

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRÁRIA “ANTONIO NARRO”

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTO DE TRES ANTIBIÓTICOS ADMINISTRADOS A *Bactericera cockerelli*
PARA ELIMINAR A *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Tesis

Que presenta PABLO ULISES HERNÁNDEZ LARA

como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

Saltillo, Coahuila

Octubre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRÁRIA “ANTONIO NARRO”

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTO DE TRES ANTIBIÓTICOS ADMINISTRADOS A *Bactericera cockerelli*
PARA ELIMINAR A *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Tesis

Que presenta PABLO ULISES HERNÁNDEZ LARA

como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

Dr. Ernesto Cerna Chávez
Nombre del Director UAAAN

Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz
Nombre del Director Externo

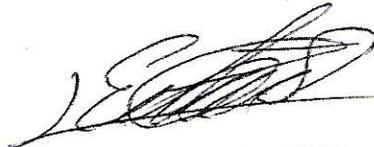
Saltillo, Coahuila

Octubre 2019

EFFECTO DE TRES ANTIBIÓTICOS ADMINISTRADOS A *Bactericera cockerelli*
PARA ELIMINAR A *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Tesis

Elaborada por PABLO ULISES HERNÁNDEZ LARA como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría



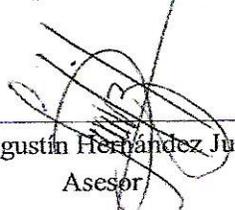
Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor principal



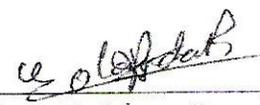
Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz
Asesor principal externo



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor



Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor



Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila

Octubre 2019

Agradecimientos

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo brindado para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola.

A mi **Alma Mater la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por haberme permitido superarme profesionalmente.

A la **Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza**, por su valiosa amistad y apoyo brindado para llevar a cabo esta investigación. Por aquellas palabras de aliento que me dio en su momento y por guiarme en todo este proceso de preparación profesional.

Al **Dr. Ernesto Cerna Chávez**, por el apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación. Por ofrecerme siempre su apoyo y enseñanza brindada dentro y fuera del aula durante este periodo.

A la **Dra. Yisa María Ochoa Fuentes**, por su apoyo en mi desarrollo profesional, por ser parte fundamental en este trabajo de investigación.

Al **Dr. Agustín Hernández Juárez**, por su valiosa amistad brindada durante esta etapa de postgrado. Por su gran apoyo, valiosa colaboración y disposición para ayudarme a conseguir este valioso objetivo.

Al **Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz**, por su asesoramiento y sus comentarios oportunos sobre el trabajo de investigación. Gracias por su valiosa amistad.

A todos y cada uno de ellos **MUCHAS GRACIAS** por haberme permitido realizar este trabajo de investigación bajo su supervisión y por sus comentarios tan amenos hacia mi persona.

A todos los maestros que me brindaron sus conocimientos durante mi formación profesional, por sus consejos y enseñanzas, algo que nunca olvidare.

A todos mis compañeros y amigos del postgrado por brindarme su amistad, cariño y apoyo, por alentarme en momentos difíciles de mi formación, por hacer más agradable el transcurso de esta etapa. A todos ellos que de alguna manera amable contribuyeron y compartieron su experiencia y conocimiento para que este trabajo lograra culminarse. Gracias por su amistad brindada.

Dedicatoria

A **Dios**, por estar conmigo en los momentos de tristeza y alegría, por darme fe y esperanza en los momentos más difíciles de mi vida.

A **mis abuelos**, que desde el cielo sé que me cuidan y brindan su apoyo, porque siempre me alentaron en todo momento a seguir mis sueños y cumplir mis metas. Aunque no estén conmigo físicamente, nunca se han marchado de mi corazón.

A **mis padres, Panuncio Hernández Rodríguez y Casilda Lara Vásquez** por ayudarme y apoyarme incondicionalmente, por sus consejos, ejemplos y valores, pero sobre todo por mi formación personal, me formaron con disciplina y humildad, siempre motivándome constantemente para alcanzar mis anhelos. ¡Los amo!

A **mis hermanos, Zaguith y Daniel** porque siempre han estado conmigo en todo momento, escuchándome y apoyándome, y por el gran cariño que me han brindado.

A **mi novia**, que siempre me ha apoyado en todo momento y me ha ayudado a conseguir lo que me eh propuesto. Te amo Blanca.

Y a toda **mi familia**, tíos, tías, primos, primas que siempre me alentaron a seguir superándome personal y profesionalmente, por brindarme siempre de su apoyo para conseguir mis metas.

Índice general

	Paginas
Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Lista de cuadros.....	v
Lista de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	ix
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Hipótesis.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Antibióticos (bactericidas sistémicos).....	10
<i>Bactericera cockerelli</i> (Sulc.)	12
Clasificación taxonómica de <i>Bactericera cockerelli</i>	14
Ciclo de vida de <i>Bactericera cockerelli</i>	15
Descripción morfológica.....	17
Biología y hábitos	18
Distribución.....	18
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	18
Clasificación taxonómica de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	21
Importancia económica	22
Distribución.....	22
Síntomas y hospederos	22
Agente causal de zebra chip.....	24
Métodos de diagnóstico.....	25
Diagnóstico Macroscópico.....	25
Diagnóstico Microscópico.	26
Diagnóstico Bioquímico.	26
Diagnóstico Molecular.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28

Ubicación del experimento	28
Obtención del material biológico	28
Establecimiento de la colonia de <i>B. cockerelli</i> y plántulas de chile morrón (<i>Capsicum annuum</i>) para los bioensayos	29
Extracción de ADN de <i>Bactericera cockerelli</i>	29
Verificación de la integridad del ADN	30
Detección de <i>CaLsol</i> por PCR en punto final.....	31
Bioensayo 1	31
Bioensayos 2	33
Método de Esqueje (M.E)	33
Método de Película Residual (M.P.R).....	34
Detección de <i>CaLsol</i> por qPCR	36
RESULTADOS	37
Verificación de la integridad del ADN	37
Detección de <i>CaLsol</i> por PCR en punto final.....	37
Bioensayo 1	38
Bioensayo 2.....	38
Detección de <i>CaLsol</i> por qPCR	40
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	46
REFERENCIAS	47

Lista de cuadros

Cuadro 1. Distribución de unidades calor de <i>Bactericera cockerelli</i>	15
Cuadro 2. Iniciadores reportados para la detección de la región 16S rRNA <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter solanacearum</i> mediante PCR y PCR en Tiempo Real. Citado por Delgado <i>et al.</i> , (2019).....	27
Cuadro 3. Dosis y antibióticos utilizados para el Método de Esqueje.....	32
Cuadro 4. Dosis y antibióticos utilizados para el Método de Película Residual.....	34
Cuadro 5. Porcentaje de mortandad de insectos de <i>B. cockerelli</i> por tratamiento.....	39
Cuadro 6. Detección de <i>CaLsol</i> en insectos de <i>B. cockerelli</i> por tratamiento mediante qPCR	40

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de *Bactericera cockerelli* Sulc.

Figura 2. Ciclo de la enfermedad de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y su vector *Bactericera cockerelli*.

Figura 3. a) hembra adulta con segmento genital cónico, b) macho adulto con segmento genital en forma de pinza.

Figura 4. Síntomas de *CaLsol* en especies de solanáceas. a) planta de papa infectada, c) tubérculos de papa (lado izquierdo crudo, lado derecho frito), c) planta de tomate infectada, d) planta de chile infectada.

Figura 5. a) invernadero b) departamento de parasitología UAAAN.

Figura 6. Obtención de insectos de *Bactericera cockerelli* con aspirador entomológico manual.

Figura 7. a) establecimiento de la colonia de *B. cockerelli* b) plántulas de chile morrón (*Capsicum annuum*).

Figura 8. Extracción de ADN de *B. cockerelli* mediante la técnica de Doyle y Doyle (1990) modificada.

Figura 9. Metodología de aplicación de antibióticos a *Bactericera cockerelli* (Método de Esqueje).

Figura 10. Aplicación de antibióticos mediante el Método de Esqueje.

Figura 11. Metodología de aplicación de antibióticos a *Bactericera cockerelli* (Método de Película Residual).

Figura 12. Aplicación de antibióticos mediante el Método de Película Residual.

Figura 13. Bioensayo 1. Amplificación del gen Citocromo Oxidasa de 10 insectos adultos de *Bactericera cockerelli* usando los primers COIF3 y COIR3. Carriles: 1 MM, 2-11 amplificaciones del gen Citocromo Oxidasa en *B. cockerelli*, 12 control positivo (+), 13 control negativo (-), 14 MM. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de Peso Molecular 1 kb.

Figura 14. Bioensayo 2. Amplificación de *CaLsol* en *Bactericera cockerelli* usando los primers CL514F y CL514R. Carriles: 1 MM, 2 control positivo (+), 3 control negativo (-), 4-13 amplificaciones de *CaLsol* en *B. cockerelli*, 14 control negativo (-), 15 control positivo (+), 16 MM. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de Peso Molecular 1 kb.

Resumen

EFFECTO DE TRES ANTIBIÓTICOS ADMINISTRADOS A *Bactericera cockerelli*
PARA ELIMINAR A *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Por

PABLO ULISES HERNÁNDEZ LARA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR, ERNESTO CERNA CHÁVEZ – ASESOR

Saltillo, Coahuila

Octubre 2019

El psílido de la papa y del tomate *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), es una plaga importante en cultivos hortícolas a nivel mundial, transmite a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, bacteria obligada a floema de las plantas, no cultivable y difícil de controlar. El manejo de este patógeno se enfoca en disminuir fuentes de inóculo usando plantas sanas, remoción de plantas sintomáticas, control químico del insecto vector y el uso de antibióticos para reducir la transmisión de la bacteria. Actualmente de manera natural un alto porcentaje de estos psílicos son positivos con dicha bacteria. La importancia de obtener una colonia libre de *CaLsol* radica en comprender mejor las interacciones hospedero-parasito donde se necesitarán como referencia un control negativo, es decir, una colonia de insectos libres de *CaLsol*. Debido a que no hay información respecto a cómo eliminar a la bacteria del insecto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de tres antibióticos, ampicilina, tetraciclina y rifampicina administrados a *Bactericera cockerelli* en *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Se propusieron dos estrategias de administración de antibióticos a *B. cockerelli* (método de esqueje y método de película residual), donde se utilizaron tres antibióticos con cinco dosis evaluando mortandad y detección de *CaLsol* mediante qPCR. En el M.E las concentraciones que eliminaron a *CaLsol* en *B. cockerelli* fueron ampicilina a 2.5 µg/mL y tetraciclina a 10 µg/mL. En el M.P.R las concentraciones que eliminaron a *CaLsol* fueron ampicilina a 25 µg/mL, tetraciclina a 75 µg/mL y rifampicina a 7.5 µg/mL. Sin embargo, los tratamientos de tetraciclina a 10 µg/mL por M.E y ampicilina a 25 µg/mL por M.P.R mostraron mortandad en los insectos, por lo que estas concentraciones no serían tan aptas para obtener una colonia de insectos libres de la bacteria en comparación con las que no mostraron mortandad en los insectos.

Palabras clave: ampicilina, tetraciclina, rifampicina, control.

Abstract

EFFECT OF THREE ANTIBIOTICS ADMINISTERED TO *Bactericera cockerelli* TO
ELIMINATE *Candidatus Liberibacter solanacearum*

By

PABLO ULISES HERNÁNDEZ LARA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR, ERNESTO CERNA CHÁVEZ – ADVISOR

Saltillo, Coahuila

Octubre 2019

The potato and tomato psyllid *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), is an important pest in world-wide horticultural crops, transmits to *Candidatus Liberibacter solanacearum*, bacteria bound to plant phloem, not cultivable and difficult to control. The management of this pathogen focuses on reducing sources of inoculum using healthy plants, removal of symptomatic plants, chemical control of the vector insect and the use of antibiotics to reduce the transmission of the bacteria. Nowadays a high percentage of these psyllids are naturally positive with this bacterium. The importance of obtaining a *CaLsol*-free colony lies in better understanding host-parasite interactions where a negative control will be needed as a reference, that is, a *CaLsol*-free insect colony. Because there is no information on how to eliminate the bacteria from the insect, the objective of this investigation was to determine the effect of three antibiotics, ampicillin, tetracycline and rifampicin administered to *Bactericera cockerelli* in *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Two antibiotic administration strategies were proposed to *B. cockerelli* (cutting method and residual film method), where three antibiotics were used with five doses assessing mortality and detection of *CaLsol* by qPCR. In the M.E the concentrations that eliminated *CaLsol* in *B. cockerelli* were ampicillin at 2.5 µg / mL and tetracycline at 10 µg / mL. In the M.P.R the concentrations that eliminated *CaLsol* were ampicillin at 25 µg / mL, tetracycline at 75 µg / mL and rifampicin at 7.5 µg / mL. However, tetracycline treatments at 10 µg / mL for M.E and ampicillin at 25 µg / mL for M.P.R showed insect mortality, so these concentrations would not be as suitable for obtaining a colony of bacteria-free insects compared with those who showed no insect mortality.

Keywords: ampicillin, tetracycline, rifampicin, control.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años cultivos de solanáceas como la papa, el tomate y el chile, se han visto afectados por problemas fitosanitarios relacionados con insectos vectores de patógenos como virus, bacterias y fitoplasmas, causantes de enfermedades de importancia, los cuales reducen el rendimiento además de ocasionar la pérdida del valor comercial de la cosecha (Flores *et al.*, 2004).

En México se presentan tres enfermedades de importancia agrícola en cultivos de solanáceas que han originado cambios importantes en la agricultura del país. En el cultivo de papa la enfermedad zebra chip (ZC), en tomate permanente del tomate (PT) y en chile variegado del chile (VC) o brotes cloróticos (BC) son enfermedades descritas con síntomas similares de aborto de flor, oscurecimiento de tejido vascular en la base del tallo y raíz de las plantas. Se ha mencionado la asociación entre estas enfermedades y la bacteria emergente *CaLsol* así como al psílido *Bactericera cockerelli* como su vector. Estas enfermedades se han diseminado a las principales regiones productoras de solanáceas en México tanto en condiciones de campo como en invernadero (Melgoza *et al.*, 2018). *CaLsol* es un microorganismo intracelular del insecto vector *B. cockerelli* que provoca la enfermedad ZC en el cultivo de papa, además de afectar a otras especies de la misma familia (Nachappa *et al.*, 2011). Después del Huanglongbing conocido también como enverdecimiento de los cítricos, siendo la enfermedad más devastadora a nivel mundial de estos (Gottwald, 2010), *CaLsol* se considera una bacteria de similar patogenicidad con una muy alta agresividad y difícil de controlar.

El psílido de la papa, *B. cockerelli* (Sulc.) (Hemíptera: Triozidae), es una plaga importante en cultivos hortícolas a nivel mundial, en América se encuentra altamente distribuida en las principales regiones productoras de solanáceas, extendiéndose en EE UU, México, Centroamérica y Nueva Zelanda (Munyanza *et al.*, 2007; Teulon *et al.*, 2009). Esta especie pertenece a la familia Triozidae, los cuales se alimentan mediante su estilete succionando los conductos vasculares del floema de las plantas (Percy, 2003) de diferentes hospederos, preferentemente los que pertenecen a la familia de las solanáceas

como lo son, papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum* spp), (Hodkinson, 2009).

