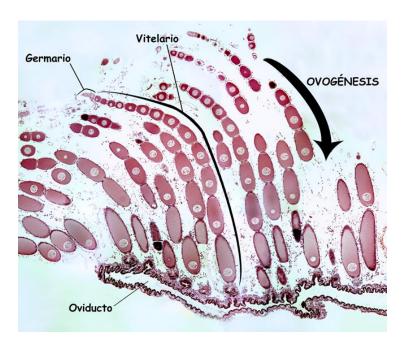
Los microorganismos simbióticos ocurren en el cuerpo de muchas especies de insectos (Buchner 1965; Douglas 1989; Moran y Telang 1998; Ishikawa 2003; Baumann 2005, 2006; Moran et al. 2008; Kikuchi 2009). La presencia de estos endosimbiontes en el cuerpo del insecto esta conectada con la dieta deficiente desequilibrada de algunos nutrientes esenciales, por ejemplo la savia del floema consumida por la mayoria de hemipteros es rica en carbohidratos pero pobre en aminoacidos. Las bacterias que se alojan en los intestinos del insecto se transmiten transovaricamente a la progenie (Schneider 1940; Buchner 1965; Kikuchi 2009). Pueden ser transmitidos de la madre a la nueva generación de tres maneras (1) por la contaminación de la superficie del huevecillo por la bacteria; (2) por alimentación del excremento puesto por los padres conteniendo la bacteria; (3) por la deposición de capsulas la cual contiene bacterias hacia el interior de la masa del huevecillo (Rosenkranz 1939; Fukatsu and Hosokawa 2002; Kuechler et al. 2010, 2011). Los simbiontes que viven en los bacteriocitos son transmitidos a la próxima generación de forma transovárica via citoplasma de la células germinales de la hembra (Buchner, 1965). Buchner 1965 observó que en algunos hemipteros los microorganismos simbióticos pueden vivir más de una especie dentro de su cuerpo. Los simbiontes que siempre están presentes en sus huéspedes y son necesarios para su supervivencia y reproducción son llamados endosimbiontes primarios (P-simbionte) por Buchner. Los simbiontes que solamente se encuentran en algunas poblaciones, Buchner los llamó endosimbiontes facultativos o endosimbiontes secundarios(S-simbiontes). Los P simbiontes se encuentran intracelularmente en bacteriocitos, mientras que los Ssimbiontes se alojan en ambas áreas intracelularmente ó extracelularmente

(células epiteliales) por ejemplo, libres en la hemolinfa ó en los tejidos grasos (Baumann 2005; Kikuchi2009). Los P-simbiontes son siempre transmitidos verticalmente heredados por transmisión transovárica, mientras que los S-simbiontes pueden ser transmitidos horizontalmente y transováricamente(Moran yTelang 1998; Fukatsu et al. 2000; Ishikawa 2003; Thao y Baumann 2004). Se cree que la simbiosis de insectos y los P-simbiontes son el resultado de infecciones antiguas (Baumann2006).

# 4.9 Transmisión de bacterias en ovogénesis de insectos

Las bacterias endosimbióticas colonizan el ovocito vitelogénico. En la mayoría de los artrópodos los ovarios consisten en un número discreto de ovariolas tubulares, incrementando cámaras de huevecillos en maduración extendidas desde el lado anterior y posterior de las ovariolas. Las células del tronco de la línea germinal están localizadas en la parte anterior de la ovariola, en una región llamada el germario. La cámara de huevecillos continua desarrollándose interiormente en la región del vitelo, donde el ovocito absorbe la yema desarrollando completamente huevecillos completos no fertilizados (Cummings et al., 1969). Usando microscopía inmunofluorescente se ha observado que algunas bacterias se acumulan en la región de las células epiteliales que está próxima al final posterior de la cámara de huevecillos, donde la actividad endocítica es muy alta. Se ha observado que las bacterias no están presentes en la línea germinal de la etapa temprana de ovulación del germario. Se ha reportado que las bacterias han sido encontradas ocupando la región abdominal de las hembras (Sakaguchi B. et al., 1961, Goto S. et al., 2006). Sin embargo, para lograr la transmisión transovárica

estas bacterias deben ser capaces de llegar a la línea germinal en etapas tardías en el proceso de la ovulación desde la hemolinfa. Las bacterias ingresan a la línea germinal sobre etapas específicas de la ovogénesis, colonizando la línea germinal durante la etapa de vitelogénesis en la ovulación (etapa 8 y 10), cuando la yema se incorpora dentro del ovocito. Las bacterias están presentes en el espacio extracelular entre las células del folículo . En el ovocito , las bacterias están localizadas en vesículas formadas en la endocitosis de la yema, también conocidas como gránulos de yema. Las imágenes de la transmisión de microscopía electrónica revelan que las bacterias se encuentran entre el espacio de los gránulos de la yema y rodeando la membrana vesicular, la cual consiste en un estudio previo de microscopia electrónica (Kiki Y. 1988). En imágenes de microscopía inmunofluorescente observa estas bacterias penetrando la se membrana vesicular rodeando los gránulos de la yema; Presumiblemente estas células abandonan los gránulos de yema y penetrando al citoplasma del ovocito. En resumen, este factor de infección indica que la ruta tomada por las bacterias interceptan la línea germinal involucrando la invasión de los ovarios, seguido por el pasaje entre las células del foliculo de la cámara de huevecillos vitelogénicos, la translocación cruza la membrana del ovocito dentro de las vesículas que se convierten en gránulos de yemas, y finalmente atraviesan las membranas vesiculares de la yema para internarse en el citoplasma del ovocito.



**Figura 11.** Corte de un ovario de *Locusta migratoria* teñido con hematoxilina-eosina. Las ovariolas muestran una disposición polarizada en relación al proceso de ovogénesis, con el germario en la región apical y el vitelario orientado hacia la región basal, desembocando en los oviductos.

Fuente: <a href="http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/practica3.htm">http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/practica3.htm</a>