Al alimentarse presentan dos tipos de daños, el daño directo, que se da cuando succionan la savia provocando amarillamientos en las plantas debido a la inyección de una toxina (List, 1935) y el daño indirecto, considerado el más perjudicial, ya que transmite organismos intracelulares y a la bacteria *CaLsol* (Liefiting *et al.*, 2009); este agente causal provoca en papa necrosis interna en los tubérculos nombrando a la enfermedad como zebra chip (ZC) (Munyanza *et al.*, 2007a), en tomate la enfermedad es conocida como permanente del tomate (PT) (Garzón *et al.*, 2009) y en chile variegado del chile (VC) o brotes cloróticos (BC) (Elizalde *et al.*, 2016), cuya sintomatología demerita la calidad, reduce la producción y dificulta su comercialización provocando pérdidas considerables en diferentes zonas productoras donde *B. cockerelli* es el insecto más común y abundante en los cultivos infectados (Cadena *et al.*, 2003). En un estudio reciente Venkatesan *et al.*, 2010, observó que *B. cockerelli* por sí sola, sin portar *CaLsol* puede causar los síntomas de la punta morada de la papa (PMP) en la parte aérea de la planta, pero no en los tubérculos y solamente que el psílido de la papa sea portador de la bacteria entonces aparece el manchado interno en los tubérculos. Los mismos investigadores señalan que se desconoce el mecanismo por medio del cual *B. cockerelli* por sí sola causa los síntomas en la parte aérea de la planta.

La enfermedad ZC documentada por primera vez en el año de 1994 en Saltillo en el estado de Coahuila, México (Munyanza *et al.*, 2009) esta asociada con *CaLsol* una α -proteobacteria, gram negativa, no cultivable (Hansen, 2008; Lin *et al.*, 2009). *CaLsol* es una bacteria filamentososa que se aloja en los tubos cribosos del floema de las plantas y se presenta en forma similar a un bacilo midiendo aproximadamente 0.2 μm de ancho y 4 μm de largo cuando termina su ciclo celular. Se transmite por el insecto vector *B. cockerelli* siendo este la fuente de inóculo más importante debido a que se presenta en altas poblaciones (Olivas, 2013). Al momento en que *B. cockerelli* se alimenta de la savia del floema de una planta infectada con *CaLsol* el patógeno es adquirido por el vector donde las células bacterianas pasan a través de la pared celular del canal alimenticio, moviéndose por la hemolinfa llegando finalmente a las glándulas salivales

(Haapalainen, 2014), originando una transmisión horizontal, pues al momento de alimentarse de plantas infectadas, este vector puede transmitir a dicha bacteria por medio de secreciones salivales a plantas no infectadas (EPPO, 2013). Esta bacteria además de afectar a solanáceas, también afecta a distintos cultivos pertenecientes a la familia de las apiáceas (Liefting *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2013). Una forma de dispersión de *CaLsol* es mediante semilla infectada, que forma parte del inóculo primario en campo e influencia la incidencia inicial de la enfermedad y el comportamiento de la epidemia (Camacho *et al.*, 2011).

En el cultivo de tomate, los síntomas del PT se caracterizan por un enrollamiento de las hojas inferiores, estas hojas son quebradizas, crecimiento apical espigado y clorótico, retraso en el desarrollo de la planta y en algunos cultivares deformación del fruto y las flores son abortadas; sin embargo, se llega a presentar una sobre brotación de yemas que forman tallos delgados que florecen y llegan a producción de frutos pequeños (Mendoza *et al.*, 2018). En el cultivo de papa, los síntomas de ZC se caracterizan por brotes amarillentos, sobre crecimiento de entrenudos, brote de tubérculos aéreos, oscurecimiento radial del tubérculo, lenticelas agrandadas en el tallo subterráneo, colapso de estolones, lesiones color marrón en el anillo vascular, necrosis en los tejidos internos y ocasionalmente rayado color marrón en el tejido medular (Munyanza *et al.*, 2007b). En los tubérculos de papa presentan pardeamiento interno, lo cual no es deseable para el consumo en fresco ni para la industria (González *et al.*, 2014). Finalmente, en Chile los síntomas de VC son crecimiento apical clorótico o color verde pálido, deformación de las hojas, acortamiento de entrenudos y retraso general del crecimiento (Munyanza *et al.*, 2009a).

En México, las pérdidas ocasionadas en estos cultivos por la bacteria *CaLsol* van del 30 al 95% (Rubio, 2016), la cual ocasiona reducción en el rendimiento y calidad de la cosecha. La infección de *CaLsol* puede ocurrir en todas las etapas del ciclo biológico de *B. cockerelli*. Datos obtenidos por Munyanza indican que solo es necesario un espécimen de *B. cockerelli* para transmitir a *CaLsol* dos horas después de la colonización de la planta (Munyanza *et al.*, 2010). Por otra parte, la edad fisiológica del vector no influye en la capacidad para transmitir la bacteria; sin embargo, las ninfas de

B. cockerelli requieren menor tiempo (15 min) que los adultos (30 min) para adquirir a *CaLsol* (Garzon *et al.*, 2009a). En años anteriores, los síntomas del agente causal de la enfermedad eran atribuidos a virus, fitoplasmas e incluso daño por insectos (Palomo *et al.*, 2017).

Su control se basa principalmente en disminuir las elevadas poblaciones de *B. cockerelli* para el cual existen diferentes métodos, siendo el control químico una herramienta útil (Liu y Trumble, 2007). El uso repetido de plaguicidas por lo general induce a que una población adquiera resistencia (Lagunes y Villanueva, 1994). Para asegurar el rendimiento y la calidad de la producción, se han implementado prácticas como el establecimiento de fechas de siembra, eliminación de focos de infestación, uso de semilla sana y de enemigos naturales, así como el uso intensivo de agroquímicos con la finalidad de disminuir las poblaciones del psílido y en consecuencia reducir la incidencia de estas enfermedades (Avilés *et al.*, 2003). Actualmente las medidas empleadas para combatir la enfermedad no han sido eficientes (Poghosyan y Lebschy, 2009; Sánchez, 2010).

Debido a esta problemática se consideró importante realizar un estudio donde se aplica el uso de antibióticos para el control de la bacteria *CaLsol* directamente en el insecto vector *B. cockerelli*, y con ello determinar sus efectos sobre este microorganismo intracelular donde los resultados proporcionarían una base para el desarrollo de nuevos protocolos para la manipulación de estos insectos, además de ser utilizada como control negativo, es decir, libres de *CaLsol*, para futuras investigaciones encaminadas a la eliminación de este microorganismo o de agentes infecciosos de similar patogenicidad, ya que actualmente, de manera natural estos psílicos se encuentran en su mayoría positivos con dicha bacteria, además de que solamente se han realizado investigaciones para el control de bacterias emparentadas a *Candidatus* en insectos como áfidos, mosca blanca, nematodos y partes vegetales de plantas, por lo que no hay información al respecto con el uso de antibióticos, la bacteria *CaLsol* y su vector *B. cockerelli*.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de tres antibióticos, ampicilina, tetraciclina y rifampicina administrados a *Bactericera cockerelli* en *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Objetivos específicos

- Establecer y mantener una colonia de *Bactericera cockerelli* infectada con *CaLsol* en jaulas entomológicas en invernadero.
- Determinar las dosis de antibiótico y las estrategias de administración a adultos de *Bactericera cockerelli* mediante un bioensayo *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la administración de los tres antibióticos en presencia de *CaLsol* en *Bactericera cockerelli* con las dosis y estrategias de administración determinadas.

Hipótesis

Candidatus Liberibacter solanacearum puede ser eliminada de *Bactericera cockerelli* con el uso de antibiótico.

REVISIÓN DE LITERATURA

Los insectos albergan una amplia gama de microorganismos intracelulares, ya sea como microorganismos simbioses distribuidos en muchas partes del mismo huésped o como simbioses restringidos a un solo tipo de célula del insecto (Werren, 1997). Estas asociaciones han involucrado un impacto perceptible en la forma física (crecimiento, supervivencia y fecundidad) del huésped. En los últimos años ha habido un interés en estas asociaciones íntimas. En consecuencia, los microorganismos intracelulares a menudo se consideran intratables a los experimentales, sin embargo, la eliminación de los simbioses asociados al insecto huésped ha demostrado ser una valiosa alternativa para el estudio a largo plazo (Wilkinson, 1997).

Varios enfoques han adoptado e incluido el tratamiento térmico, inyección de lisozima y tratamiento con antibióticos. El tratamiento térmico es útil solo cuando la tolerancia térmica del huésped supera la del microorganismo intracelular y ha sido adoptada para eliminar los simbioses de varios escarabajos, sobre todo del género *Sitophilus* (Nardon y Grenier, 1988). La inyección de lisozima, enzima bactericida que impide infecciones y que está presente en numerosas sustancias segregadas por los seres vivos como las lágrimas, saliva o la leche, ha sido desacreditada tras la evidencia de efectos deletéreos sustanciales en los tejidos del huésped (Wharton y Lola, 1969). El método más ampliamente adoptado para curar insectos de sus simbioses es la terapia con antibióticos, administrada ya sea por vía oral, a través de dietas químicamente bien definidas, o por microinyección. Los insectos libres de simbioses resultantes son referidos como aposimbioses. Estudios con el uso de antibióticos para eliminar microorganismos procariotes se han llevado a cabo muy poco, particularmente en relación con aquellos que provocan efectos nocivos en los tejidos de los insectos. (Daniel y Brooks, 1972).

Los áfidos deben mucho de su éxito como comedores de floema y una asociación íntima con bacterias (Buchner, 1965; Douglas, 1989). Las bacterias en los pulgones a pesar de varios intentos siguen siendo incultivables y solo pueden mantenerse aisladas del huésped por unas horas (Whitehead y Douglas, 1993). La metodología más ampliamente adoptada para eliminar la bacteria es una dosis oral de antibiótico, generalmente una

tetraciclina o rifampicina, administrada a través de una dieta definida químicamente. Otra alternativa para administrar antibióticos es por microinyección en el hemocele de insectos adultos (Sasaki *et al.*, 1990).

Estudios recientes demuestran que el tratamiento de los áfidos con antibióticos para eliminar las bacterias simbióticas no tiene ningún efecto directo sobre la biología del áfido. En particular, el tratamiento con antibióticos no deprime el elogio mitocondrial, la asimilación de los aminoácidos dietéticos o la incorporación de aminoácidos en proteínas. Los áfidos aposimbióticos no perjudican la osmorregulación, la tasa de alimentación y capacidad de penetración en tejidos vegetales (Douglas, 1992).

Recientemente se han aplicado técnicas de eliminación selectiva basadas en antibióticos (Ryuichi *et al.*, 2007). Se idearon para el sistema pulgón del guisante y su simbiote, el tratamiento con antibiótico ampicilina que elimina selectivamente al simbiote facultativo *Serratia*. La eliminación selectiva de *Serratia* era dependiente de la dosis de antibiótico; la administración de ampicilina a las dosis de 1000, 100 y 10 ng/mg de peso corporal ha dado como resultado 100%, 60% y 0%, de eliminación exitosa a *Serratia* respectivamente. La acción antibiótica de ampicilina es un inhibidor del crecimiento de la síntesis de la pared celular bacteriana (Spratt y Cromie, 1988).

Mientras que el tratamiento con rifampicina a una dosis baja elimina selectivamente el simbiote obligado *Buchnera* desde el insecto huésped (Koga *et al.*, 2007). Con una administración de rifampicina a las dosis de 20 y 2 ng/mg de peso corporal. La rifampicina, su modo de acción provoca una alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos (Houk y Griffiths, 1980; Ishikawa y Yamaji, 1985; Rahbe *et al.*, 1994). La rifampicina es conocida por ser eficaz para eliminar a *Buchnera* que es una bacteria patógena del pulgón del guisante.

Cabe señalar que estas técnicas se han desarrollado y utilizado de manera empírica. No se han realizado estudios sobre la optimización de la selectividad y eficacia de las técnicas de eliminación del simbiote. No hay estudios que han evaluado la generalidad de las técnicas de eliminación selectiva bajo parámetros variables tales como la dosis de

antibióticos y genotipo del huésped. Con el fin de mejorar la utilidad de las técnicas, debe llevarse a cabo un estudio sistemático de estos aspectos.

Los antibióticos se han utilizado para controlar las enfermedades bacterianas de árboles frutales y para limitar la contaminación de los cultivos de micropropagación y cultivo de tejidos por más de 50 años (Waksman, 1996). Cerca de 40 antibióticos se han aplicado para el control de enfermedades de las plantas, pero menos de 10 se han usado comercialmente, de ellos solo estreptomicina y tetraciclina han tenido un uso significativo en árboles frutales, principalmente en estudios con cítricos para el control del HLB, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Zhang *et al.*, 2011). La tetraciclina ha sido el único antibiótico que se ha aprobado para su uso a través de la inyección en los troncos de los árboles de cocotero y olmo para tratar enfermedades como el amarillamiento letal, causadas por fitoplasmas (Goodman, 1959).

Durante la década de 1970, la tetraciclina se evaluó mediante inyección directa en los troncos de los árboles de cítricos infectados con HLB en África del Sur, China e Indonesia (Supriyanto y Whittle, 1991; Van Vuuren *et al.*, 1977). Con tetraciclina se observó una reducción significativa de los síntomas en los árboles tratados, sin embargo, esta práctica de control se suspendió después debido a que tetraciclina sólo es bacteriostática, no bactericida y se requería que el tratamiento se repitiera año tras año. Además, después de varias inyecciones al tronco, la fitotoxicidad del antibiótico se hizo evidente en los árboles de cítricos inyectados (McManus y Jones, 1994; Shelton y Badenes, 2006).

La mayor preocupación de los que se oponen al uso de antibióticos en plantas es que la pulverización con antibióticos en el entorno abierto y a través de grandes extensiones de tierra puede aumentar la aparición de bacterias resistentes a estos.

Las moscas blancas y otros homópteros tienen la capacidad única para alimentarse exclusivamente de savia de floema, lo cual es rica en carbohidratos, pero deficiente en aminoácidos esenciales. Esta capacidad ha sido sin duda vinculada a algunos endosimbiontes en estos insectos. Estos endosimbiontes a menudo se localizan en vesículas dentro de células de insectos especializadas llamados bacteriocitos, y su

agregación dentro de la cavidad del cuerpo se llama bacterioma. Los endosimbiontes en los insectos generalmente se clasifican en dos tipos: endosimbiontes primarios (p-endosimbiontes) y endosimbiontes secundarios (s-endosimbiontes). Los endosimbiontes primarios son morfológicamente similares entre sí y se albergan en bacteriocitos; Los endosimbiontes secundarios son morfológicamente diferentes y no están restringidos a los bacteriocitos, sino que están presentes en casi todos los tipos de células del insecto huésped (Baumann *et al.*, 2000).

Bactericera cockerelli (Sulc) y *Diaphorina citri* (kuwayama) (Hemiptera), (Psyllidae) son vectores de *Candidatus Liberibacter* spp, agentes bacterianos de enfermedades agrícolas graves. La rápida expansión de las distribuciones geográficas de estas enfermedades dicta una creciente urgencia para su control. Descripciones concisas de los sistemas digestivos del vector psílido son necesarias para entender la vía de transmisión de patógenos transmitidos por estos vectores, desde la ingestión hasta el paso a través de los órganos internos consecutivos y durante la transmisión a la planta huésped posterior. Solo hay información disponible sobre la organización del sistema digestivo del psílido y proviene de estudios realizados hace más de 80 años (Dufor, 1833).

Se han desarrollado varios estudios del sistema digestivo de *Bactericera cockerelli* y *Diaphorina citri* para que sus componentes puedan ser reconocidos e identificados a nivel estructural durante la transmisión, y se ha reconocido y echo mayor énfasis en el componente principal de alimentación conocido como “cámara de filtro” que es el primer órgano donde se ha encontrado el patógeno cuando llega al sistema digestivo de estos, ambas especies dentro de esta cámara tienen un par de glándulas salivales primarias (PSG) y un par de glándulas salivales accesorias localizadas dorso ventralmente. (Cicero *et al.*, 2009). El canal alimentario de *Diaphorina citri* y *Bactericera cockerelli* no muestra diferencias en la organización anatómica macroscópica.

Antibióticos (bactericidas sistémicos)

Los antibióticos se han utilizado desde la década de los 50's para el control de ciertas enfermedades bacterianas en frutales, hortalizas y plantas ornamentales. La definición clásica de un antibiótico es una sustancia producida por un microorganismo que inhibe o mata a otro organismo. (McManus *et al.*, 2002). Los siguientes son algunos de los antibióticos mayormente estudiados y utilizados en la agricultura:

Estreptomina: Antibiótico aminoglicósido el cual es formulado como sulfato o nitrato de estreptomina y desde su introducción en 1955 ha sido el principal antibiótico utilizado en la agricultura. Entre los patógenos en los que se ha utilizado figuran: *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium* (Virgen, 2010). Nombres comerciales: Agrimycin 100, Agrimycin 17, Agri strep, Cuprimicin 100, Agrimycu 100, Bactrol 2X, Bacter stop. Modo de acción: Enlaza aminoácidos específicos de la subunidad 30S ribosomal. Provoca cambios en la configuración de proteínas y evita el enlace de ellas.

Oxytetraciclina: Es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas, formulado comúnmente como un complejo de oxytetraciclina de calcio ó hidrocloreuro de oxytetraciclina, ha sido utilizado para el control de *Erwinia amylovora* como en *Xanthomonas* y *Pseudomonas* en varios países. Nombres comerciales: Terramicina Agrícola 5%®, Myco shield®, Terra Q 5%®, Cuprimicina agrícola®. Modo de acción: Actúa a nivel ribosomal sobre la producción de aminoácidos, ligándose a una de las proteínas en la subunidad 30s ribosomal.

Gentamicina: Antibiótico aminoglicosido, formulado comúnmente como sulfato de gentamicina y algunas veces mezclado con oxytetraciclina, el cual se ha utilizado para el control de tizón de fuego de peral y manzano, así como en varios cultivos hortícolas con enfermedades bacterianas causadas por diversos géneros, entre estos *Pectobacteriu*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*. Nombres comerciales: Agrigent®, Genoxi®.

Ácido Oxolínico. Es un antibiótico sintético del grupo de las quinolonas, el cual se ha utilizado especialmente en Israel para el control del tizón de fuego de peral y manzano

(Shteinberg, 2001), especialmente en áreas donde se ha detectado resistencia a la estreptomicina.

Kasugamicina. Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos - aminociclitoles obtenido de la fermentación de *Streptomyces kasugaensis*. Este antibiótico se ha utilizado en diversas áreas del mundo y en distintos cultivos. Este antibiótico se actúa inhibiendo la síntesis proteica (Woodcock *et al.*, 1991). Recientemente este antibiótico, ha sido registrado por la EPA para su uso en ocho hortalizas con tolerancias de 0.04 ppm. Antibiótico del grupo de los Aminoglucósidos, fungicida bactericida. Nombres comerciales Kasumin.

Definitivamente, para alcanzar el éxito de la aplicación de los compuestos químicos antes señalados, se debe considerar que la aplicación de estos se debe realizar de manera preventiva, en el caso de los antibióticos en etapas muy tempranas, considerando las condiciones ambientales que puedan favorecer la presencia y desarrollo de las bacterias en las plantas; además, se deben tener en cuenta factores que favorecen a la aplicación misma y que influyen en el éxito de control, estos incluyen:

- Momento oportuno de la aplicación.
- Producto adecuado de acuerdo al tipo de patógeno.
- Dosis adecuada del producto.
- Método y equipo de aplicación (cantidad de agua, tipo de boquilla, hora de aplicación, condiciones climáticas, etc.).

Finalmente, un antibiótico ideal debe tener características que le permitan un uso eficiente en el control de enfermedades causadas por bacterias, estas incluyen:

- Dosis correcta.
- Utilización de penetrantes.
- Número de aplicaciones.
- Intervalo de aplicaciones.
- Selección del mejor producto.

***Bactericera cockerelli* (Sulc.)**

Descrita por T. D. Cockerell en Colorado, USA en 1909. Posteriormente Sulc en el mismo año, la denomina científicamente como *Trioza cockerelli* (Richards, 1928; Sulc, 1909). Años más tarde (Crawford, 1911) asigna a esta especie al género *Paratrioza*. Actualmente se conoce como *Bactericera cockerelli* (Burckhardt y Lauterer, 2007). En algunas regiones productoras de solanáceas se le denomina comúnmente como pulgón saltador, salerillo o psílido de la papa y del tomate (Garzón *et al.*, 2005).

B. cockerelli es una plaga de importancia económica ya que se ha reportado un rango de hospederos de 40 especies en 20 familias, teniendo preferencia por la familia solanácea (Wallis, 1951). Entre las que sobresalen papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annum*), y berenjena (*Solanum melongena*). La importancia de este insecto radica en que al alimentarse acumula gotas de miel que da como resultado un moho que interfiere con la fotosíntesis y puede contaminar el fruto. Al alimentarse del floema de las plantas hospederas causa una enfermedad llamada “el amarillamiento del psílido” (Butler y Trumble, 2012), además de que transmite la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Estudios indican que *B. cockerelli*, además de portar *CaLsol*, cuenta con tres bacterias intracelulares procarióticas (simbiontes) asociadas con éste; el primario o simbiote obligado (*Carsonella ruddii*) (Thao *et al.*, 2000) y dos facultativos, un secundario (S) y dos cepas diferentes de *Wolbachia* (Nachappa *et al.*, 2011a). Esos simbiontes son heredables y se transmiten de la madre a la progenie (Nachappa *et al.*, 2012).

El simbiote primario influye en los procesos biológicos fundamentales del insecto con el hospedante, y es requerido para la sobrevivencia y desarrollo del psílido, además de simbiontes facultativos que lo influncian ecológicamente. Por ejemplo, *Wolbachia* spp. Puede manipular la reproducción en el insecto, y provee de hembras infectadas que tienen ventaja reproductiva en comparación con las hembras que no lo están. Lo anterior incrementa la dispersión de *Wolbachia* spp., además de incentivar el incremento de insectos y el aumento en el porcentaje de vectores para la transmisión de *Liberibacter* en solanáceas (Nachappa *et al.*, 2014).

CaLsol, al competir con los simbios de *Bactericera cockerelli*, ocasiona que las poblaciones de éstos tiendan a disminuir por la cantidad de bacterias ubicadas en el aparato digestivo; de tal manera que se ven afectados los estados fisiológicos del insecto.

Actualmente se está investigando la identificación de simbios asociados con *B. cockerelli*. Además confirmar la presencia de los endosimbios mencionados anteriormente, recientemente se han informado otros endosimbios secundarios asociados con el psílido de la papa, incluidas las bacterias, *Acinetobacter*, *Methyllibium*, *Rhizobium*, *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Xanthomonas* (Arp *et al.*, 2014). Actualmente, hay poca información disponible sobre la interacción y la relación simbiote entre estos microorganismos y el psílido de la papa.

Clasificación taxonómica de *Bactericera cockerelli*

Clasificación taxonómica de acuerdo al CABI 2018

Dominio: Eucariota

Reino: Metazoa

Filo: Arthropoda

Subfilo: Uniramia

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Psylloidea

Familia: Triozidae

Género: *Bactericera*

Especie: *Bactericera cockerelli*

Ciclo de vida de *Bactericera cockerelli*

El ciclo de *B. cockerelli* está conformado por huevecillos, cinco instares ninfales y adulto, este requiere de 355 unidades calor (Cuadro 1). El ciclo de vida de huevecillo a adulto en condiciones normales varía de 20-26 días aproximadamente, pero esto dependerá de las temperaturas a las que se exponga, así como de la planta en la cual se desarrolle (Xiang-Bing y Tong-Xian, 2009). (Figura 1).

Cuadro 1. Distribución de unidades calor de *Bactericera cockerelli*.

Ciclo Biológico	Unidades Calor
1° instar (Ninfa 1)	71.72
2° instar (Ninfa 2)	53.68
3° instar (Ninfa 3)	47.58
4° instar (Ninfa 4)	54.40
5° instar (Ninfa 5)	47.92
Adulto	80.51
Total	355.81

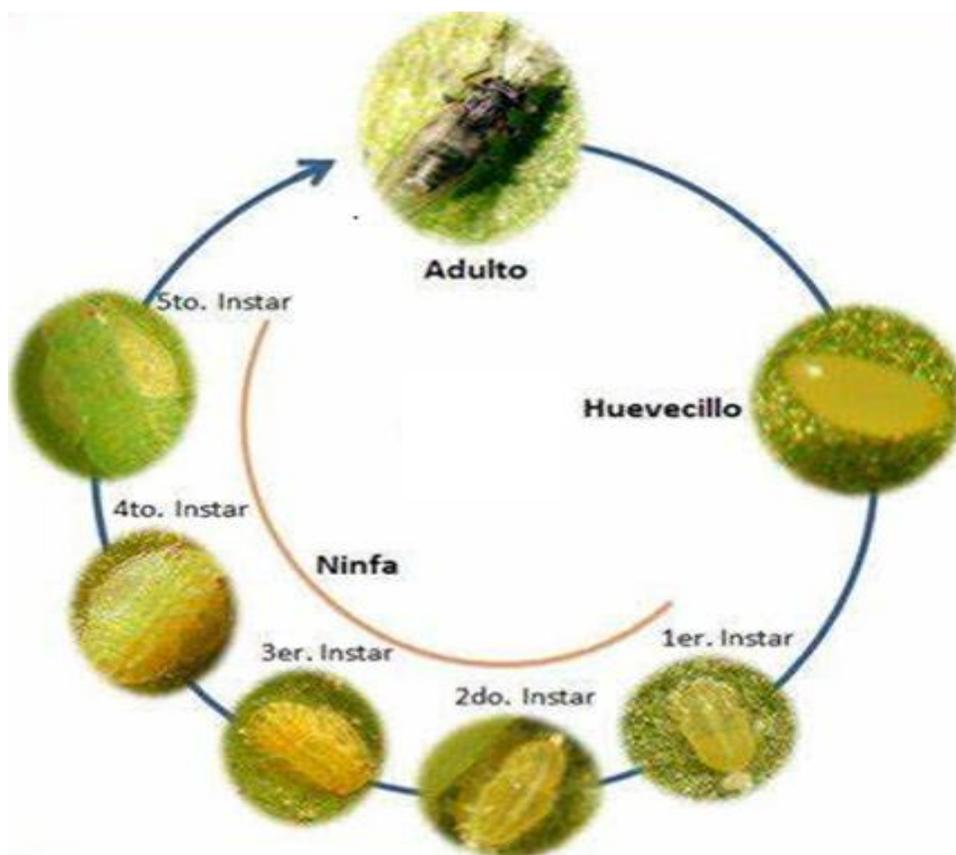


Figura 1. Ciclo de vida de *Bactericera cockerelli* Sulc.

Los nuevos adultos pueden volar a plantas hospederas hibernando y comenzar un nuevo ciclo de vida. La duración del ciclo de vida, el número de huevos, la distancia de vuelo, el número de generaciones por año y los hospederos de hibernación dependen de las especies de psílidos y las condiciones ambientales (Haapalainen, 2014a).

B. cockerelli generalmente tiene de tres a siete generaciones por año y una generación se completa en 3 a 5 semanas (EPPO, 2013a). Los psílidos transmiten a *CaLsol* a las plantas huésped y la transmisión depende de su ciclo de vida (Figura 2).

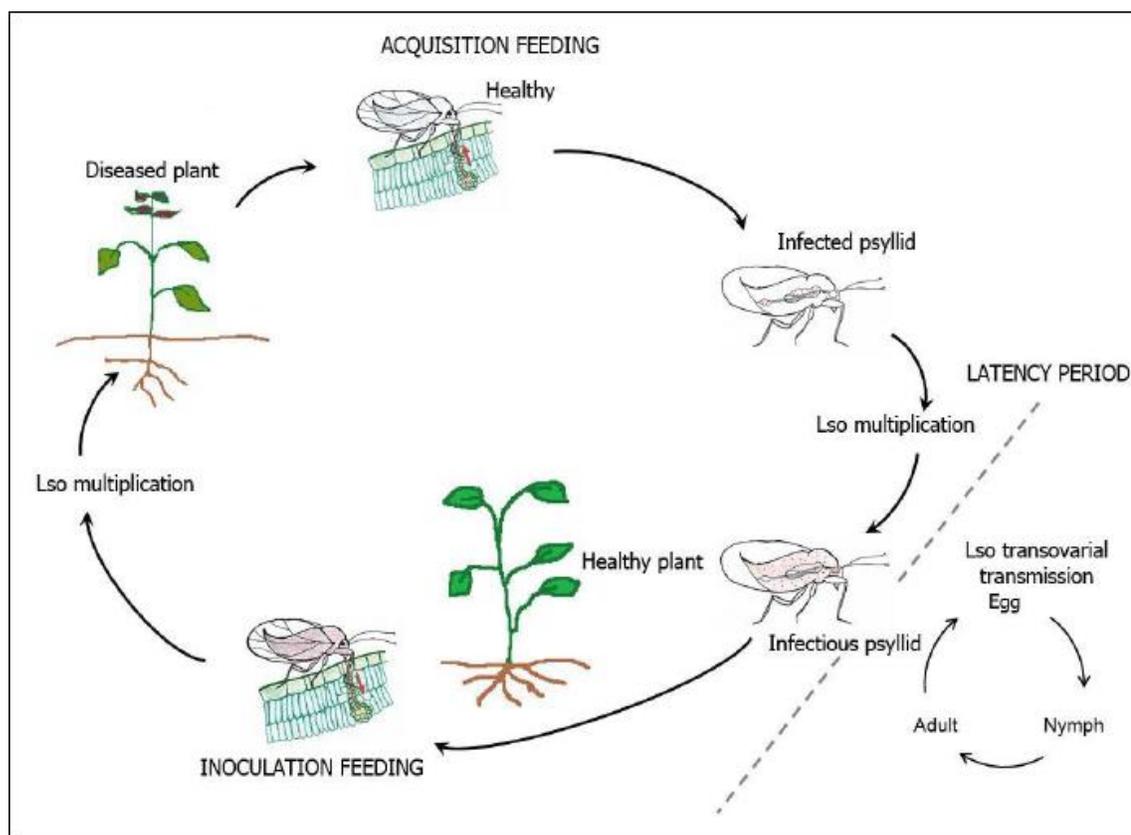


Figura 2. Ciclo de la enfermedad de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y su vector *Bactericera cockerelli*.

Descripción morfológica

Los huevos de *B. cockerelli* son de color anaranjado - amarillentos, con corion brillante (Marín, 2004), presentan en uno de sus extremos un pedicelo corto que se adhiere a la superficie de las hojas (Garza y Rivas, 2003), los próximos a eclosionar se les puede notar los ojos de las ninfas del primer instar (Becerra, 1989). Posteriormente pasan por cinco instares que son en gran parte similares en sus características morfológicas, las ninfas al eclosionar adquieren un color amarillo - verde - pálido, son ovales y aplanadas dorso - ventralmente con ojos rojos bien definidos (Lorus y Margery, 1980), presentado cambios estructurales en los instares como el aumento en el tamaño, desarrollo de las alas y la presencia de estructuras cilíndricas que contienen filamentos cerosos, los cuales forman un halo en el perímetro del cuerpo (Rowe y Knowlton, 1935). En su estado adulto, emergen con una coloración verde, posteriormente en tres días se tornan negros, poseen alas claras transparentes y membranosas en forma de azotea sobre el abdomen (Pletsch, 1947). Las hembras adultas tienen cinco segmentos abdominales visibles más el segmento genital, este es de forma cónica en vista lateral, en la parte media dorsal se presenta una mancha en forma de “Y” con los brazos hacia la parte terminal del abdomen (Marín *et al.*, 1995). Los machos adultos tienen seis segmentos abdominales visibles más el segmento genital, este último se encuentra plegado sobre la parte media dorsal del abdomen; al verlo dorsalmente se distinguen los genitales con estructura en forma de pinza que caracteriza a este sexo (Figura 3).