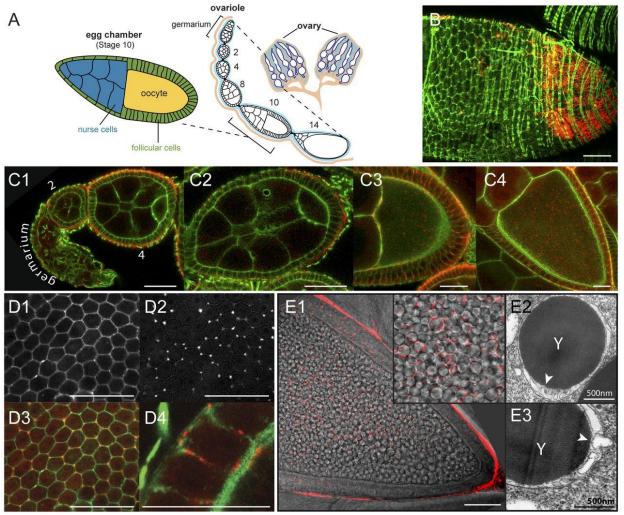


Figura 12.- Colonización de bacteria de la linea germinal. (A) Cuadro que muestra la estructura de una cámara de huevecillos, ovariolas y ovarios de Drosophila. La ovariola está rodeada por un epitelio muscular (azul claro). La cámara de huevecillos se desarrolla a lo largo de la longitud de las ovariolas, iniciando con la división celular en el tronco del germario. Etapa vitelogénica (10) de la cámara de huevecillos está caracterizada por una membrana externa de células del folículo (verde), un ovocito expandido(amarillo) y células germinales(azul). (B) Superficie exterior del vitelo etapa 10 de la camara de huevecillos, las bacterias estan teñidas de rojo. (C) Localización de las bacterias en series de cámara de huevecillos que representan la progresión desde el germario hasta el vitelo del ovocito. Germario, etapa 2 y 4 (C1); etapa 6(C2); etapa 9 (C3); etapa 10 (C4). (D) Pared celular teñidas de actina(D1) bacterias espiroplasmas (D2) son fusionadas (D3,D4) muestra bacterias atravesando las células del folículo. D1 y D3 son secciones transversales y D4 es una sección longitudinal. (E1) Imagen sobrepuesta de área flourescente de bacterias teñidas revela la localización de la bacteria con respecto a los gránulos de yema. En todas las imágenes microscópicas fluorescentes la escala de la barra representa 25µm. La micrografia electrónica muestra la localización del espiroplasma(flechas) en relación a los gránulos de yema (Y). En E1, las bacterias están contenidas entre los gránulos de yema y la membrana vesicular. En E2, las bacterias pueden ser vistas penetrando parcialmente la membrana vesicular. Fuente: Herren JK, Paredes JC, Schüpfer F, Lemaitre B. 2013. Vertical transmission of a Drosophila endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery. mBio 4(2):e00532-12. doi:10.1128/mBio.00532-12.

# 4.10 Diagnóstico de enfermedades de plantas

# 4.10.1 Métodos para la detección e identificación de organismos tipo bacterias no cultivables

En la actualidad, las técnicas moleculares han sido de una gran ayuda en la identificación y la caracterización taxonómica en general del grupo de fitopatógenos cultivables ó no cultivables garantizando una mayor sensibilidad y especificidad en la detección (López *et al.*, 2003). Dentro de estas técnicas se encuentran: hibridación de ADN-ADN, microarreglos ADN, PCR (Polymerase Chain Reaction), FISH (Fluorescence *in situ* hybridisation) y variantes de la técnica de PCR como Real- Time PCR, Co-PCR (cooperativa), PCR múltiple entre otras (López *et al.*, 2003; Álvarez, 2004).

Las metodologías que permiten ubicar taxonómicamente una bacteria en género y especie es la secuenciación de la región 16S ADNr y de las regiones intergénicas (ITS) 16S-23S del operón ADNr, ya que estas regiones genómicas son conservadas y constitutivas entre génerosbacterianos (Barry et al., 1991; Oliver et al., 2005). La región genómica de 16S rADN es fácil amplificarla y secuenciarla mediante el uso de primers universales (Weisburg et al., 1991); además el análisis de esta región está basado en la homología que existe entre géneros bacterianos reflejando una relación filogenética presumible (Oliver et al., 2005). En relación con lo anterior, Hauben et al., (1997) realizaron una comparación de esta región genómica de todas las especies de *Xanthomonas* donde observaron una similaridad de 98.2% entre ellas. La secuenciación de las regiones ITS 16S-23S de bacterias fitopatógenas ha sido útiles para también analizar relaciones filogenéticas entre bacterias ubicándolas en diferentes niveles taxonómicos (Barry et al., 1991) y ha sido adaptado en técnicas basados en PCR como RFLP

específicos de estas regiones intergénicas (Gonçalves y Rosato, 2000). Sin embargo, entre especies bacterianas podría existir una variabilidad entre estas regiones analizadas, por ello se debe escoger ITS altamente conservadas para observar homología entre especies (Gürtler y Stanisichi, 1996).

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 cuáles, 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 éste 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 ó 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).

- 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.

## 4.10.2 Sintomatologia

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 precóz 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.

#### 4.10.3 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 et al., 1995; Lee et al., 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 et al., 1997).

## 4.10.4 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 8), lo que corrobora la presencia del patógeno en la muestra analizada (Schneider et al., 997).

## 4.10.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction ó Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más

conocido: Tag polimerasa. Con éstos 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. Este proceso es consecuentemente repetido de 20 a 40 ciclos hasta producir el segmento de ADN deseado. 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 fué 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. 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. 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).

# 4.10.6 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 ó 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)

# **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 8.1 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.

#### 8.2 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.

## 8.3 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.

# 8.4 Área experimental

El lugar donde se llevaron a cabo los bioensayos fué en una cámara de crecimiento del laboratorio de fitopatología del centro de investigación Vilmorin, lnc. Integrando en cada uno de los ensayos jaulas entomológicas cubiertas con

organza especiales para psílidos con mangas para el manejo de plantas e insectos respectivamente. Se mantuvo temperatura óptima para el desarrollo de la colonia en laboratorio de 25 grados centígrados en promedio para la supervivencia de insectos.

#### 8.5 Materiales de laboratorio

Todos los materiales que se usaron durante los bioensayos específicos de transmisión de *CLso* en Paratrioza, requiere el uso indispensable de un estereoscópio para observar y cuantificar huevecillos, ninfas y adultos presentes en hojas de plantas de tomate, pinceles de pelo de camello para aislar huevecillos del tejido vegetal transferiendo en ethanol al 70 % para su conservación y depositados en tubos eppendorff, asi como adultos y ninfas de cada instar, para su posterior extracción de ADN y análisis molecular. Se usaron jaulas entomológicas cubiertas de organza a prueba de insectos para transferir plantas e insectos en los ensayos.

#### 8.6 Establecimiento de la fuente de inóculo

De plantas cultivadas en invernadero con síntomas del Permanente del tomate de la malla principal de Paratrioza localizada en Vilmorin Inc. Al momento de observar abundante población de plantas con síntomas muy severos del Permanente del tomate se colectaron adultos de *Bactericera cockerelli* con un succionador entomológico y con un pincel se recolectaron ninfas del 4 to y 5 to instar para su desarrollo en la nueva colonia de insectos.

#### 8.7 Colonia de insectos en laboratorio

Con la finalidad de probar la transmisión del patógeno se estableció una colonia de psílidos en laboratorio, como fuente de experimentación y análisis, para los posteriores bioensayos de transmisión. Las plantas de tomate fueron sustituidas por otras nuevas ya que altas poblaciones de ninfas causaron marchitez debido a su efecto toxinífero en plantas jóvenes. Se utilizaron plantas sanas de tomate de la variedad Pony express® en la colonia de los insectos como fuente de alimentación mantenidas a temperatura de ± 25 grados centigrados con fotoperiodo de 12 hrs. y 12 hrs. de oscuridad.

## 8.8 Experimentos de transmisión transovárica

## 8.8.1 Ensayo con huevecillos de *Bactericera cockerelli*

Después de la reproducción del insecto en la fuente de inóculo, con plantas enfermas de *C*Lso observadas conteniendo huevecillos, se procedió a aislar huevecillos de los foliólos con el uso de un estereoscópio y pinceles para su manejo. Se colectaron grupos de 30 hasta 50 huevecillos por muestra y se conservaron en ethanol al 70% para su posterior extracción de ADN y análisis por PCR.

## 8.8.2 Ensayo con ninfas y adultos de *Bactericera cockerelli*

Con el objetivo de detectar *CLso* en ninfas y adultos de la progenie de BC, se tomaron muestras de hoja conteniendo huevecillos de la fuente de inóculo para su obtención de huevecillos presentes en cada uno de los foliólos, las plantas de tomate usadas en cada experimento se analizaron por PCR para confirmar que estaban libres de *CLso* antes de cada ensayo. Antes de que se aislaran los

huevecillos adheridos a las hojas para su análisis por PCR, las hojas y los huevecillos fueron lavados con una solución de cloro al 10% por 5 minutos y luego 3 veces con agua destilada y esterilizada. Se establecieron 8 plantas sanas de tomate para adherir huevecillos sobre los foliólos para su eclosión y aparición de nuevas ninfas, los huevecillos fueron puestos en un número indeterminado debido a que estos rápidamente se deshidratan al no estar en contacto con las hojas por medio del pedicelo (Buckner et al., 2002), para conservar el micro clima de humedad en cada planta se cubrieron con vasos de plástico de un litro para conservar la humedad y supervivencia de los huevecillos, debido a que los huevecillos son muy susceptibles a la falta de humedad, se deshidratan al momento de permanecer aislados del pedicelo (Byrne et al., 1990). Al momento que aparecieron las primeras ninfas se mantuvieron en observación del desarrollo de cada instar y se procedió a retirarlas con un pincel, organizando las muestras en grupos de 20 para su conservación en cada tubo eppendorf. Una vez que se observaron los nuevos adultos emergidos de Bactericera cockerelli se retiraron y se conservaron en ethanol al 70 % y en refrigeración a – 4 °C para su análisis por PCR.



**Fig. 18.-** Huevecillos de *Bactericera cockerelli* en hojas de tomate. fuente: http://zebrachipscri.tamu.edu/image-gallery/vector-gallery/#thumb

### 8.8.3 Análisis de eficiencia de transmisión de CLso con un huevecillo

Con el objetivo de conocer la respuesta de planta sana de tomate a *Bactericera cockerelli* de transmitir la CLso, se condujo este experimento confinando un solo huevecillo por planta sana de tomate hasta su desarrollo óptimo de nuevo adulto emergido, alimentándose durante toda la fase de su desarrollo de la planta. Se determinó la capacidad que tiene un solo psílido de poder transmitir la bacteria en planta sana, se usó variedad de tomate: Pony express®. Se utilizaron 15 plantas por réplica realizándose 3 ensayos respectivos con un total de 45 plantas se plantaron en vasos de poliúretano de 1 litro y se regaron con agua fertilizada compuesta de calcio, potasio, fósforo con una concentración de 0.5 grs c/u por

20 litros de agua cada 3 dias y se mantuvieron en cuarto de crecimiento con una temperatura de ±25 C y HR ± 60. Se mantuvieron en observación los huevecillos hasta su eclosión y aparición de ninfas, se monitoreó cada 24 horas la supervivencia de estos organismos y si alguna ninfa perecia, de nuevo se confinaban más huevecillos hasta que aparecían las ninfas dejando solo una en el foliólo. Debido a que las plantas estaban en la etapa de plántula en el orden de la tercera hoja verdadera las ninfas presentes se protegieron con un vaso transparente sellado en los extremos con malla de organza para mantener al insecto con ventilación dentro de ese hábitat hasta su desarrollo en nuevo adulto, permaneciendo el adulto alimentándose por 18 a 20 dias, y manteniendo en observación el adulto hasta el fin de su ciclo biológico.

## 8.9 Extracción de ADN para insectos

La extracción de ADN para insectos se realizó acorde a la metodología descrita por Doyle-Doyle (1990) con algunas técnicas modificadas que consisten en :

1. Se maceraron 1 a 2 g de tejido en mortero con 2 mL de buffer de extracción (Tris-HCI 100mM pH7, CTAB 2%, EDTA 20mM, NaCl 1.4 M y 0.2% de β-mercaptoetanol) caliente a 65°C, se transfirieron 500μL a tubos de 1.5 ml. se incubaron a 65 °C por 30 minutos, se agregaron 100μL de acetato de amonio a 10 M y se incubó en hielo por 10 minutos, se agregó solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y se agitó en vórtex , se centrifugó a 12000 rpm. por 10 minutos, se recupera la fase acuosa en tubos de 1.5 ml. y se adiciona 2/3 del volumen de isopropanol frio y se mezcla suavemente, se

precipitó por 1 hora a - 20°C y se centrifuga a 12000 rpm. durante 10 minutos y se decanta en isopropanol, se hicieron dos lavados con ethanol al 70 %(v/v) frio. Se dejó secar el ADN y se resuspende en agua desionizada estéril (o agua inyectable). El ADN obtenido se observa mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con Gel Red.

## 8.10 Extracción de ADN para planta de tomate

La extracción de ADN se realizó acorde a la métodología descrito por Dellaporta y col (1983) y Almeida-León (2001). Se maceraron 1.0mg de tejido en 3,0 mL de solución Dellaporta (Tris 100 mM. Ph 8.0, EDTA 50mM, NaCl 500 mM, ßmercaptoetanol 10 mM., se añadieron 120 µL de CTAB al 20% y se incubó la mezcla en un baño maría con temperatura de 60°C durante 20 min., posteriormente se resuspendió el macerado por inversión en 300 µL de SDS al 20% y la mezcla de reacción se pone de nuevo en baño maría bajo las mismas condiciones, pasado el tiempo de incubación se añadieron 1.5 mL de acetato de potasio 5 M, se incubó en hielo por 20 min, se centrifuga a 12 000 rpm durante 10 min., el sobrenadante se mezcla con un volumen de alcohol isopropílico frío y se guarda a -20°C durante 30 min., los ácidos nucleicos se recuperan por centrifugación a 12 000 rpm durante 10 min.. El ADN obtenido se resuspende en 100-300 µL de agua destilada estéril y se almacenó a 4 °C para su posterior análisis molecular. Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio de la Escuela de Ciencias Quimicas y Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa con la asesoría del Dr. José Antonio Garzón y IBQ. Claudia Melgoza.

## 8.11. Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Las muestras de ADN de plantas e insectos fueron analizadas por PCR para detectar la presencia de "CLso". Se realizó la técnica de PCR convencional (cPCR) los ensayos fueron conducidos simultáneamente utilizando dos juegos de primers OA2/OI2cD (5´-GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA-3´y OA2/O12cF 5´-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'), los cuales amplifican la región ribosomal 16S rADN de Candidatus Liberibacter solanacearum (Jagoueix et al. 1996; Liefting et al. 2008, 2009a; Li et al. 2009, Munyaneza, 2009) en un volumen de reacción de 25 µL que contenía, 2 µl de Buffer PCR, 1.5 mM de MgCl2, 0.2 mM de DNTP, 1U de Tag polimerasa, 50 ng de ADN y 20 pM de cada primer. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca "Touchgene Gradiente". programado con una temperatura de predesnaturalización de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 15 segundos, alineamiento de 30 segundos a 55 °C y una polimerización de 1 minuto a 72 °C con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador en tiempo real marca TFSTEPONE RT PCR (Applied Biosystems 850 Lincoln Centre Drive Foster City, CA 94404 USA).

#### VII. RESULTADOS

## 9.1 Área experimental

La colonia de *Bactericera cokerelli* Sulc. se estableció satisfactoriamente, ya que se detectaron los estadios correspondientes al ciclo biológico del psilido ( huevecillos, ninfas, exuvias y nuevos adultos en hojas). En la misma área de la cámara de crecimiento se observaron plantas con síntomas del permanente del tomate, algunas se intercambiaban por nuevas plantas debido al efecto toxinifero de las ninfas, obteniendose una aceptable distribución de *C*Lso que se reflejó en una incidencia de la enfermedad en un 80% en los psilidos, según Munyaneza *et al.*,2013, de acuerdo al envio de psilidos de la colonia a esa dependencia de la USDA.

#### 9.2 Establecimiento de la colonia

Los insectos se establecieron en plantas de tomate tipo Pony express sobre jaulas entomológicas cubiertas de organza para su ventilación y luz, con una temperatura promedio de 25 °C, humedad relativa del 70 a 80 y 12 horas luz por 12 de sombra, lográndose una reproducción masiva de *Bactericera cockerelli* en los quince días posteriores.