Figura 3. a) hembra adulta con segmento genital cónico, b) macho adulto con segmento genital en forma de pinza. (Fuente: Marín, 1995).

Biología y hábitos

Cada hembra madura ovíparos alrededor de 500 y hasta 1500 huevecillos en un periodo de 21 días (Wallis, 1955), preferentemente sobre las yemas apicales más jóvenes, en zonas cálidas entre la primera y cuarta hoja verdadera (Garzón *et al.*, 2005a), con frecuencia en hilera en los bordes o distribuidos en la superficie de las hojas (Cranshaw, 2007), los huevecillos necesitan de tres a nueve días para incubarse obteniendo la mayor eclosión al quinto o sexto día, necesitan de 14 a 17 días para completar los instares ninfales, y de 30 a 34 días para completar su ciclo desde la copula a formación de adulto (Abdullah, 2008), las hembras pueden vivir tres veces más que los machos.

Las ninfas son casi inmóviles en los primeros tres instares y van adquiriendo movilidad conforme se van desarrollando (Bravo *et al.*, 2006), los adultos son los responsables de la diseminación a corta y larga distancia infestando cultivos vecinos. El umbral de temperatura para su desarrollo es de 7 a 35 °C con una óptima de 27°C, alcanzando así 355 U.C por ciclo. Por arriba de los 32°C se reduce la oviposición y supervivencia de las ninfas y a los 37°C son letales para ambos estadios (Pavlista, 2002).

Distribución

Se ha reportado la presencia de *B. cockerelli* en países de Centroamérica como El Salvador, Honduras, Nicaragua y Guatemala. En Norteamérica se reporta en algunos estados de Canadá y de Estados Unidos de América. En México se ha reportado en los estados de México, Nuevo León, Coahuila, Tlaxcala, Sonora, Oaxaca, San Luis Potosí, Michoacán, Durango, Baja California, Morelos, Puebla, Guanajuato, Nayarit y Sinaloa. También se ha documentado su presencia en Nueva Zelanda (Rubio *et al.*, 2006).

Candidatus Liberibacter solanacearum

Candidatus Liberibacter spp, son bacterias no cultivables residentes en el floema de las plantas que poseen una triple capa de pared celular (Liefting *et al.*, 2008). En los últimos años, síntomas en plantas que inicialmente se habían atribuido a virus, fitoplasmas o incluso insectos, se han asociado a un género de bacterias del floema, denominado *CaLsol*. Este grupo comprende bacterias incapaces de crecer en medios de cultivo utilizados actualmente, razón por la cual se utiliza el término formal *Candidatus*

antecediendo al nombre del género *Liberibacter*, que procede del término latino *liber* (corteza) (Jagoueix, 1994).

La imposibilidad de *CaLsol* de crecer en medios de cultivo independientemente del hospedador se explica por la carencia en su genoma de importantes genes tanto de biosíntesis como implicados en la actividad respiratoria, que compensa obteniendo recursos directamente de las células del hospedador. La falta de algunos de estos componentes genéticos se evidencia por el pequeño tamaño de los genomas de *CaLsol* en comparación con el de los géneros de bacterias más próximas (Palomo *et al.*, 2017a).

Las *CaLsol* son bacterias gram negativas de la clase Alphaproteobacteria, del orden Rhizobiales y de la familia Rhizobiaceae y son parásitos obligados de plantas e insectos. En la actualidad se han descrito ocho especies de *CaL*: *Ca. Liberibacter africanus* (*CaLaf*), *Ca. Liberibacter americanus* (*CaLam*) y *Ca. Liberibacter asiaticus* (*CaLas*) que causan el “Huanglongbing” (HLB) o citrus greening en cítricos; *Ca. Liberibacter solanacearum* (*CaLsol*) que afecta a solanáceas y apiáceas y *Ca. Liberibacter caribbeanus* (*CaLca*), *Ca. Liberibacter europeus* (*CaLeu*) y *Ca. Liberibacter brunswickensis* (*CaLbr*), asociadas a cítricos, peral y psílicos de berenjena y otras solanáceas, respectivamente. Ninguna de estas tres últimas especies está claro que produzcan enfermedad en los cultivos en los que se las ha detectado. Finalmente, *Ca. Liberibacter crescens* (*CaLcr*), asociada a papaya de montaña, es la única especie que puede crecer en medio de cultivo axénico, por lo que se utiliza como modelo de estudio en las investigaciones sobre la biología de *CaL*, aunque tampoco ha sido identificada como patógena de plantas (Morris, 2017).

Las *CaL* son transmitidas por psílicos (Hemiptera: Triozidae), insectos que se alimentan del floema de las plantas, y cuya gama de hospedador determina en muchos casos la presencia de la bacteria en un determinado cultivo. *CaL* es capaz de multiplicarse en las células eucarióticas de las plantas o de los psílicos, siendo en todos los casos un parásito intracelular. Aunque tienen una forma de vida similar a los fitoplasmas, no están relacionadas taxonómicamente con los mismos, ya que éstos son gram positivos (Palomo *et al.*, 2017b).

Los fitoplasmas son procariotes que carecen de pared celular, caso contrario de esta bacteria, que posee tres capas de células sobre la pared de la membrana exterior y en la membrana citoplasmática interna, no se ha podido cultivar *in vitro*, teniendo registros de dos especies definidas por secuencias de ADN en tres regiones diferentes del genoma 16S rRNA. El agente causal de esta enfermedad es *CaLsol*, es una bacteria que a la fecha no se ha podido cultivar artificialmente (Bove, 2014). Esta bacteria pertenece al género *Candidatus Liberibacter*, de la que se conocen las especies asociadas con plantas solanáceas, éstas son; *psyllauros* y *solanacearum*, que probablemente sean sinónimos basados en las secuencias del análisis del gen 16S rRNA. *CaLsol* es transmitida principalmente por vectores y semilla. (Bové, 2006; Crosslin y Munyaneza 2009).

Clasificación taxonómica de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

La clasificación taxonómica de acuerdo al CABI 2019

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Phyllobacteriaceae

Género: *Candidatus Liberibacter*

Especie: *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Importancia económica

Los campos infectados con *CaLsol* reducen la calidad del producto y valor comercial de la cosecha, causando pérdidas millonarias a la industria de la papa debido al abandono de los campos de siembra por la merma en la producción y calidad del cultivo (Secor y Rivera, 2004),

Distribución

La enfermedad ZC documentada por primera vez en el año de 1994 en Saltillo en el estado de Coahuila, México se detectó en tubérculos que mostraban coloraciones oscuras cuando se procesaban para freír. En el año 2000 se observaron síntomas similares en Texas (EE. UU.), donde se produjeron pérdidas económicas importantes, siempre asociadas a una abundante presencia de psílicos. Posteriormente se ha localizado en otros estados norteamericanos, Nebraska, Colorado, Kansas, Wyoming, Nuevo México, Arizona, Nevada y California; y más recientemente en Idaho, Oregón y Washington. En América Central se ha citado en Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua. Además, está ampliamente distribuida en Nueva Zelanda, donde se detectó en 2008 (Siverio, 2017).

En Europa la situación es bastante diferente. Se ha detectado la enfermedad en cultivos de apiáceas, principalmente de zanahoria en Finlandia, Noruega, Suecia, Alemania y Francia. En España se ha encontrado en zanahoria en las Islas Canarias y en la península, y posteriormente en apio y chirivía. Recientemente se han descrito casos en cultivos de papa en España con escasa incidencia económica, también se ha detectado en zanahoria en Marruecos e Israel (Alfaro, 2012).

Síntomas y hospederos

El nombre de ZC hace referencia a los daños producidos por *CaLsol* en el cultivo de la papa, primer hospedador conocido de esta enfermedad. En la parte aérea de este cultivo puede observarse un enrollamiento de folíolos sobre el haz, coloraciones amarillas, proliferación de yemas axilares, hojas pequeñas, entrenudos cortos, nudos hinchados, producción de tubérculos aéreos, clorosis, quemaduras en hojas y senescencia prematura. Los tubérculos suelen presentar unas tonalidades marrones que a menudo

coinciden con los radios medulares del tubérculo acompañados de un moteado necrótico. Cuando se cortan en láminas y se fríen, aparecen unas bandas muy oscuras, debido a que contienen altos niveles de azúcares que se caramelizan al freírse. Los tubérculos infectados pueden tener lenticelas dilatadas, brotan con dificultad, y si lo hacen, producen brotes filiformes que dan lugar a plantas débiles.

Desde el año 2008 se han citado nuevos hospederos de esta bacteria, principalmente otros cultivos de solanáceas, entre los que destacan tomate (*Solanum lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*), y algunas malas hierbas de la familia solanaceae. En tomate, los síntomas que suele producir son: enrollamiento y clorosis apical de folíolos, oscurecimiento de las venas, moteado, reducción del tamaño de la planta y, en algunas variedades, desarrollo deforme de los frutos. En pimiento, los síntomas incluyen hojas deformadas de color verde pálido o amarillo, hojas con el ápice afilado, enrollamiento de folíolos, tallos y peciolo acortados, necrosis del meristemo apical, caída de flores, enanismo y muerte repentina de algunas partes de la planta. (Figura 4).



Figura 4. Síntomas de *CaLsol* en especies de solanáceas. a) planta de papa infectada, c) tubérculos de papa (lado izquierdo crudo, lado derecho frito), c) planta de tomate infectada, d) planta de chile infectada. (Fuente: Munyaneza, 2009).

A partir del año 2010 se comenzó a detectar en Europa en cultivos de apiáceas, principalmente en el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota*). En zanahoria, las plantas afectadas muestran deformación de hojas, coloración amarilla o púrpura de las hojas, retraso en el crecimiento de las raíces y brotes, y proliferación de raíces secundarias. Recientemente se ha encontrado en España sobre apio (*Apium graveolens*) (Teresani, 2014) y chirivía (*Pastinaca sativa*). La detección de la bacteria en vectores presentes en ausencia de estos hospedadores, hace pensar que deben existir otros hospederos desconocidos hasta ahora.

Agente causal de zebra chip

El agente causal de esta enfermedad no se conocía hasta el año 2008 cuando estudios realizados en Estados Unidos y Nueva Zelanda detectaron organismos similares a bacterias en el floema de plantas afectadas, mediante microscopía electrónica de transmisión.

La utilización de diferentes combinaciones de cebadores de PCR permitió asociar esta sintomatología a una bacteria relacionada con los *CaL*. La detección de *CaL* en psílicos presentes en cultivos de papa afectados suscitó la propuesta de designación como *Ca. Liberibacter psyllaourous* por su asociación con los psílicos. Finalmente, tras detectarse en pimientos y tomates se optó por la denominación *Candidatus Liberibacter solanacearum*, en referencia a la familia de plantas hospederas donde se había identificado la bacteria (Liefting, 2009a).

Mediante análisis de microscopía electrónica de los psílicos se comprobó que el insecto era portador de la bacteria. Estudios posteriores confirmaron que *CaLsol* se transmite tanto horizontalmente, de planta a planta utilizando al psílido como vector, como verticalmente mediante transmisión transovárica dentro de la población del psílido. Esta capacidad que tiene la bacteria para pasar el invierno en el vector tiene implicaciones epidemiológicas importantes, ya que permite su transmisión a cultivos susceptibles en la siguiente temporada, actuando como fuente primaria de inóculo (Munyaneza, 2012a).

Los insectos vectores de *CaLsol* han evolucionado según las condiciones climáticas óptimas para su desarrollo. Además, de que conjuntamente estas bacterias al evolucionar

pueden tener variaciones genéticas, tales como los identificados en los haplotipos de dicha bacteria donde la severidad está influenciada por estas variaciones. Los cambios en los haplotipos tienen un impacto en la incidencia y la gravedad de la bacteria, lo que afecta la velocidad de aparición de los síntomas y la formación de agregaciones de plantas enfermas (Camacho *et al.*, 2016).

Hasta la fecha se han reportado seis haplotipos de *CaLsol*; *CaLsol A*, *CaLsol B*, *CaLsol C*, *CaLsol D*, *CaLsol E*, *CaLsol U*, identificados en diferentes cultivos infectados (Munyaneza *et al.*, 2010a; Alfaro *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012). Los haplotipos A y B se han detectado en solanáceas (papa, tomate, pimiento, berenjena, etc.) en América Central, América del Norte, mientras que en Nueva Zelanda solo se ha registrado la presencia de *CaLsol A*, asociados al psílido *Bactericera cockerelli*. El haplotipo C se ha detectado en zanahoria (*Daucus carota*) en Finlandia, Suecia y Noruega, asociado a *Trioza apicalis*, mientras que el haplotipo D se ha localizado en zanahoria en España y el haplotipo E en zanahoria, apio y chirivía en España y Marruecos, estos dos últimos asociados a *Bactericera trigonica* (Palomo *et al.*, 2017b). De igual manera el haplotipo *CaLsol U*, detectado en *Trioza urticae* y en la planta *Urtica dioica* en Finlandia, este haplotipo está estrechamente relacionado a los haplotipos *CaLsol A* y *D* (Haapalainen *et al.*, 2018) citado por Delgado *et al.*, (2019).

Métodos de diagnóstico

Diagnóstico Macroscópico. Los síntomas característicos en una planta infectada con *CaLsol* varían según la variedad y etapa del crecimiento de la misma, achaparramiento, clorosis y un color morado en las hojas, las láminas foliares se enrollan hacia dentro, entrenudos cortos e hinchados, arrosetamiento, proliferación de yemas axilares, tubérculos aéreos, oscurecimiento del sistema vascular, tizón en las hojas y muerte temprana de la planta; dependiendo del estado fisiológico en que se presenta la infección, interrupción del crecimiento de los tubérculos, dejándolos deformes y con una mala calidad (Secor *et al.*, 2009; Crosslin *et al.*, 2010).

Esto está relacionado con la obstrucción de los vasos conductores del floema provocado por la presencia de *CaLsol*. La savia no se trasloca normalmente en la planta, sino que se acumula en los plastidios de las células del parénquima empalizada de las hojas, mientras que a los tubérculos llega en bajas cantidades (Schneider, 1968).

Diagnóstico Microscópico. En observaciones de microscopía electrónica “*Candidatus Liberibacter spp*” presenta una morfología en forma similar a un bacilo midiendo aproximadamente de 0.2 μm de ancho y 4 μm de largo con extremos redondeados cuando termina su ciclo celular y con una superficie exterior suave, es negativa a la tinción Gram. Por lo cual la pared de peptidoglicanos es apenas visible al no poseer una membrana externa (Tanaka *et al.*, 2007).

Diagnóstico Bioquímico. Los primeros intentos para aislar a *Liberibacter* fueron mediante co-cultivos con actinobacteria, relacionada con *Propionibacterium acnes*; en éstos, las colonias aparecían después de un largo tiempo y fue difícil tenerlas libres para transferirlas de manera consecutiva a un nuevo medio de cultivo (Davis *et al.*, 2008). En un segundo estudio, se diseñó y evaluó otro medio llamado Liber A, obteniéndose crecimiento irregular y colonias bacterianas con un rango de 0.1 a 0.3 mm, después de tres a cuatro días a 28 °C; posteriormente las colonias no incrementaron su tamaño, y su viabilidad se perdió después de cuatro a cinco reaislamientos. *Candidatus Liberibacter solanacearum* es una bacteria de crecimiento obligado, por lo tanto, no se puede cultivar de forma *in vitro*. Las pruebas bioquímicas no se pueden llevar a cabo (Murray y Schleifer, 1994; Murray y Stackebrandt, 1995).