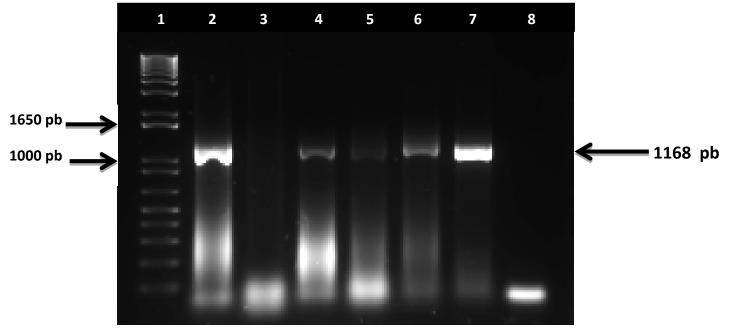
#### 9.3 Fuente de inóculo

La metodología de obtención de psílidos procedentes de plantas enfermas de campos agrícolas funcionó, ya que se logró transmitir el patógeno a las plantas que se tenían como fuente de inóculo, comprobando la presencia del patógeno en

las plantas por el método de PCR. Los primeros síntomas se observaron a los 18 dias después de liberar los insectos en plantas.

### 9.4 Detección de Candidatus Liberibacter solanacearum

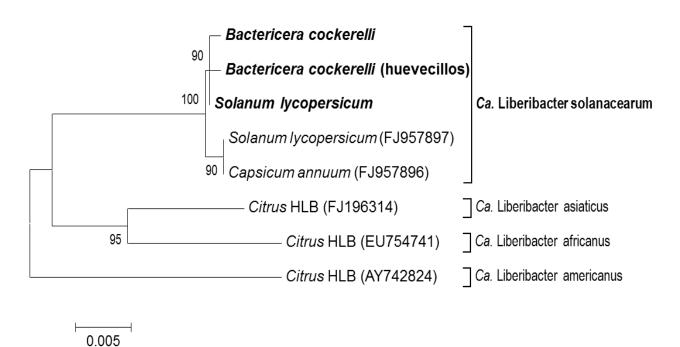
La amplificación de ADN de *Candidatus* Liberibacter solanacearum, en psílidos, plantas de tomate como fuente de inóculo asi como en los estadios de *Bactericera cockerelli*, fué positiva de acuerdo con los análisis por PCR de la colonia de insectos con un porcentaje del 80% de presencia del patógeno en la fuente de inóculo, lo que implica que todo el procedimiento fue adecuado, y por lo mismo se recomienda para trabajos futuros.



**Figura 15.** Gel de agarosa de productos de PCR en detección de *C*Lso : Carriles 1= Marcador molecular, 2= Control positivo, 3= Control negativo, 4= Huevecillos, 5= Ninfas, 6= Adultos de *Bactericera cockerelli*, 7= Planta de tomate con *C*Lso, 8= Control negativo (Planta sana de tomate).

## 9.5 Secuenciación y análisis filogenético

El producto de PCR de plantas sintomáticas y *Bactericera cockerelli* Sulc. se mandaron secuenciar a Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO). Se secuenció la región 16S rADN en un secuenciador automatizado. Las secuencias fueron comparadas y depositadas en la base de datos de GenBank, utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>). La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en el GenBank para *Candidatus* Liberibacter indicó un 99% de similitud entre las secuencias FJ957897, FJ957896, FJ196314, EU754741, AY742824. Estas secuencias se usaron para realizar un análisis filogenético entre las diferentes especies de *Candidatus* Liberibacter en la fig.16, en este árbol se puede observar que las secuencias en este estudio son muy similares a otras secuencias de *C*Lso depositadas previamente en el banco de genes del NCBI, por lo que se encuentran agrupadas en el mismo ramal.



**Figura 16.** Arbol filogenético de la región 16S rADN de las bacterias del género "Candidatus Liberibacter", grupo alfaproteobacteria.

## 9.6 Frecuencia de infección en psílidos por CLso

La frecuencia de infección en *Bactericera cockerelli* desde huevecillos hasta adultos sobre planta sana de tomate fueron realizadas individualmente por cPCR. Un análisis de porcentaje de infección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en muestras de huevecillos, ninfas y nuevos adultos se realizaron para cada etapa de crecimiento del psílido. Los niveles de presencia de *CLso* se presentó en la etapa de huevecillo con un nivel de frecuencia del 100%. De acuerdo a los análisis individuales de huevecillos por PCR en tiempo real, amplificaron 250 copias por huevecillo de *Bactericera cockerelli*, comparadas con las amplificadas en la fuente de inóculo que resultaron en un valor medio de 60,000 copias, lo que implica un bajo rango de concentración de *CLso* en cada huevecillo, en ninfas de todos los instares hubo presencia de *CLso*, en la muestra de nuevos adultos se registró de presencia del patógeno en cuestión.

# 9.7 Eficiencia de transmisión de CLso con un huevecillo de Bactericera cockerelli en plantas de tomate

De 45 plantas de tomate sanas de tomate utilizadas en este bioensayo, con un huevecillo sobre el foliólo de la hojas de tomate, solo presentaron síntomas del permanente del tomate en 2 % de plantas que fueron inoculadas con un solo

psilido después de 18 dias de inoculación y se detectó por PCR a *C*Lso en estas mismas plantas de tomate. El resto de las plantas fueron negativas a *C*Lso.



**Figura 17.** Planta con sintomas del permanente del tomate, en el ensayo de eficiencia de transmision de CLso.



Figura 18. Planta de tomate sana (Testigo)

# VIII. DISCUSIÓN

Nuestros estudios mostraron la intensidad de las respuestas fisiológicas en plantas de tomate a Candidatus Liberibacter solanacearum (CLso) patógeno asociado al permanente del tomate, se correlaciona con el nivel de contenido de bacteria en la población de psílidos transmisores. Una variedad de sintomas puede ser explicada por la presencia de diferentes niveles de CLso en plantas y el número resultante de los sitios que posiblemente pueden ser fisicamente bloqueados en el floema por bacterias, sus exudados o biofilms, que causan la interrupción del flujo de fotosintatos. Sin embargo nuestros experimentos también demuestran que la parte de los síntomas puede ser atribuida a la reprogramación de eventos moleculares que son causados por Candidatus Liberibacter solanacearum. A la fecha ha sido reportada la transmisión transovárica del fitoplasma del enanismo de la mora (Hishimonoides sellatiformis) (Kawakita et al., 2000) y el fitoplasma de la hoja blanca de caña de azúcar(Matsumuratettix hiroglyphicus, Hanboonsong et al., 2002). La mayoria de insectos del orden hemiptera poseen un número especializado de criptas desarrolladas en el intestino medio, donde se albergan bacterias endosimbióticas específicas (Buchner, P. 1965, Dash, G. A., E., Weiss, y K.P. Chang. 1984., Glasgow, H. 1914., Goodchild, A.J.P. 1963. y Kikuchi, Y., X. Y. Meng, y T. Fukatsu, 2005), los endosimbiontes del intestino son transmitidos verticalmente por el huésped a la progenie y juegan un papel importante en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los insectos (Abe, Y., K. Mishiro, y M. Takanashi., 1965, Buchner, P. 1965, Fakutsu, T., y T. Hosokawa, 2002., Hosokawa, T., Y. Kikuchi, N. Nikoh, M. Shimada, y T. Fukatsu.