Diagnóstico Molecular. La detección de *CaLsol* en plantas e insectos es esencial para estudiar la etiología, epidemiología y manejo de la enfermedad (Goolsby *et al.*, 2007). *Candidatus Liberibacter solanacearum* se puede detectar por PCR convencional o PCR en tiempo real con iniciadores que amplifiquen la región del gen 16S rRNA (Flores, 2013). Con el paso de los años se han diseñado iniciadores específicos que solo detectan *CaLsol* y no otro patógeno procariótico (Wen *et al.*, 2009). En el Cuadro 2 se muestran los principales iniciadores para el género *Candidatus Liberibacter* y específicos para la detección de *CaLsol*.

Cuadro 2. Iniciadores reportados para la detección de la región 16S rRNA *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* mediante PCR y PCR en Tiempo Real. Citado por Delgado *et al.*, (2019).

Primer	Secuencia	Organismo	referencia
*OI2c/Cli.po. F/LsoF/OA2/ ZCf	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT/ TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT/ GTCGAGCGCTTATTTTTAATAGGA/ GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGC/CGAGCGCTT ATTTTTATTAGGAGC	<i>Candidatus</i> Liberibacter	Jagoueix, Bové & Garnier, 1994; Secor <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2009; Liefing <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
LG774F/LG1 463R	GTAAACGATGAGTGCTAGCTGTTGGG/ CTGACCRTACCGTGGCCGG	<i>Candidatus</i> Liberibacter	Morris <i>et al.</i> , 2017
LsoadkF/Lsoa dkR	GCGCCACACTAACATCTCCTTCC/ CGCAGCAGTATGAGGGCC	CLso	Ravindran <i>et</i> <i>al.</i> , 2011
LsoTX16/23F /Lso TX16/23R	AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG/ GGTACCTCCCATATCGC	CLso	Ravindran <i>et</i> <i>al.</i> , 2011
OMB1482F /OMB2086R CLZC- F/CLZC-R	GGCGTGGTTATAAGCAGAGT/ ATCTACACGCGGACCTATAC TCGGATTTAGGAGTGGGTAAGTGG/ ACCCTGAACCTCAATTTACTGAC	CLso (Proteína de la membrana externa de Liberibacter)	Crosslin, Lin & Munyanza, 2011
CL514F/ CL514R	CTCTAAGATTTCCGGTTGGTT/ TATATCTATCGTTGCACCAG	<i>Candidatus</i> Liberibacter	Munyanza, Sengoda, Crosslin, De la Rosa & Sánchez, 2009c
LpFrag4- 1611F/LP Frag 4-480R	GGTTGATGGGGTCATTGAG/ CACGGTACTGGTTCACTATCGGTC	<i>Candidatus</i> Liberibacter psyllauros	Hansen, Trumble, Stouthamer & Paine, 2008

* Complementarios OI2c/ Cli po.F; OI2c / LsoF; OI2c /OA2; OI2c /ZCf.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el invernadero y en el laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.



Figura 5. a) invernadero b) departamento de parasitología de la UAAAN.

Obtención del material biológico

Se colectaron adultos de *B. cockerelli* en cultivos de papa de la región infectados con *Candidatus Liberibacter solanacearum* en el Ejido de Huachichil, Arteaga, Coahuila (25°09'58.88" N y 100°47'12.90" O) con ayuda de un aspirador entomológico manual. Los insectos se colocaron en frascos de 100 mL y se llevaron al invernadero del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con la finalidad de establecer una colonia para la presente investigación.



Figura 6. Obtención de insectos de *Bactericera cockerelli* con aspirador entomológico manual.

Establecimiento de la colonia de *B. cockerelli* y plántulas de chile morrón (*Capsicum annuum*) para los bioensayos

Se estableció una colonia de insectos de *B. cockerelli* infectados con *CaLsol* en plantas de la familia solanácea (papa, tomate y chile) dentro de jaulas entomológicas hechas a base de madera y organza. Las plantas fueron regadas cada tercer día con agua de la llave. Las temperaturas promedio del invernadero fueron de 26.5 ± 1.5 °C. También se germinaron semillas de chile morrón variedad California Wonder en charolas de plástico de 50 cavidades usando como sustrato Peat Moss y Perlita en proporción 2:1 respectivamente. Las plántulas se regaron cada tercer día y se mantuvieron en invernadero hasta que desarrollaron entre 8 y 10 hojas verdaderas para ser usadas en los bioensayos correspondientes.



Figura 7. a) establecimiento de la colonia de *B. cockerelli* b) plántulas de chile morrón (*Capsicum annuum*).

Extracción de ADN de *Bactericera cockerelli*

Se realizó extracción de ADN para posteriormente verificar la presencia de *CaLsol* mediante PCR mientras se mantuvo la colonia, antes de comenzar los bioensayos y al final de estos. En cada caso se procesaron adultos del insecto de forma individual. La extracción de ADN se realizó con la metodología descrita por Doyle y Doyle (1990) modificada, Se colocó un insecto dentro de un tubo Eppendorf, se agregaron 300 μ l de buffer de lisis (Tris-HCL 100 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8.5, NaCl nM, SDS 2%) y se maceró. Una vez realizada la extracción con la metodología mencionada, las muestras de ADN se

resuspendieron con 30 μ l de agua destilada estéril y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.



Figura 8. Extracción de ADN de *B. cockerelli* mediante la técnica de Doyle y Doyle (1990) modificada.

Verificación de la integridad del ADN

Para verificar la integridad del ADN extraído individualmente de los insectos, se realizó una PCR en punto final amplificando un fragmento de 500 pb del gen Citocromo Oxidasa subunidad 1 del insecto con los primers COIF3 (5'-TACGCCATACTAGCAATCGG-3') y COIR3 (5'-GAGTAACGTCGTGGTATTCC-3'). Se realizó esta verificación debido a que el ADN extraído fue tan poco que era imposible visualizarlo en un gel de agarosa y que sobrara muestra para posteriormente detectar a la bacteria. El volumen de reacción fue de 15 μ l que contenía 7.5 μ l de Taq Master Mix 2X (Genscript), 1.5 μ l de cada iniciador (COIF3 y COIR3) (10 μ M), 3 μ l de agua destilada estéril y 1.5 μ l de ADN. La reacción fue procesada en un termociclador Px2 Thermal Cycler THERMO ELECTRON CORPORATION con una predesnaturalización a 95°C por 5 min, seguida de 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación/alineamiento a 59°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; con una extensión final de 72°C por un tiempo de 10 min. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por electroforesis a 80 voltios por 45 min con buffer TAE 1X en un gel al 1% de agarosa. Para la visualización de los productos de amplificación se tiñó el gel con Bromuro de Etidio y se observaron en un fotodocumentador GelDoc-it Imaging System con luz UV.

Detección de *CaLsol* por PCR en punto final

Una vez que las muestras amplificaron para el gen de Citocromo Oxidasa, se realizó una PCR en punto final para detectar la presencia de *CaLsol* usando los primers CL514F (5'-CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT-3') y CL514R (5'-TATATCTATCGTTGCACCAG-3') los cuales amplifican un fragmento de 669 pb del gen 16S rDNA (Crosslin, 2009). El volumen de reacción fue de 15 µl conteniendo 7.5 µl de Taq Master Mix 2X (Genscript), 1.5 µl de cada primers (CL514F y CL514R) (10 µM), 3 µl de agua destilada estéril y 1.5 µl de ADN. La reacción fue procesada en un termociclador Px2 Thermal Cycler THERMO ELECTRON CORPORATION con una predesnaturalización a 95°C por 5 min, seguida de 42 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación/alineamiento a 51°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 10 min. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por electroforesis a 80 voltios por 45 min con buffer TAE 1X en un gel al 1% de agarosa. Para la visualización de los productos de amplificación se tiñó el gel con Bromuro de Etidio y se observaron en un fotodocumentador GelDoc-it Imaging System con luz UV.

Bioensayo 1

Existen diferentes técnicas metodológicas de aplicación de productos a nivel experimental sobre plagas y enfermedades, por ejemplo, aplicaciones directas a patógenos, inyección/microinyección, aspersión de soluciones a plantas o insectos, película residual, inmersión de insectos en soluciones tratadas, esqueje de partes vegetales, entre otras, ya sea insecticidas, fungicidas, herbicidas, bactericidas, etc. Se realizó un primer bioensayo con la finalidad de estandarizar el método de esqueje para suministrar el antibiótico al insecto ya que hasta el momento no se habían reportado investigaciones hechas administrando antibióticos a *B. cockerelli* para ver su efecto en *CaLsol*, Los antibióticos a usarse fueron ampicilina, tetraciclina y rifampicina. La elección de estos antibióticos se debió a que, de acuerdo con Spratt y Cromie, (1988), el mecanismo de acción de ampicilina es inhibir la síntesis de la pared bacteriana, al impedir que la pared celular se construya correctamente ocasionando lisis de la bacteria y su muerte, y ha bajado niveles de bacterias como *Serratia* en áfidos como lo es el

pulgón del guisante. Para el caso de tetraciclina, es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas y en consecuencia el metabolismo de los ácidos nucleicos interfiriendo en la replicación de ADN.

Las dosis establecidas se determinaron de acuerdo con la literatura consultada donde se menciona que para ampicilina y tetraciclina se administran de 100-200 ng por mg de peso de corporal (Zhang *et al.*, 2011), y para rifampicina de acuerdo con Koga *et al.*, (2007) se administran dosis más bajas, 15 ng por mg de peso corporal, ya que este puede causar alteraciones en la fisiología del insecto. Se trabajó bajo el supuesto de que un insecto adulto de *Bactericera cockerelli* toma aproximadamente 10 µl de savia al día y el peso corporal de estos es de aproximadamente 0.04 ng (se pesaron 10 insectos de *Bactericera cockerelli* y el peso fue 0.4 µg). Esta determinación se hizo por quintuplicado). Las concentraciones usadas por antibiótico fueron las que se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Dosis y antibióticos utilizados para el método de esqueje.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Ampicilina	0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10
Tetraciclina	0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10
Rifampicina	0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0

Los antibióticos se prepararon a las dosis correspondientes con agua destilada estéril. Se les cortó la raíz a las plántulas de chile morrón (que ya tenían entre ocho a diez hojas verdaderas) dejando el tallo en la solución de antibiótico preparada por 24 h con la finalidad de que éste se traslocara vía sistémica por toda la plántula. Transcurrido ese tiempo, se tomaron tres hojas con todo y peciolo de la parte baja de la plántula, preferentemente las que no tenían daño mecánico o de ataque de insectos, debido a que estas fueron las que adquirieron más rápido el antibiótico. El peciolo de estas hojas se envolvió con algodón remojado con la misma solución y cubierto con cinta parafilm para evitar su deshidratación. Posteriormente estas hojas se colocaron con el envés hacia arriba en una caja petri (unidad experimental) a la cual se agregaron cinco insectos adultos de *B. cockerelli*. Cada tratamiento constó de tres repeticiones (Figura 9). evaluando en ellas la mortandad de los insectos, para posteriormente guardarlos en tubos Eppendorf de 1.5 mL,

etiquetados registrando la fecha en la que murió el insecto, el antibiótico al que pertenecía y su respectiva dosis. El bioensayo se llevó a cabo en un laboratorio con una temperatura de $19.5 \pm 1.5^\circ \text{C}$

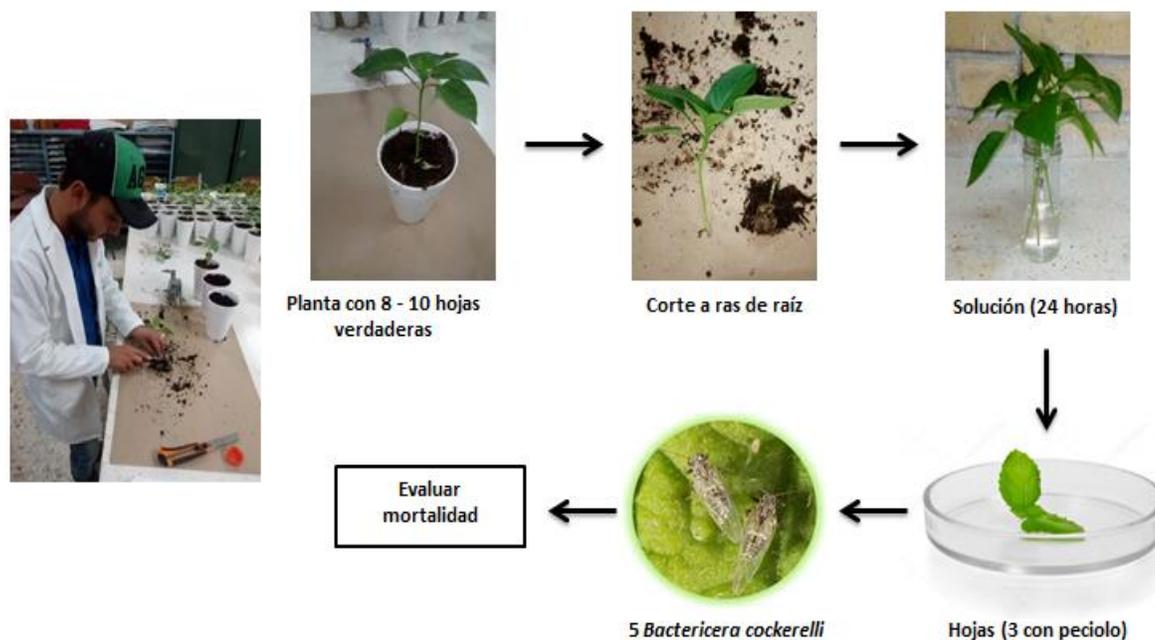


Figura 9. Metodología de aplicación de antibióticos a *Bactericera cockerelli* (método de esqueje).

Bioensayos 2

Los antibióticos se aplicaron mediante dos métodos: por esqueje (M.E), y por película residual (M.P.R), este último de acuerdo con lo reportado por Pérez y Sánchez, (2017). El bioensayo se llevó a cabo con una temperatura promedio de $27.5 \pm 0.5^\circ \text{C}$.

Método de Esqueje (M.E)

Para la aplicación de antibióticos mediante el M. E, la metodología fue exactamente como se describió en el bioensayo 1.



Figura 10. Aplicación de antibióticos mediante el método de esqueje.

Método de Película Residual (M.P.R)

Las concentraciones usadas de los antibióticos se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Dosis y antibióticos utilizados para el método de película residual.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	0, 25, 50, 75 y 100
Tetraciclina	0, 25, 50, 75 y 100
Rifampicina	0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10

Se prepararon las soluciones de los antibióticos con agua destilada estéril. Se tomaron las tres hojas más bajas de pimiento morrón con todo y peciolo (de plántulas que ya tenían entre ocho a diez hojas verdaderas) y se sumergieron en la solución por un periodo de cinco a diez seg con la finalidad de empaparlas con el antibiótico, dejándose secar posteriormente sobre papel absorbente. A estas hojas se les colocó un algodón remojado con la misma solución envolviendo el peciolo, y cubierto con cinta parafilm para evitar su deshidratación. Posteriormente estas hojas se colocaron con el envés hacia arriba en una caja petri (unidad experimental) a la cual se agregaron cinco insectos adultos de *B. cockerelli*. Cada unidad experimental constó de tres repeticiones (Figura 11).

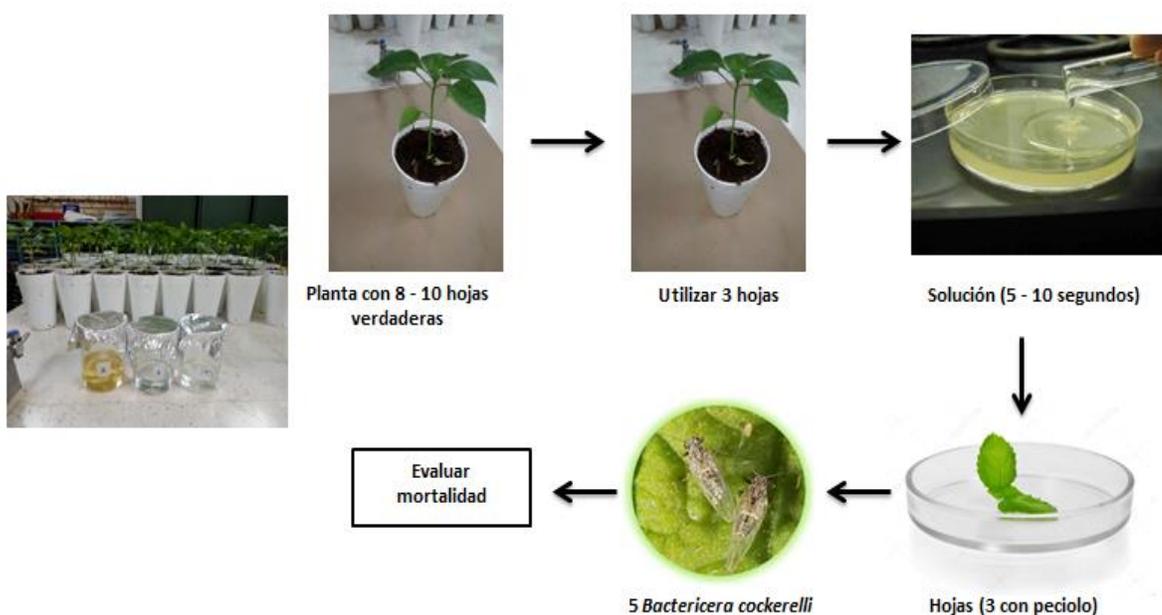


Figura 11. Metodología de aplicación de antibióticos a *Bactericera cockerelli* (método de relícula residual).



Figura 12. Aplicación de antibióticos mediante el método de película residual.

En ambos bioensayos se registró mortalidad de los insectos cada 24 horas por siete días, considerando la misma hora del día para el registro. Los insectos se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, etiquetados con la leyenda del tratamiento y repetición a la que pertenecían, registrando la fecha de su muerte. Posteriormente se guardaron en alcohol al 70% para su posterior extracción de ADN y amplificación de PCR. Al final de los siete días lo que se hizo con los insectos sobrevivientes, fue tomarlos con ayuda de un pincel para evitar que volaran y posteriormente, se guardaron en alcohol al 70% registrándolos de la misma manera como se describió anteriormente.

Detección de *CaLsol* por qPCR

Para cada concentración y método de aplicación de antibiótico, se realizó una extracción de ADN compuesta, macerando 5 insectos (es decir, se maceraron todos los insectos de cada unidad experimental). Se detectó la presencia o ausencia de *CaLsol* mediante qPCR debido a la sensibilidad de esta técnica. El volumen de reacción para cada muestra fue de 10 μ l que contenía 5 μ l de Eva Green 2X, 0.66 μ l de cada primer (CL514F y CL514R, 150 nM), 1 μ l de ROX y 2.68 μ l de ADN (20 ng por reacción). En las placas, además de amplificar los tratamientos se adicionó un NTC (muestra sin ADN). La reacción fue procesada en el termociclador Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, con una predesnaturalización a 95°C por 5 min, seguida de 42 ciclos con una desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación/alineamiento a 51°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min. Los resultados se observaron en el Software System Versión 2.2.3, tomándose como negativos aquellos tratamientos cuya curva tuviera un comportamiento igual o por debajo del NTC y como positivos aquellos tratamientos cuya curva amplificara por encima del NTC.

RESULTADOS

Se colectaron aproximadamente 600 insectos para el establecimiento de la colonia. Al inicio del establecimiento de dicha colonia y después, de forma periódica, se verificó la presencia de la bacteria *CaLsol*.

Verificación de la integridad del ADN

Se obtuvo la banda esperada de 500 pb para gen Citocromo Oxidasa de cada una de las extracciones individuales de insecto realizadas al momento de establecer la colonia y al inicio del establecimiento de cada uno de los dos bioensayos. La Figura 13 muestra la amplificación de los 10 psíldos colectados al inicio del establecimiento del bioensayo 1.

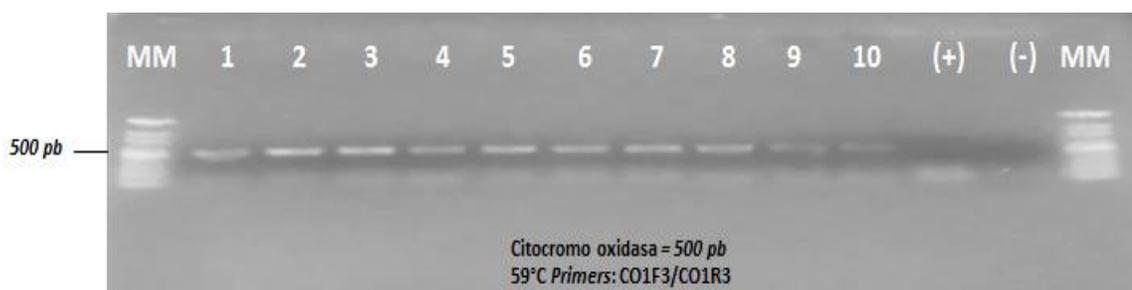


Figura 13. Bioensayo 1. Amplificación del gen Citocromo Oxidasa de 10 insectos adultos de *B. cockerelli* usando los primers COIF3 y COIR3. Carriles: 1 MM, 2-11 amplificaciones del gen Citocromo Oxidasa en *B. cockerelli*, 12 control positivo (+), 13 control negativo (-), 14 MM. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de Peso Molecular 1 kb.

Detección de *CaLsol* por PCR en punto final

Se obtuvo la banda esperada de 669 pb para detectar la presencia de *CaLsol* en cada una de las extracciones individuales de insecto realizadas al momento de establecer la colonia y al inicio del establecimiento de cada uno de los dos bioensayos. La figura 14 muestra la amplificación de los 10 psíldos muestreados al inicio del bioensayo 2.

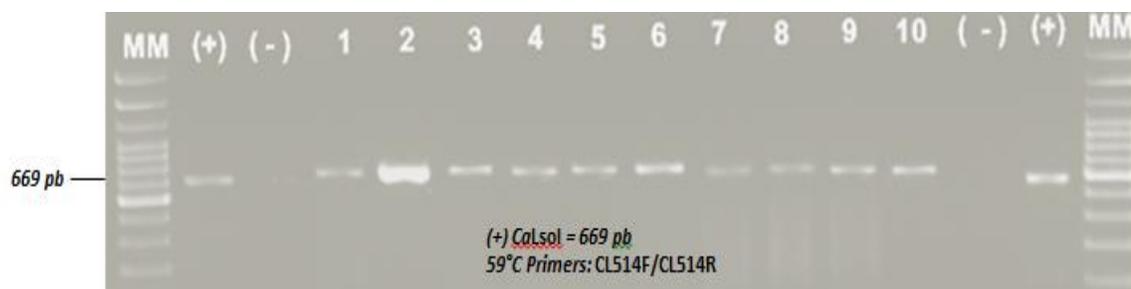


Figura 14. Bioensayo 2. Amplificación de *CaLsol* en *B. cockerelli* usando los primers CL514F y CL514R. Carriles: 1 MM, 2 control positivo (+), 3 control negativo (-), 4-13 amplificaciones de *CaLsol* en *B. cockerelli*, 14 control negativo (-), 15 control positivo (+), 16 MM. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de Peso Molecular 1 kb.

Bioensayo 1

El primer bioensayo permitió conocer el tiempo máximo en el cual las hojas se mantenían viables bajo el diseño de las unidades experimentales descritas. Se dio seguimiento a las hojas en las cajas Petri hasta los 14 días, pero se observó que a partir del día ocho comenzaban a marchitarse.

Otro factor a tener en cuenta fue la temperatura e iluminación del lugar donde se llevó a cabo el bioensayo. El promedio de la temperatura en el laboratorio fue de $19.5 \pm 1.5^\circ \text{C}$. A esta temperatura muchos de los insectos no mostraban actividad, ni de alimentación ni de movimiento. Se observó que varios insectos caminaban únicamente por el perímetro de la caja Petri sin acercarse a las hojas. No se observó oviposición. Finalmente, el registro de la mortandad solo se hizo al final del bioensayo, sin llevar un seguimiento minucioso de los días después del inicio del bioensayo en que morían los insectos.

Bioensayo 2

El tratamiento con mayor mortandad de insectos adultos fue tetraciclina a $10 \mu\text{g/mL}$ por M.E. con seis insectos. En este mismo método de aplicación, los tratamientos que también tuvieron mortandad, pero fue más baja (3 insectos) fueron ampicilina a $10 \mu\text{g/mL}$ y rifampicina a $0.50 \mu\text{g/mL}$, $0.75 \mu\text{g/mL}$ y $1.0 \mu\text{g/mL}$. Para el M.P.R, en los tratamientos de ampicilina a $25 \mu\text{g/mL}$ y $100 \mu\text{g/mL}$ y tetraciclina a $100 \mu\text{g/mL}$ la mortandad fue de tres insectos para cada uno de ellos (Cuadro 5). Los demás tratamientos no presentaron mortandad.

Cuadro 5. Porcentaje de mortandad de insectos de *B. cockerelli* por tratamiento.

Método	Tratamiento $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje de mortandad	Intervalo de días en que se observó mortandad en los insectos
M.E	Tetraciclina 10	40	5 – 6
	Ampicilina 10	20	5 – 6
	Rifampicina 0.50	20	6 – 7
	Rifampicina 0.75	20	6 – 7
	Rifampicina 1.0	20	5 – 6
M.P.R	Tetraciclina 100	20	5 – 6
	Ampicilina 25	20	6 – 7
	Ampicilina 100	20	6 – 7

Detección de *CaLsol* por qPCR

Para el M.E, se observó que los tratamientos de ampicilina a 2.5 µg/mL y tetraciclina a 10 µg/mL eliminaron a *CaLsol* a los siete días. Para el M.P.R, los tratamientos ampicilina a 25 µg/mL, tetraciclina a 75 µg/mL y rifampicina a 7.5 µg/mL fueron los que eliminaron a *CaLsol*, como muestra el Cuadro 6.

Cuadro 6. Detección de *CaLsol* en insectos adultos de *B. cockerelli* por tratamiento mediante qPCR.

Método	Tratamiento µg/mL	Presencia de <i>CaLsol</i>	
M.E	Ampicilina	0	+
		2.5	-
		5.0	+
		7.5	+
		10	+
	Tetraciclina	0	+
		2.5	+
		5.0	+
		7.5	+
		10	-
	Rifampicina	0	+
		0.25	+
		0.50	+
		0.75	+
		1.0	+
M.P.R	Ampicilina	0	+
		25	-
		50	+
		75	+
		100	+
	Tetraciclina	0	+
		25	+
		50	+
		75	-
		100	+
	Rifampicina	0	+
		2.5	+
		5.0	+
		7.5	-
		10	+

Dónde: (+ Hay presencia de *CaLsol*) y (- Eliminó a *CaLsol*).

DISCUSION

Se decidió desarrollar un bioensayo previo con la finalidad de obtener una metodología más precisa para el desarrollo de futuros bioensayos y con ello dar una idea de cómo mejorarlos, tomando en cuenta consideraciones para ajustar y controlar las condiciones cuando se desconoce el tema a tratar, la manipulación de algún organismo o cuando no se tiene información metodológica al respecto.

Con el primer bioensayo se pudo determinar que siete días era el tiempo máximo en que se podía realizar la administración de antibiótico por el método de esqueje manteniendo las hojas hidratadas, viables y en condiciones para que los insectos se alimentaran. Otro de los parámetros importantes que se tomó en cuenta para el segundo bioensayo fue la temperatura y luminosidad del lugar donde se realizó el experimento. El rango de temperatura para que se desarrolle *Bactericera cockerelli* va de los 21-27° C, teniendo una temperatura óptima a los 27° C, logrando una mayor sobrevivencia, desarrollo y ovoposición (Munyanza *et al*, 2012). Temperaturas por arriba de los 32° C y menores a 7° C son perjudiciales porque se reduce la puesta de huevos y la eclosión, pudiendo causar mortandad (Pavlista, 2002). Otro aspecto importante para tomar en cuenta fue que debido a la poca experiencia que se tenía en la manipulación y reconocimiento de las diferentes etapas de *B. cockerelli*, posiblemente se colectaron insectos recién emergidos a adultos o caso contrario, algunos que estaban a punto de terminar su ciclo de vida. A demás de que no se determinó una proporción entre machos y hembras. Lo anterior, sirvió como experiencia para adecuar el bioensayo 2, donde se verificó que los insectos usados tuvieran una edad semejante, y hubiera una proporción similar entre hembras y machos. A pesar de ello, tampoco en el bioensayo 2 se observó oviposición. La principal actividad de los antibióticos es atacar el proceso de la enfermedad al destruir la estructura de las bacterias o su capacidad de dividirse o reproducirse.

Es de conocimiento general que al administrar antibióticos a cualquier organismo para controlar o erradicar microorganismos dentro de él, pueda tener consecuencias para el organismo portador, dependiendo del mecanismo de acción del antibiótico. Por ejemplo, la enfermedad de filariasis en humanos, la cual es transmitida por *Brugia malayi* portador de la bacteria intracelular obligada *Wolbachia*. Ghedin *et al*. (2009) realizaron un estudio donde

se aplicó tetraciclina a los nemátodos logrando causar la muerte de la endobacteria, ya que inhibió de la síntesis de aminoácidos y la traducción de proteínas, pero al mismo tiempo causó disminución en las transcripciones que participan en la biosíntesis de la cutícula del nematodo vector.

De forma similar, la mortandad registrada en el presente trabajo para el método de esqueje tuvo correlación directa con las mayores concentraciones de los antibióticos usados, siendo la rifampicina el antibiótico donde se registraron el mayor número de tratamientos con mortandad (0.5, 0.75 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Incluso se puede apreciar que para la mayor dosis de rifampicina administrada (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), los insectos empiezan a morir desde un día antes que en las otras dos dosis (0.5 y 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La rifampicina es un antibiótico de amplio espectro, y actúa inhibiendo la síntesis de ARN bacteriano al unirse fuertemente a la subunidad beta de la ARN polimerasa dependiente del ADN, evitando la unión de la enzima al ADN y bloqueando así la iniciación de la transcripción del ARN (Rahbe *et al.*, 1994). Dworkin *et al.*, (1989) mencionan que la rifampicina es un potente inductor de la actividad enzimática microsomal aumentando el metabolismo de un organismo, por lo tanto, lo anterior pudo haber influido en la mortandad de los insectos tratados con dicho antibiótico.

Aunque en el método de película residual también se observó mortandad de *B. cockerelli*, no estuvo directamente correlacionado con la concentración del antibiótico, ya que, para el caso de ampicilina, la dosis más baja (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la más alta (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraron el mismo porcentaje de mortandad (20%). El mecanismo de adquisición del antibiótico no fue exactamente el mismo que con el método de esqueje, lo que puede haber influido el tiempo de contacto que tuvieron los antibióticos en ambos métodos.

Estudios previos con aplicaciones de antibióticos para el control de bacterias emparentadas tipo *Candidatus* prueban que ciertos antibióticos son efectivos para su control. Por ejemplo, Ahmed *et al.*, (2010) mencionan que el efecto *in vivo* de tres antibióticos (ampicilina, tetraciclina y rifampicina) para el control de *Candidatus* Portiera aleyrodidarum en la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) fue efectivo para la eliminación de la bacteria. En el presente trabajo no se observó una correlación directa entre la ausencia de la

bacteria en los insectos al final del bioensayo y la dosis de antibiótico o el método de aplicación usados. Esto pudiera estar relacionado con la saturación de sitios activos de los antibióticos, ya que no necesariamente, al utilizar altas concentraciones de algún sustrato estos tienen que ser efectivos. Esta saturación se debe a que todos los centros activos se encuentran ocupados y, por lo tanto, aparece un efecto de saturación (Harold *et al.*, 2001). Otra razón pudo ser que no necesariamente el insecto adquirió el antibiótico suministrado en todos los tratamientos, ya que este fue un factor importante que no se midió en los insectos.