2006., Huber, Schneider, L. 1957., Muller, H.J. 1956. y Schorr, H. 1957). Candidatus Liberibacter solanacearum se transmite transováricamente descrita como una bacteria oportunista por la introducción en el citoplasma del huevecillo al momento de pasar las bacterias endosimbióticas primarias, como lo es Candidatus Carsonella ruddi la cual es importante para la supervivencia del insecto. La eficiencia biológica de transmisión transovárica en Bactericera cockerelli resultó ser ineficiente al momento de aislar huevecillos de la fuente de inóculo sobre plantas sanas de tomate, generando solamente un 2 % de eficiencia. Con éstos resultados en respuestas biológicas de plantas usadas en los ensayos se concluye que Bactericera cockerelli presenta una capacidad deficiente de transmisión de CLso via transovárica sobre plantas de tomate. Solo la transmisión persistente en este insecto se presenta cuando hay poblaciones numerosas de psílidos y plantas enfermas aumentando el poder de transmisión del patógeno cuando la concentración de bacteria es alta en cada psílido presente en cada planta con sintomas. Asi, la concentración del patógeno dentro del insecto es fundamental para que se lleve a cabo el proceso de infección sistémica. Las diferencias de la eficiencia de inoculación entre poblaciones de insectos vectores de patógenos de plantas ha sido reportado, aunque hay pocos estudios de diferencias en los niveles de población en la transmisión de bacterias patogenas en plantas (Purcell 1982, Galetto et al. 2009). Por ejemplo, el mollicute Spiroplasma citri es transmitido con muchas diferencias en la eficiencia, por diferentes poblaciones en el salta hojas de la remolacha Circulifer tenellus (Baker) (De Almeida et al. 1997). Es posible que las diferencias genéticas de las poblaciones de Bactericera cockerelli a la de otros paises produzcan fenotipos que estén reduciendo la

capacidad de transmisión. Por otra parte, las condiciones fisiológicas de las plantas le pueden conferir resistencia a *CLso* inoculada por psílidos. Estos análisis proveen un recurso fundamental para investigaciones futuras de las funciones de transmisión transovárica y eficiencia de transmisión de *CLso* en *Bactericera cockerelli* y lo relevante es que este conocimiento, seguramente permitirá entender mejor los niveles de riesgo a los que estarán expuestas los cultivos como tomate y papa, pero ahora con el conocimiento de los actores involucrados en el control de esta enfermedad y con base en ello se espera un mejor control de ésta.

### IX. CONCLUSIONES

El metodo para establecer la colonia de *Bactericera cockerelli* Sulc. fué el adecuado al registrarse con éxito el ciclo completo del insecto.

Los estudios moleculares confirman que *Bactericera cockerelli* Sulc. transmite en forma transovárica a la progenie la *alfaproteobacteria* secundaria, gram negativa *Candidatus* Liberibacter solanacearum.

La transmisión de *Candidatus* Liberibacter solanacearum por *Bactericera* cockerelli Sulc se presentó en un 2%.

#### X. LITERATURA CITADA

- Abdullah N. 2008. Life history of the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in Controlled Environment agriculture in Arizona. African Journal of Agricultural Research 3(1): 60-67.
- Abe, Y., K. Mishiro, and M. Takanashi. 1995. Symbiont of brown-winged green bug, Plautia stali Scott. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 39:109–115.
- Abramovitch, R.B.; Janjusevic, R.; Stebbins, C.E.; Martin, G.B. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, *103*, 2851–2856.
- Agrios GN. 2008. Enfermedades de las plantas causadas por procariotes. Espiroplasmas. En Fitopatología. 2ª. Edición. Limusa. México.
- Agrios GN. 2005. Plant pathology. Academic press. 5st ed. p 922.
- 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.
- Alvarado VY, Duncan O, Odokonyero D, Scholthof HB. Quantifying "Candidatus Liberibacter" and other microbes in psyllids in relation to insect colony behavior and ZC disease. In: Workneh F, Rush CM, eds. 10th Annual zebra chip reporting session; 2010; Dallas. pp 24–28.

- Alvarez A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. Annual Review phythopathology. 42:339-366.
- 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.
- Almeida, R.P.P., M. J. Blua, J.R.S. Lopes, and A. Purcell. 2005. Vector transmission of Xylella fastidiosa: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. Ann. Entomol. Soc. Am. 98: 775-786.
- Ananthakrishnan, T.N. Thrips. in Vectors of Plant Pathogens. Harris, K.F. & Maramorosch, K. (eds.) Academic Press. New York. p. 149-164. 1980.
- Anderson, P. K., and A. A. Cunningham, N. G. Patel, et al. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers.

  Trends in Ecology and Evolution 19(10): 535-544.
- Apriyanto D, Potter DA. 1990. Pathogenactivated induced resistance of cucumber: response of arthropod herbivores to systemically protected leaves. *Oecologia* 85: 25-31.
- Astri Wayadande, Benny Bruton, Jaqueline Fletcher, Sam Pair, Forrest Mitchell. (2005)

  Retention of Cucurbit Yellow Vine Disease Bacterium Serratia marcescens

  Through Transstadial Molt of Vector Anasa tristis(Hemiptera: Coreidae), Ann.

  Entomol. Soc. Am. 98(6): 770-774 (2005)

- Ausubel, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?

  Nat. Immunol. 2005, 6, 973–979.
- Barbosa P. 1991. Plant pathogens and nonvector herbivores. In: Barbosa P, KrischiknVA,

  Jones CG, editors. *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions*, pp. 341382. John Wiley and Sons
- 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.
- Baumann P (2006) Diversity of prokaryote–insect associations within the Sternorrhyncha (psyllids, whiteflies, aphids, mealybugs). In: Miller TA, Bourtzis K (eds) Insect symbiosis, vol 2, Contemporary Topics in Entomology Series. CRC, Boca Raton, pp 1–24
- 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. <a href="http://www.biosecurity.govt.nz/pests/surv-mgmt/resp/tom-cap-bacterium">http://www.biosecurity.govt.nz/pests/surv-mgmt/resp/tom-cap-bacterium</a>

- Byrne DN, Cohen AC, Draeger EA. 1990. Water uptake from plant tissue by the egg pedicel of the greenhouse whitefly, Trialeurodes vaporariorum (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) Can J Zool 68:1193–1195
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, centrury old disease of citrus. Journal of Plant Pathology, 88:7-37.
- Boller, T.; Felix, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009, *60*, 379–406.
- Burckhardt, D. 1986. Taxonomy and host plant relationships of the *Trioza apicalis* Förster complex (Hemiptera: Triozidae). Entomol. Scand. 16: 415-432.
- Burckhardt, D. 1994. Psylloid pests of temperate and subtropical crop and ornamental plants (Hemiptera, Psylloidea): a review. Entomol. (Trends in Agril. Sci.) 2: 173-186.
- Buchner P. 1965. Endosymbiosis of animal with plant microorganisms. Interscience New York. John Wiley. pp 909.
- Buckner James S. Characterization and Functions of the Whitefly Egg Pedicel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 49:22–33 (2002)

- 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.
- Cabodevilla, O., R. Murillo, E. Villar, C. Virto, T. G. Williams, and P. C. Caballero. 2011.