Las bacterias *Candidatus Liberibacter* spp. son grandes amenazas para muchos de los cultivos a nivel mundial (Tamborindeguy *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, nuestra comprensión de su interacción con plantas y sus vectores psílidos aún es limitado. Muchas de las investigaciones encaminadas a comprender mejor las interacciones planta-*B. cockerelli*-*Candidatus Liberibacter solanacearum* usan o necesitan de una colonia de insectos no infectiva (Sasaki *et al.*, 1990; Ryuichi *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011; Supriyanto y Whittle, 1991; Van Vuuren *et al.*, 1977. De forma natural, en algunos lugares es difícil encontrar insectos libres de *CaLsol*, por lo que se podría desarrollar una colonia libre de la bacteria con la administración de antibióticos. De acuerdo con los resultados de la presente investigación, la aplicación de ampicilina a 2.5 µg/mL y la de tetraciclina a 10 µg/mL mediante el método de esqueje eliminó a *CaLsol* de *B. cockerelli*, mientras que ampicilina a 25 µg/mL, tetraciclina a 75 µg/mL y rifampicina a 7.5 µg/mL eliminaron a *CaLsol* presente en *B. cockerelli* por el método de película residual. Sin embargo, los tratamientos de tetraciclina 10 µg/mL por M.E y ampicilina 25 µg/mL por M.P.R. mostraron mortandad en los insectos, por lo que estas concentraciones no serían tan aptas para obtener una colonia de insectos libres de la bacteria en comparación con las que no mostraron mortandad en los insectos.

Se han utilizado antibióticos para controlar enfermedades bacterianas de árboles frutales (Van Vuuren *et al.*, 1977a). Cerca de 40 antibióticos se han proyectado para el control de enfermedades de las plantas, pero menos de 10 se han usado comercialmente. Se aplicó la combinación de penicilina y estreptomicina para el control de la enfermedad de HLB en cítricos ocasionada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bacteria emparentada

a *CaLsol*, la cual sufrió un efecto en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana observándose un sinergismo positivo entre estos antibióticos (Davies *et al.*, 2007). El HLB es una de las enfermedades más agresivas que ha causado a nivel mundial la muerte de millones de árboles de cítricos, su principal vector es *Diaphorina citri*, insecto vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Se han realizado investigaciones con aplicaciones de antibióticos para el control de la bacteria dirigidas únicamente a partes de la planta (tallos, raíces, yemas, etc.), más nunca, aplicaciones dirigidas directamente al vector para el control de la bacteria (Berg, 1999). Hasta la fecha no existe variedad o portainjerto resistente a la enfermedad. Se han implementado una serie de acciones con la finalidad de controlar o en su caso eliminar a este tipo de bacterias intracelulares, como lo es, el tratamiento térmico, inyección de lisozima y el tratamiento con antibióticos, estos últimos aplicados ya sea por microinyección al vector e inyecciones dirigidas al tronco de algunas especies, por ejemplo, para el control de la bacteria antes citada; y mediante dietas bien definidas. Estas últimas fueron las que se establecieron para el desarrollo de esta investigación donde se aplicaron antibióticos mediante diferentes métodos de administración.

Actualmente, el uso de antibióticos no está permitido en muchos países, principalmente en la comunidad europea, debido a las normas que estos emiten para exportación. En la década de 1950, poco después de la introducción de los antibióticos a la medicina humana, se reconoció el potencial de estos fármacos para controlar las enfermedades de las plantas (Patricia, 1999). Desgraciadamente, la resistencia se evidenció limitando el valor de los antibióticos en la protección de los cultivos, por lo que, en años recientes, el uso de antibióticos en plantas ha sido objeto de debate en varios países. En base a los resultados obtenidos en este estudio, la administración de antibióticos a solanáceas se podría aplicar en las primeras etapas fenológicas de la planta, y a ciertos días, por ejemplo, (floración, amarre de fruto), dejar de aplicar sin que se vean afectados los frutos sin tener problemas de exportación.

CONCLUSIONES

Los tratamientos donde se observó mayor porcentaje de mortandad de insectos fue tetraciclina 10 $\mu\text{g/mL}$ (40%) seguido de ampicilina 10 $\mu\text{g/mL}$ y rifampicina a 0.5, 0.75 y 1 $\mu\text{g/mL}$ (20%) administrados por el método de esqueje. La administración por el método de película residual mostró 20% de mortandad en los insectos en los tratamientos de ampicilina 25 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ y tetraciclina 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para el método de esqueje las concentraciones que eliminaron a *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* fueron ampicilina a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ y tetraciclina a 10 $\mu\text{g/mL}$. En el método de película residual las concentraciones que eliminaron a *Candidatus Liberibacter solanacearum* fueron ampicilina a 25 $\mu\text{g/mL}$, tetraciclina a 75 $\mu\text{g/mL}$ y rifampicina a 7.5 $\mu\text{g/mL}$.

RECOMENDACIONES

Para poder obtener una colonia de *Bactericera cockerelli* libre de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se recomienda utilizar mediante el método de esqueje a ampicilina a una concentración de 2.5 µg/mL, ya que eliminó a *CaLsol* sin que se presentara mortandad de insectos; y para el método de película residual los antibióticos tetraciclina y rifampicina a concentraciones de 75 y 7.5 µg/mL respectivamente, eliminaron a *CaLsol* sin que se presentara mortandad de insectos.

Se recomienda hacer un experimento mediante qPCR cuantificando relativa o absolutamente el cambio de la concentración de la *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli*.

Además, se recomienda hacer un estudio donde se midan las cantidades de los antibióticos en los insectos directamente después de realizar las administraciones, debido a que, el insecto no necesariamente pudo haber adquirido el antibiótico, ya que este fue un factor que no se midió

REFERENCIAS

- Abdullah N. M. (2008). Life history of the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in Controlled environment agriculture in Arizona. African Journal of Agricultural Research Vol. 3 (1), pp. 060-067.
- Aguilar E; Segonda V. G; Bextine B; McCue K. F; Munyaneza J. E. (2013). First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on Tobacco in Honduras. Plant Disease, 97(10), 1376. doi: 10.1094/PDIS-04-13-0453-PDN.
- Ahmed M. Z; Ren S. X; Xia X; Xiao X. L; Gui H. J; Bao L. Q. (2010). Prevalence of Endosymbionts in *Bemisia tabaci* Populations and Their In Vivo Sensitivity to Antibiotics. Curr Microbiol (2010) 61:322–328.
- Alfaro F. A. (2012). “First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot in mainland Spain”. Plant Disease 96: 582.
- Alfaro F. A; Siverio F; Cebrián M. C; Villaescusa F. J; Font M. I. (2012). ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ associated with *Bactericera trigonica* affected carrots in the Canary Islands. Plant Disease, 96, 581–581. DOI:10.1094/pdis-10-11-0878-pdn.
- Arp A; Munyaneza J. E; Crosslin J. M; Trumble J; Bextine B. (2014). A global comparison of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) microbial communities. Environmental Entomology, 43(2):344-352.
- Avilés G. M. C; Garzón T. J. A; Marín, J. A; Caro M. P. H. (2003). El psilido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc.): biología, ecología y su control. En memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México. 21-35 pp.
- Baumann P; Moran N. A; Baumann L. (2000). Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. In: Dworkin M (ed) The prokaryotes. Springer, New York.
- Becerra A. F. (1989). Biología de *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) y su relación con la enfermedad del “Permanente del tomate” en el Bajío”. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Ciencias Químicas. p 55.
- Berg M. V. (1999). Measures to reduce citrus psilla populations and the spread of greening disease. Neltropika Bulletin.;303:3-6.
- Bové J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7-37.
- Bové J. M. (2014). Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide. Phytoparasitica, 42(5), 579-83.

- Bravo L. G. A; Galindo, G. G; Amador, D. R. M. (2006). Tecnología de Producción de Chile Seco. (INIFAP) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Nacional Norte Centro. Campo Experimental Zacatecas. 5:110.
- Buchner P. (1965). Endosymbioses of Animals with Plant Microorganisms. Chichester: Wiley.
- Burckhardt D; Lauterer, P. (2007). A taxonomic reassessment of the trioqid genus *Bactericera* (Hemiptera: Psylloidea). *Journal of Natural History*. 31: 99-153.
- Butler C. D; Trumble J. T. (2012). The potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae): life history, relationship to plant diseases, and management strategies. *Terr. Arthropod Rev.* 5: 87-111.
- CABI, (2018). Compendio de especies invasoras. *Bactericera cockerelli* (psílido de tomate/patata) Consulta: 31 de agosto 2019. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45643#totaxonomicTree>.
- CABI, (2019). Compendio de especies invasoras *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Consulta 15 de septiembre 2019. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/10943>.
- Cadena H. M. A; Guzmán P. R; Díaz M; Zavala T. E; Almeyda L. H; López H. D; Rivera A. P; Rubio C. O. (2003). Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) en Valles Altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 248-258.
- Camacho T. M; Rojas M. R. I; Zavaleta M. E; Hernández D. M. G; Carrillo S. J. A; Rebollar A. A; Ochoa M. D. L. (2011). Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *Journal Plant Pathology*, 93(2) 331-335. Recuperado de http://www.jstor.org/stable/41999003?seq=1#page_scan_tab_contents.
- Campbell E. A; Korzheva N; Mustaev A; Murakami K; Nair S; Goldfarb A; Darst S. A. (2001). Mecanismo estructural para la inhibición rifampicina de la ARN polimerasa bacteriana, 104: 901-912.
- Chopra I; Roberts M. (2001). Los antibióticos de tetraciclina: modo de acción, aplicaciones, la biología molecular y la epidemiología de la resistencia rnal bactericidas. *Microbiol Mol Biol Rev*, sesenta y cinco: 232 260.
- Cicero J. M; Brown J. K; Roberts P. D; Stansly P. A. (2009). The Digestive System of *Diaphorina citri* and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Source: Annals of the Entomological Society of America*, 102(4):650-665.
- Cranshaw W. S. (2007). Potato or tomato psyllids. *Insects Series Home and Garden*. No. 5: 540.

- Crawford D. L. (1911). American Psyllidae III. (Triozinae). *Pom J. Entomol.* 3: 422-453.
- Crosslin J. M; Munyaneza J. E. (2009). Evidence that the zebra chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and in vitro. *American Journal Potato of Research.*
- Crosslin J. M; Munyaneza J. E; Brown J. K; Liefting L. W. (2010). Potato zebra chip disease: A phytopathological tale, Online. *Plant Health Progress.* Doi:10.1094/PHP-2010-0317-01-RV.
- Crosslin J. M; Lin H; Munyaneza J. E. (2011). Detection of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc), by conventional and real-time PCR. *Southwestern Entomologist*, 36, 125- 135. DOI: org/10.3958/059.036.0202.
- Daniel R. S; Brooks M. A. (1972). Intracellular bacteroids: electron microscopy of *Periplaneta americana* infected with lysozyme. *J Exp Parasitol*, 31:232–46.
- Davies T. A; Página M. G; Shang W; Andrew T; Kania M; Bush K. (2007). La unión de ceftobiprole y comparadores a las proteínas de unión a penicilina *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Steotococos neumonia*. *Antimicrobiol. Agentes Chemother.* 51: 2621-2624.
- Davis M. J; Mondal S. N; Chen H; Rogers M. E; Brlansky R. H. (2008). Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Disease*, 92(11), 1547-1550. doi: 10.1094/PDIS-92-11-1547.
- Delgado O. J. C; Beltrán B. M; Cerna C. E; Aguirre U. L.A; Landeros F. J; Rodríguez P. Y; Ochoa F. Y. M. (2019). *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: Diagnostico y control. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Bilógicas*, 22: 1-12, 2019. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177.
- Douglas A. E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol Rev.* 69:409–34.
- Douglas A. E. (1992). Requirement of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) for their symbiotic bacteria. *Ent Exp Appl.* 65:195–8.
- Doyle J. J; Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Dufor M. L. (1833). Recherches anatomiques et physiologiques surles Hemipteres, accompagnées de considerations relatives a Ôhistoire naturelle et a la classifcation de ces insect. *Mem. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg, France.*

- Dworkin R. J; Sande M. A; Lee B. L. (1989). Treatment of right-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users with ciprofloxacin and rifampicin. *Lancet*. 2 (8671):1071-3.
- Elizalde B; Adriana L. (2016). Efecto de la radiación UV-B sobre plantas de *Solanum tuberosum* L. (papa) infectadas con *Candidatus Liberibacter*.
- EPPO (2013). "*Candidatus Liberibacter solanacearum*". 43(2), 197-201.
- EPPO (2013a). European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Bactericera cockerelli*. EPPO Bulletin 43(2): 202–208.
- Flores O. A; Alemán N. I; Notario Z. M. (2004). Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. Memorias de Simposio Punta Morada de la Papa, 40-63.
- Flores O. A. (2013). Etiología, Detección Molecular y Manejo Integrado del Síndrome de la Punta Morada de la Papa en México. XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Revista Mexicana de Fitopatología., Vol. 31.
- Garza E. U; Rivas A. M. (2003). Manejo integrado de las plagas del chile y jitomate en la zona de San Luis Potosí. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Ébano. Folleto para productores Num 5. San Luis Potosí, México. p 47.
- Garzón T. J. A; Garzón C. J. A; Velarde F. S; Marín J. A; Cárdenas V. O. G. (2005). Ensayos de transmisión de fitoplasma asociado al “Permanente del tomate” por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. En México. *Entomologia Mex.* (4). México. P: 672-675.
- Garzón T. J. A; Garzón C. J. A; Velarde F. S; Marín, J.A; Cárdenas V. O. G. (2005a). Ensayos de transmisión de fitoplasma asociado al “Permanente del tomate” por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. En México. *Entomologia Mex.* (4). México. P: 672-675.
- Garzón T. J. A; Cárdenas V. O. G; Bujanos M. R; Marín J. A; Becerra F. A; Velarde F. S; Reyes M. C; González C. M; Martínez C. J. L. (2009). Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad “permanente del tomate” en México. *Agricultura Técnica en México*. *Agricultura Técnica en México*, 35, 58-69. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S056825172009000100006&lng=es&nrm=iso.
- Garzón T. J. A; Cárdenas, V. O. G; Bujanos M. R; Marín J. A; Becerra F.A; Velarde F. S; Reyes M. C; González C.M; Martínez C. J. L. (2009a). Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad “permanente del tomate” en México. *Agricultura Técnica en México*, 35, 58-69. Disponible en línea:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568251720090001000006&lng=es&nrm=iso.