  Intraand intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: Adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. Applied and Environmental Microbiology 77:2954-2960.
- 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.
- Carter RD (1950). Toxicity of Paratrioza cockerelli to certain Solanaceous plants. Ph.D. Dissertation, University of California.. p.128.
- Carter, W. 1939. Injuries to plants caused by insect toxins. Bot. Rev. 5: 273-326
- Cell Host Microbe 2011, 10:359-367. PubMed Abstract | Publisher Full Text | PubMed Central Full Text
- Chapman R. 1985. Insects that poison plants. American vegetables grower 33: 31-38
- Chapman, R. I., J. F. Macias-Velasco, A. P. Arp, and B. Bextine. 2012. Using quantitative real time PCR melt curve analysis of partial CO1 sequence for rapid biotype differentiation of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). Southwest. Entomol. 37: 475-484

- Cranshaw, W. S. 1994. The potato (tomato) psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc), as a pest of potatoes, pp. 83Đ95. *In* G. W. Zehnder, M. L. Powelson, R. K. Hansson, and K. V. Raman [eds.], Advances in potato pest biology and management, APS Press, St. Paul, MN.
- Cummings MR, King RC. 1969. The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. General staging characteristics. J. Morphol. 128:427–441.
- 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.
- Dasch, G. A., E. Weiss, and K. P. Chang. 1984. Endosymbionts of insects, p. 811–833. *In*N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1.
  Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- 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.
- De Almeida, L., B. Raccah, and M. Klein. 1997. Transmission characteristics of Spiroplasma citri and its effect on leafhopper vectors from the Circulifer tenellus complex. Ann. Appl. Biol. 130: 49-59.
- 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.
- Denoux, C.; Galletti, R.; Mammarella, N.; Gopalan, S.; Werck, D.; De Lorenzo, G.; Ferrari, S.; Ausubel, F.M.; Dewdney, J. Activation of defense response pathways by OGs and flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol. Plant* 2008, *1*, 423–44
- Diehl, S. R., and G. L. Bush. 1984. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. Annu. Rev. Entomol. 29: 471–504.
- 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
- Douglas AE (1989) Nutritional interactions in insect–microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. Annu Rev Entomol 43:17–37
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, et al. (2009) Completegenome sequence of citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacterasiaticus' obtained through metagenomics. Mol Plant-Microbe Interactions 22:1011–1020
- 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.
- Eyer, J. R. 1937. Physiology of psyllid yellows of potatoes. J. Econ. Entomol. 30 891-898
- 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.
- Fukatsu, T., and T. Hosokawa. 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. Appl. Environ. Microbiol. 68:389–39
- Fukatsu T, Nikoh N (2000) Endosymbiotic microbiota of the bamboo pseudococcid

  Antonina crawli (Insecta, Homoptera). Appl Environ Microbiol 66:643–65
- FULTON, J.P., SCOTT, H.A. & GAMEZ, R. Beetles. in Vectors of Plant Pathogens. Harris, K.F. & Maramorosch, K. (eds.) Academic Press. New York. p. 115-132. 1980.
- Galetto, L., M. Nardi, P. Saracco, A. Bressan, C. Marzachi, and D. Bosco. 2009.

  Variation in vector competency depends on chrysanthemum yellows phytoplasma distribution within *Euscelidius variegates*. Entomol. Exp. Appl. 131: 200-207.
- 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 T, Rocha R, y Cadena H. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera*cockerelli Sulc., en las principales zonas productoras de papa en México.

  Agricultura

Técnica Mexicana 32(2):161-171.

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.
- Ghanim M, Shai Morin, Muhammad Zeidan, y Henryk Czosnek,1997. Evidence for Transovarial Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by Its Vector, the Whitefly Bemisia tabaci. Virology 240, 295–303 (1998) Article No. VY978937
- 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.
- Gill, G. 2006. Tomato psyllid detected in New Zealand. Biosecurity New Zealand 69: 10-11.
- Glasgow, H. 1914. The gastric caeca and the caecal bacteria of the Heteroptera. Biol. Bull. 3:101–171
- Goncalves E.R and Rosato Y B, 2000. Genotypic characterization of xanthomonad strain insolates from passion fruit plants (*Passiflora spp.*) and their relatedness to

- Diferent Xanthomonas species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: 811-821.
- 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.
- Goodchild, A. J. P. 1963. Studies on the functional anatomy of the intestines of Heteroptera. Proc. Zool. Soc. London 141:851–910.
- Goto S, Anbutsu H, Fukatsu T. 2006. Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. Appl. Environ. Microbiol. 72:4805–4810
- Gottwald TR (2010) Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. Annu Rev of Phytopathol 48: 119–139.
- Gurtler V., y Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142 (1):3-16.
- Hammond AM, Hardy TN. 1988. Quality of diseased plants as hosts for insects. In:

  Heinrichs EA, editor. *Plant Stress–Insect Interactions*, pp 381-432. Wiley-InterScience

- Hanboonsong Y, Choosai C, Panyim S, Damak S, 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hirogliphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* 11, 97–103.
- 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 Environmental 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.
- HAUBEN L, VAUTERIN L, SWINGS J and MOORE E.R.B. 1997. Comparison of 16s

  Ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Intenational Journal*Systematic Bacteriology. 47(2)328-335.
- Hosokawa, T., Y. Kikuchi, N. Nikoh, M. Shimada, and T. Fukatsu. 2006. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. PLoS Biol. 4:1841–1851.
- Huber-Schneider, L. 1957. Morphologische und phyaiologische untersuchungen an der wanze *Mesocerus marginatus* L. und Ihren symbionten (Heteroptera). Z. Morph. O" kol. Tiere. 46:433–480.

- 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.
- Ishikawa H (2003) Insect symbiosis: an introduction. In: Miller TA, Bourtzis K (eds) Insect symbiosis, vol 1, Contemporary Topics in Entomology Series. CRC, Boca Raton, pp 1–21
- Jackson B, Goolsby J, Wyzykowski A, Vitovksy N, and Bextine B. 2009. Analysis of Genetic Relationships between Potato Psyllid (*Bactericera cockerelli*) Populations in the United States, Mexico and Guatemala Using ITS2 and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Data. Subtropical Plant Science 61:1-5.
- 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.
- Jiu M, Zhou X-P, Tong L, Yang X, Wan F-H, Liu S-S. 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PLoS ONE* 2: e182.
- Jones, J.D.; Dangl, J.L. The plant immune system. Nature 2006, 444, 323–329.
- 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.
- Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability.

  Microbes Environ 24:195–204
- Kikuchi, Y., X. Y. Meng, and T. Fukatsu. 2005. Gut symbiotic bacteria of the genus Burkholderia in the broad-headed bugs Riptortus clavatus and Leptocorisa chinensis (Heteroptera: Alydidae). Appl. Environ. Microbiol. 71:4035–4043.
- 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.
- Knowlton G, Janes M. 1931. Studies on the biology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Annals of the Entomological Society of America 24: 283-291.
- 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.

- Kristoffersen, L., and O. Anderbrant. 2007. Carrot psyllid (*Trioza apicalis*) winter habits insights in shelter plant preference and migratory capacity. J. Appl. Entomol. 131: 174-178.
- K. S. Pelz-Stelinski, R. H. Brlansky, T. A. Ebert, y M. E. Rogers, 2010. Transmission Parameters for Candidatus Liberibacter asiaticus by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae) ARTHROPODS IN RELATION TO PLANT DISEASE, J. Econ. Entomol. 103(5): 1531-1541 (2010); DOI: 10.1603/EC10123
- Kuechler SM, Dettner K, Kehl S (2010) Molecular characterization and localization of the obligate endosymbiotic bacterium in the birch catkin bug Kleidocerys resedae (Heteroptera: Lygaeidae, Ischnorhynchinae). FEMS Microbiol Ecol 73:408–418
- Kuechler SM, Dettner K, Kehl S (2011) Characterization of an obligate intracellular bacterium in the midgut epithelium of the bulrush bug Chilacityphae (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). Appl Environ Microbiol 77:2869–2876
- 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.
- Lee, I.-M., K. D. Bottner, J. E. Munyaneza, R. E. Davis, J. M. Crosslin, L. J. du Toit and T. Crosby. 2006. Carrot purple leaf: a new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. Plant Dis. 90: 989-993.
- Liefting, L. W., Z. C. Rez-Egusquiza, G. R. G. Clover, and J. A. D. Anderson. 2008. A new 'Candidatus Liberibacter' species in Solanum tuberosum in New Zealand. Plant Dis. 92: 1474.
- 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.
- Lin H, Doddapaneni H, Bai X, Yao J, Zhao X, et al. (2008) Acquisition of uncharacterized sequences from 'Candidatus Liberibacter', an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. Mol and Cellular Probes 22: 30–37.
- Liu, D., J. T. Trumble, and R. Stouthamer. 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. Entomol. Exp. Appl. 118: 177-183
- López CEJ y Pérez SG. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética.

  Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 26:45-56.
- LÓPEZ MM, BERTOLINI E, OLMOS A, CARUSO P, GORRIS MT, LLOP P, PENYALVER R, CAMBRA M. 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology*. 6(4):233-43
- 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, FUNDACIÓN PRODUCE BC, SAGARPA. Mexicali, B.C. pp. 670-675.
- Lotze, M.T.; Zeh, H.J.; Rubartelli, A.; Sparvero, L.J.; Amoscato, A.A.; Washburn, N.R.; Devera, M.E.; Liang, X.; Tör, M.; Billiar, T. The grateful dead: damage associated

- molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.* 2007, 220, 60–81.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al. (2005)Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437: 376–380.
- Markkula, M., and S. Laurema. 1971. Phytotoxaemia caused by *Trioza apicalis* Först. (Hom., Triozidae) on carrot. Ann. Agric. Fenn. 10: 181-184.
- Márquez E. 1996. http://prof.usb.ve/ejmarque/investiga/r1.html
- Mena C. 2004. Manejo integrado de los insectos plaga del chile. En: Curso- Taller Producción y Manejo Integral del Cultivo del Chile. Consejo Nacional de Productores de Chiles, S.C. Zacatecas, México, pp. 22-30.
  - Miles, P. W. 1999. Aphid saliva. Biological Reviews 74, 41-85.
- 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.
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annu Rev Genet 42:165–190
- Moran NA, Telang A (1998) Bacteriocyte-associated symbionts of insects. BioScience 48:295–304
- Moran P, and Thompson G. 2001. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. Plant Physiology 125:1074-1085.
- 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.

  <a href="http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/canLibS">http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/canLibS</a>

  ol.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.
- Mu"ller, H. J. 1956. Experimentelle studien an der symbiose von *Coptosoma scutellatum* Geoffr (Hem. Heteropt.). Z. Morph. O" kol. Tiere. 44:459–482.

- 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, J. E., T. W. Fisher, V. G. Sengoda, S. F. Garczynski, A. Nissinen, and A. Lemmetty. 2010a. First report of "Candidatus Liberibacter solanacearum" in carrots in Europe. Plant Dis. 94: 639.
- Munyaneza, J.E., V.G. Sengoda, J.L. Buchman, and T.W. Fisher. 2012a. Effects of temperature on 'Candidatus Liberibacter solanacearum' and zebra chip potato disease symptom development. Plant Disease 96: 18–23.
- Munyaneza, J.E., V.G. Sengoda, R. Stegmark, A.K. Arvidsson, O. Anderbrant, J.K. Yuvaraj, B. Ramert, and A. Nissinen. 2012b. First report of "Candidatus Liberibacter solanacearum" associated with psyllid-affected carrots in Sweden. Plant Disease 96: 453.
- 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 cockerell Sulc. Memoria. Primera edición. SAGARPA-INIFAP-CESAVESIN. Culiacán, Sinaloa, México. 100 p.|
- Nicaise, V.; Roux, M.; Zipfel, C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* 2009, *150*, 1638–1647.
- Niki Y. 1988. Ultrastructural study of the sex ratio organism (SRO) transmission into oocytes during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. Jpn. J. Genet. 63:11–21.
- 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.
- OLIVER .A., LEE HY and COTE J.C. Study of the heterogeneity of 16S rRNA genes in gamma-proteobacteria: implications for phylogenetic analysis. *Journal Genetic Applied Microbiology* .51(6):395-405.
  - 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.
- Pelz-Stelinski KS, Brlansky HR, Ebert TA & Rogers ME (2010) Transmission parameters for Candidatus Liberibacter asiaticus by Asian citrus psyllid. Journal of Economic Entomology 103: 1531–1541.
- 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.
- Pitman, A. R., G. M. Drayton, S. J. Kraberger, R. A. Genet, and I. A. W. Scott. 2011.

  Tuber transmission of "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" and its association with zebra chip on potato in New Zealand. Eur J Plant Pathol. 129: 389–398.
- Pletsch, D. J. 1947. The potato psyllid Paratrioza cockerelli (Sulc), its biology and control.

  Mont. Agric. Exp. Stn. Bull. 446:95.
- Powell, C. M., J. King, and B. R. Bextine. 2012. Cytochrome B sequences of potato psyllids, *Bactericera cockerelli* (Sulc), from North and Central America. Southwest. Entomol. 37: 521-523.
- Purcell, M. F., J. K. Balciunas, and P. Jones. 1997. Biology and host-range of Boreioglycaspis melaleucae (Hemiptera: Psyllidae), potential biological control agent for Melaleuca quinquenervia (Myrtaceae). Environ. Entomol. 26: 366-372

- Purcell, A. H. 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens Annu. Rev. Phytopathol. 20: 397-417.
- 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.
- Romney V. 1939. Breeding areas of the tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli*(Sulc).

  Journal of Economic Entomology 32:150-151.
- 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.
- Rosenkranz W (1939) Die Symbiose der Pentatomiden. Z Morphol Okol Tiere 36:279–309
- Rubio C, Almeyda L, Ireta M, Sánchez S, Fernández S, Borbón S, Díaz H, Garzón T, Rocha R, y Cadena H. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc., en las principales zonas productoras de papa en México. Agricultura Técnica Mexicana 32(2):161-171.

SAGARPA. 2009. www.sagarpa.gob.mx

- Sakaguchi B, Poulson DF. 1961. Distribution of sex-ratio agent in tissues of *Drosophila* willistoni. Genetics 46:1665–1676
- 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.
- Schneider G (1940) Beitrage zur Kenntnis der symbiontischen Einrichtungen der Heteropteren. Z Morphol Okol Tiere 36:565–644
- Schorr, H. 1957. Zur verhaltensbiologie und symbiose von *Brachypelta aterrima* Fo¨rst (Cydnidae, Heteroptera). Z. Morph. O¨ kol. Tiere 45:561–602
- 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.
- Slykuis, J.T. Mites. in Vectors of Plant Pathogens. Harris, K.F. & Maramorosch, K. (eds.)

  Academic Press. New York. p. 325-356. 1980.

- 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 diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Publicado por Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultrura, México. 215-216.
- Stout MJ, Thaler JS, Thomma BPHJ. 2006. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annual Review of Entomology* 51 663-689
- Swisher, K. D., J. E. Munyaneza, and J. M. Crosslin. 2012. High resolution melting analysis of the cytochrome oxidase I gene identifies three haplotypes of the potato psyllid in the United States. Environ. Entomol. 41: 1019-1028.
- Swisher, K. D., J. E. Munyaneza, and J. M. Crosslin. 2013. Temporal and spatial analysis of potato psyllid haplotypes in the United States. Environ. Entomol. 42: 381-393.
- 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.
- Tamborindeguy C, Nachappa P, Shapiro A. Consequences of "Candidatus Liberibacter solanacearum" on psyllid populations. 10th Annual zebra chip reporting session; 2010; Dallas. pp 164–168.

- 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.
- TEAKLE, D. S. Fungi. in Vectors of Plant Pathogens. Harris, K.F. & Maramorosch, K. (eds.) Academic Press. New York. p. 417-438. 1980.
- Teulon, D. A. J., P. J. Workman, K. L. Thomas, and M.-C. Nielsen. 2009. *Bactericera cockerelli*: incursion, dispersal and current distribution on vegetable crops in New Zealand. New Zealand Plant Prot. 62: 136-144.
- Thao ML, Clark MA, Burckhardt DH, Moran NA, Baumann P.,2001. Phylogenetic analysis of vertically transmitted psyllid endosymbionts (Candidatus Carsonella ruddii) based on atpAGD and rpoC: comparisons with 16S-23S rDNA-derived phylogeny.
- Thao ML, Baumann P (2004) Evidence for multiple acquisition of Arsenophonus by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). Curr Microbiol 48:140–144
- Thomas, K. L., D. C. Jones, L. B. Kumarasinghe, J. E. Richmond, G. S. C. Gill, and M. S. Bullians. 2011. Investigation into the entry pathway for tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli*. New Zeal. Plant Prot. 64: 259-268.
- Van Den Berg, M. A., van Vuuren, S. P., and Deacon, V. E. 1992. Studies on greening disease transmission by the citrus Psylla, Trioza erytreae (Hemiptera: Triozidae). Israel J. Entomol. 25-26:51-56.

- Van Meer M, Witteveldt J, and Stouthamer R. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. Insect Molecular Biology 8: 399-408
- 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.
- WEISBURG W. G, BARNS S. M., PELLETIER D. A., y LANE D. J.1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697-703.
- Welliver R. 1999. Diseases caused by phytoplasmas. Regulatory Horticulture. Plant Pathology, 25:1: 17-22.
- Wernegreen, J. J. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. Nat. Rev. Genet. 3: 850-861.
- 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.
- Xu, C. F., Li, K. B., and Ke, C. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, Diaphorina citri Kuwayama. Pages 243-248 in: Proc. 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and L. Navarro, eds. University of California, Riverside
- 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.
- Zhou, J.M.; Chai, J.J. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, *11*, 179–185.
- Zipfel, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12, 414–420.



Otro trabajo realizado adicional a lo anterior, sobre los cuales se describen los avances relacionados con efecto de transmisión de CLso en plantas de tomate sanas en condiciones controladas por el vector Bactericera cockerelli Sulc.

"Eficiencia de transmisión de CLso con poblaciones de *Bactericera* cockerelli Sulc."

Con la finalidad de conocer el efecto biologico de transmision de CLso en poblaciones diferentes de *B. cockerelli* sobre plantas sanas de tomate, se realizaron bioensayos en cuarto de crecimiento con una temperatura de ±25°C, con un humedad relativa de 70:80 y un fotoperiodo de 12 hr. luz por 12 hr. sombra, con insectos adultos provenientes de la fuente de inoculo y planta sana de la variedad pony express que es susceptible a fitopatogenos, las cuales se confinaron en jaulas entomologicas en grupo de 4 plantas con diferente cantidad de insectos. Se establecieron 4 repeticiones de 4 plantas, en cada repeticion se confinaron 1 insecto por planta, 5 insectos por planta, 10 insectos por planta y 15 insectos sobre planta respectivamente.

Estos insectos se mantuvieron en observacion por 4 dias de alimentacion sobre plantas sanas de tomate, y al final de este periodo se retiraron los insectos. Las plantas permanecieron en las jaulas entomologicas para observar su desarrollo y sintomas de CLso.

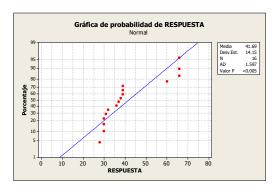
## Transmision de *C*Lso por *Bactericera cockerelli* y acumulacion de CLso en plantas de tomate

Despues de 23 dias despues de la inoculación por insectos se observaron sintomas de CLso en plantas con el tratamiento de 10 psilidos con los sintomas del permanente del tomate, comparadas con plantas que fueron inoculadas con 1 insecto que no presento sintomas de CLso. Las plantas con 5, 10 y 15 no crecieron normalmente. La altura de plantas es la variable de estudio en este ensayo, por lo que se realizo un analisis de varianza para determinar si hay significancia entre los tratamientos. De acuerdo con los datos anteriores se analizan a traves del programa estadistico Minitab.

**DATOS** 

Planta con 1 insecto	5 insectos	10 insectos	15 insectos
66	36	30	38
66	39	37	30
66	39	30	28
60	39	32	31

Altura de plantas de tomate



Los datos de altura de plantas presentan una distribucion normal

CLso coloniza los tejidos del floema de las plantas bloqueando los nutrimentos esenciales para el desarrollo y crecimiento vegetal, el creciemiento de plantas fue significativamente diferente (ANOVA: F= 93.47; grados de libertad= 3/12; y P= 0.0), lo cual, indica que la altura de plantas son diferentes estadisticamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos del ANOVA, se realizo una correlacion lineal para conocer la tendencia que existe entra el numero de insectos confinados

en plantas de tomate para cada repeticion y el crecimiento relativo o altura de las plantas para cada repeticion. La altura de las plantas fue decreciendo de acuerdo al numero de psilidos confinados en plantas observadas. Por lo tanto, la proporcion de concentracion de CLso en plantas con mas de 1 insecto fue mayor,  $(r^2=95.9: y=58.3-2.15 \text{ x})$  existe una fuerte correlacion entre el numero de psilidos en sobre la altura de plantas.

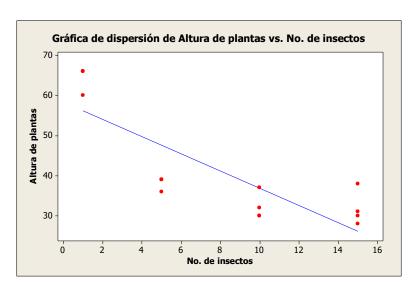


Figura . Grafica de correlacion lineal negativa, del numero de insectos y el su efecto en la altura de plantas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Durante tres semanas se presentaron síntomas del permanente del tomate en plantas donde se confinaron 10 psilidos, solo una planta manifestó los síntomas caracteristicos hasta ese periodo. En plantas con un psilido no se observaron diferencias en el crecimiento de la planta en comparación con el testigo, las demás plantas con 5, 10 y 15 psilidos presentaron un lento crecimiento y aparición de brotes filiformes y hojas invertidas hacia abajo después de ser aislados los psilidos de la planta, se manifiesta la concentracion de CLso en poblaciones mayores de 1 psilido virulifero, indicando biologicamente que el nivel de concentracion en el insecto vector es fundamental para la infeccion sistemica de CLso en plantas de tomate. Con respecto a la alimentación de los psilidos en plantas sanas con diferente número de insectos se concluye que la concentración requerida de CLso para causar la enfermedad ,es mas alta que la inoculada por un solo psilido. Los altos rangos transmisión fueron observados cuando las plantas estuvieron expuestas con mayor número de psilidos positivos de CLso. La probabilidad exitosa de inoculación de patógenos se puede incrementar si se presenta un numero critico de bacteria requerido para que se establezca una infeccion (Almeida et al., 2005).



Figura. Plantas de tomate inoculadas con diferente numero de insectos.