- Ghedini E; Hailemariam T; DePasse J. V; Zhang X; Oksov Y. (2009). *Brugia malayi* Gene Expression in Response to the Targeting of the *Wolbachia* Endosymbiont by Tetracycline Treatment. PLoS Negl Trop Dis 3(10): e525. doi:10.1371/journal.pntd.0000525.
- Goodman R. N. (1959). The influence of antibiotics on plants and plant disease control. Pages 322-448 in: Antibiotics: Their Chemistry and Non-Medical Uses. H. S. Goldberg, ed. D. van Nostrand and Company, Inc., Princeton, NJ.
- Goolsby J. A; Adamczyk J. J; Bextine B. E; Munyaneza J. E; Bester G. (2007). Development of an IPM program for management of the potato psyllid to reduce incidence of zebra chip disorder in potatoes. Subtrop. Plant Sci. J., 59:85-94.
- González C. A; Villavicencio G. E. E; Torres T. M. A; Zamora V. V. M; Almeyda L. H. I. (2014). Effect of antioxidants and sines in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) infected with *Candidatus Liberibacter solanacearum* under greenhouse conditions. Revista Colombiana de Biotecnología, 16(2), 114-121.
- Gottwald T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. Annu. Rev. Phytopathol. 48:119-139.
- Haapalainen M. (2014). "Biology and epidemics of 'Candidatus Liberibacter' species, psyllid-transmitted plant pathogenic bacteria". Ann. Appl. Biol. 165: 172-198.
- Haapalainen M 2014a. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. Annals of applied biology, 165, 2, 172-198. doi: 10.1111/aab.12149.
- Haapalainen M; Wang J; Latvala S; Lehtonen M. T; Pirhonen M; Nissinen A. I. (2018). Genetic variation of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' haplotype C and identification of a novel haplotype from *Trioza urticae* and stinging Nettle. Phytopathology, 108 (8), 925-934. DOI: 10.1094/PHYTO-12-17-0410-R.
- Hansen A. K; Trumble J. T; Stouthamer R; Paine T.D. (2008). A new Huanglongbing species, "Candidatus Liberibacter psyllauros", found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericerca cockerelli* (Sulc). Applied and Environmental Microbiology, 74, 5862- 5865. DOI:10.1128/AEM.01268-08
- Harold K; Walter H; Roschan E. (2001). Principios de farmacología médica 6ª edición Ed: Oxford.
- Hodkinson I. D. (2009). Life cycle variation and adaptation in jumping lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea). A global synthesis. J. Nat. Hist. 43: 65-179.

- Houk E. J; Griffiths G. W. (1980). Intracellular symbiotes of the homoptera. *Annu Rev Entomol* 25: 161–187.
- Ishikawa H; Yamaji M. (1985). Protein synthesis by intracellular symbionts in two closely interrelated aphid species. *Biosystems* 17: 327–335.
- Jagoueix S. (1994). “The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus Is a Member of the "Subdivision of the Proteobacteria”. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379–386.
- Jagoueix S; Bové J. M; Garnier M. (1994). The Phloem Limited Bacterium of greening disease of citrus is a Member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 44:379-386.
- Koga R; Tsuchida T; Fukatsu T. (2007). Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc R Soc Lond B* 270: 2543–2550.
- Lagunes T. A; Villanueva J. (1994). Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos, Edo de México. 264 pp.
- Liefting L. W; Pérez E. Z. C; Clover G. R. G; Anderson J. A. D. (2008). A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92(10), 1474. doi: 10.1094/PDIS-92-10-1474A.
- Liefting L. W; Sutherland P. W; Ward L. I; Paice K. L; Weir B. S; Clover G. R. G. (2009). A new, *Candidatus Liberibacter* species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*. 93 (3): 208-214.
- Liefting L. W. (2009a). “*Candidatus Liberibacter solanacearum* associated with plants in the family solanaceae”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2274-2276.
- Lin H; Doddapeneni H; Munyaneza J. E; Civerolo E. L; Sengoda V. G; Buchman J. L; Stenger D. C. (2009). “Molecular characterization and phylogenetic analysis of 16S RNA from a new *Candidatus Liberibacter* strain associated with zebra chip disease of potato (*Solanum tuberosum*) and the potato psyllid (*Bactericera cockerelli* Sulc)”. *Journal of Plant Pathology* 1:215-219. En línea: <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0109/010927.pdf>. Septiembre 2015.
- Lin H; Islam M. S; Bai Y; Wen A; Lan S; Gudmestad N. C; Civerolo E. L. (2012). Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ strains in the United States and Mexico revealed by simple sequence repeat markers. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 297–308. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9874-3>.
- List G. M. (1935). Psyllid yellows of tomatoes and control of the psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) by the use of sulfur. *Journal of Economic Entomology*. 28: 431-436.

- Liu D. G; Trumble J. T. (2007). Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) Entomologia Experimentalis et applicata 123 (1): 35-42.
- Lorus M; Marguery M. (1980). Field guide to North American insects and apider. Natioanal Audubon Society. Alfred, A. Knopf, New Cork. p 499.
- Marín J. A; Garzón T. J. A; Becerra F. A; Mejía A. C; Bujanos M. R; Byerly M. K. F. (1995). “Ciclo biológico y morfología del salerillo *Paratrioza cockerelli* (Sulc. (Homoptera: Psyllidae) vector de la enfermedad permanente del jitomate en el Bajío”. Catie, Manejo Integrado de Plagas, Revista Técnica No. 38, 25-32 p.
- Marín J. A. (2004). Biología, ecología e identificación de insectos vectores en cultivo de papa. Memoria de la XXI Semana Internacional del Parasitólogo: Simposium, Punta Morada de la Papa, Saltillo, Coahuila, México. Pp 84-96.
- Melgoza V; León S; López V; Hernández E; Velarde F; Garzón T. (2018). Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 9 número 3.
- Mendoza H. A; Lévy J; Harrison K; Yao J; Ibanez F; Tamborindeguy C. (2018). Infection by ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ haplotypes A and B in *Solanum lycopersicum* ‘MoneyMaker’. Plant Disease, 102, 2009-2015. DOI: 10.1094/PDIS-12-17-1982-RE.
- McManus P. S; Stockwell O. V; Sundin W. G; Jones L. A. (2002). Antibiotics use in plant agriculture. Annu. Rev. Phytopathol (40): 443-465.
- McManus P. S; Jones A. L. (1994). Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. Phytopathology 84:627-633.
- Morris J. (2017). “Novel *Candidatus Liberibacter* species identified in the Australian eggplant psyllid, *Acizzia solanicola*”. Microb. Biotechnol. 10: 833–844.
- Munyanza J. E; Crosslin J. M; Upton J. E. (2007). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “Zebra chip”, a new potato disease in Southwestern United States and Mexico. J. Econ. Entomol. 100: 656-663.
- Munyanza J. E; Crosslin J. M; Upton J. E. (2007a). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “Zebra chip”, a new potato disease in Southwestern United States and Mexico. J. Econ. Entomol. 100: 656-663. }
- Munyanza J. E; Goolsby J. A; Crosslin J. M; Upton J. E. (2007b). Further evidence that zebra chip potato disease in the lower Rio Grande Valley of Texas is associated with *Bactericera cockerelli*. Subtropical Plant Science, 59, 30– 37.

Disponible en línea: www.subplantsci.org/wp-content/uploads/2016/02/SPSJ-59-30-37-Munyaneza-et-al.pdf.

- Munyaneza J. E; Sengoda V. G; Crosslin J. M; De la Rosa L. G; Sánchez A. (2009). First Report of '*Candidatus Liberibacter psyllae*' in Potato Tubers with Zebra Chip Disease in Mexico. *Plant Disease*, 93(5), 552–552. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0552A>.
- Munyaneza J. E; Sengoda V. G; Garzón T. J. A; Cárdenas V. O. G. (2009a). First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in pepper plants in Mexico. *Plant Disease*, 93, 1076. DOI: [org/10.1094/PDIS-93-10-1076B](https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1076B).
- Munyaneza J. E. (2010). "Psyllids as vectors of emerging bacterial diseases of annual crops". *Southwestern Entomologist*, 35(3):471-477.
- Munyaneza J. E; Fisher W. J; Sengoda G. V; Garczynski F. (2010a). First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" associated with psyllid affected carrots in Europe. *Plant Disease*, 94, 639. DOI: [org/10.1094/PDIS-94-5-0639A](https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0639A).
- Munyaneza J. E. (2012). "Zebra Chip Disease of Potato: Biology, Epidemiology, and Management". *Am. J. of Potato Res.* 89: 329-350.
- Murray R. G. E; Schleifer K. H. (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 44:174.
- Murray R. G. E; Stackebrandt E. (1995). Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described Procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 45:186-187.
- Nachappa P; Levy J; Pierson E; Tamborindeguy C. (2011). Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Microbiology* 62: 1510-1520.
- Nachappa P; Levy J; Pierson E; Tamborindeguy C. (2011a). Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Current Microbiology*, 62(5), 1510-1520. doi: [10.1007/s00284-011-9885-5](https://doi.org/10.1007/s00284-011-9885-5).
- Nachappa P; Shapiro A. A; Tamborindeguy C. (2012). Effect of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), on tomato. *Phytopathology*, 102(1), 41-46. doi: [10.1094/PHTO-03-11-0084](https://doi.org/10.1094/PHTO-03-11-0084).
- Nachappa P; Levy J; Pierson E; Tamborindeguy C. (2014). Correlation between "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" infection levels and fecundity in its psyllid vector. *Journal Invertebrate Pathology*, 115, 55-61. doi: [10.1016/j.jip.2013.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.008).

- Nardon P; Grenier A. M. (1988). Genetical and biochemical interactions between the host and its endocytobionts in the weevils *Sitophilus* (Coleoptera, Curculionidae) and other related species. In: Scannerini S, Smith D, Bonfante-Fasolo P, Gianinnazzi-Pearson V, editors. Cell to Cell Signals in Plants, Animal and Microbial Symbioses, vol. H17, NATO ASI Series. Berlin: Springer, 255–270.
- Olivas A. F. (2013). Etiología, Detección Molecular y Manejo Integrado del Síndrome de la Punta Morada de la Papa en México. Retrieved from <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/procariontes/2AlbertoFloresOlivas.pdf>.
- Palomo J. L; Siverio F; Cubero J. (2017). *Candidatus* Liberibacter: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. Fitopatología. Publicación Oficial de Sociedad Española de Fitopatología.
- Palomo J. L; Siverio F; Cubero J. (2017a). *Candidatus* Liberibacter: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. <https://www.researchgate.net/publication/323178654>.
- Palomo J. L; Siverio F; Cubero J. (2017b). *Candidatus* Liberibacter: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. Fitopatología. Publicación Oficial de Sociedad Española de Fitopatología.
- Palomo J. L; Siverio F; Cubero J. (2017b). *Candidatus* Liberibacter: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. <https://www.researchgate.net/publication/323178654>.
- Patricia S. M. (1999). Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas. *Apua. Eenf Infec y Microbiol*;19(4):192-6.
- Pavlista A. D. (2002). Potato (Tomato) Psyllids. *Nebraska Potato Eyes*. 4: 1-4.
- Percy D. M. (2003). Legume-feeding psyllids (Hemiptera: Psylloidea) of the Canary Islands and Madeira. *Journal of Natural History*. 37: 397-461.
- Perez G. O; Sanchez P. S. (2017). Compatibility in Vitro and in Vivo of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Hirsutella citriformis* with Selected Insecticides. Source: *Southwestern Entomologist*, 42(3):707-718. doi:10.3958/059.042.0309.
- Pletsch D. J. (1947). The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) its biology and control. *Montana Agric. Exp. Stn. Bull.* 446: 95.
- Poghosyan A; Lebsky V. (2009). Microscopía electrónica de barrido: una herramienta esencial para el diagnóstico de fitoplasmas. Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Baja California, México.

- Rahbe Y; Delobel B; Febvay G; Chantegrel B. (1994). Aphid-specific triglycerides in symbiotic and aposymbiotic *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochem Mol Biol* 24: 95–101.
- Ravindran A; Lévy J; Pierson E; Gross D.C. (2011). Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Plant Disease*, 95, 1542-1546. DOI: org/10.1094/PDIS-05-11-0386.
- Richards B. L. (1928). A new and destructive disease of the potato in Utah and its relation to potato psylla. 18: 140-141.
- Rowe J. A; Knowlton G. F. (1935). Studies upon the morphology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc.). *Utah Acad. Sci. Arts. Lett.* 12: 223-239.
- Rubio C. O. A; Almeyda L. I. H; Moreno J. I; Sánchez S. J. A; Sosa R. F; Borbon S. J. T, Hernández C. D; Garzón T. J. A; Rodríguez R. R; Cadena H. M. A. (2006). Distribution of potato purple top and *Bactericera cockerelli* Sulc. in the main potato production zones in Mexico. *Agricultura Técnica en México*. 32, 201–211.
- Rubio C. O. A. (2016). Assessing zebra chip resistance of advanced potato clones under field conditions in the Toluca valley, Mexico. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 19(2), 18-28.
- Ryuichi K; Tsutomu T; Makiko S; Takema F. (2007). Selective elimination of aphid endosymbionts: effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences. Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.
- Sasaki T; Aoki T; Hayashi H; Ishikawa H. (1990). Amino acid composition of the honeydew of symbiotic and aposymbiotic pea aphids *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol.* 36:35–40.
- Sánchez R. S. (2010). Respuesta antioxidante al tratamiento con ácido salicílico en plantas de papa infectadas con fitoplasma. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo de México. Pp. 3-48.
- Schneider H. (1968). Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathology.*, 58: 1155-1160.
- Secor G. A; Rivera V. V (2004). Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Rev. Latinoamericana Papa*. 2004, Suppl. 1:1-8.
- Secor G. A; Rivera V. V; Abad I. M; Lee G. R. G; Clover L. W; Liefting X; Li De Boer S. H. (2009). Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra

chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease*. 93: 574–583.

Shelton A. M; Badenes F. R. (2006). Concepts and applications of trap cropping in pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 51:285-308.

Shteinberg D; Zilberstaine M; Oppenheim D; Herzog Z; Manulis S; Shwartz H; Kritzman G. (2001). Efficacy of oxolinic acid and others bactericides in suppression of *Erwinia amylovora* in Pear orchads in Israel. *Phytoparasitica* 29: 143-154.

Siverio F. (2017). “Survey of huanglongbing associated to ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in Spain: analyses of citrus plants and *Trioza erytrea*”. *Phytopathologia mediterranea* 56: 98–110.

Spratt B; Cromie K. (1988). las proteínas de unión a penicilina de bacterias gram-negativas. *Rev Infect Dis* 10: 699-711.

Sulc K. (1909). *Trioza cockerelli* nsp. A novelty front North America, being also of economic importance. *Acta Society Entomologia Bohemiae.* 6: 102-108.

Supriyanto A; Whittle A. M. (1991). Citrus rehabilitation in Indonesia. Pages 409-413 in: Proc. 11th Conf. IOCV. IOCV. Riverside, CA.

Tamborindéguy C; Huot O. B; Ibanez F; Levy J. (2017). The influence of bacteria on multi-trophic interactions among plants, psyllids and pathogen. *Insect Sci.*

Tanaka F. A. O; Coletta-Filho H. D; Alves K. C. S; Spinelli M. O; Machado M. A; Kitajima E. W. (2007). Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in phloem vessels of experimentally infected *cataranthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatologia Brasileira*, 32(6), 519-519.

Thao M. L; Moran N. A; Abbot P; Brennan E. B; Burckhardt D. H; Baumann P. (2000). Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Applied Environmental Microbiology*, 66(7), 2898-2905. doi: 10.1128/AEM.66.7.2898-2905.2000.

Teresani G. R. (2014). “Association of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a real-time PCR method for it detection”. *Phytopathology* 104: 804-811

Teixeira C.D; Saillard C; Eveillard S; Danet L.J; Da Costa P; Ayres J.A; Bové J. (2005). “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1857–1862. DOI:10.1099/ijs.0.63677-0.

- Teulon D. A. J; Workman P. J; Thomas K. L; Nielsen M. C. (2009). *Bactericera cockerelli*: incursion, dispersal and current distribution on vegetable crops in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 62, 136-144.
- Van Vuuren S. P. (1977). The determination of optimal concentration and pH of tetracycline hydrochloride for trunk injection of greening-infected citrus trees. *Phytophylactica* 9:77-81.
- Van Vuuren S. P; Moll J. N; Da Graca J. V. (1977a). Preliminary report on extended treatment of citrus greening with tetracycline hydrochloride by trunk injection. *Plant Dis. Rep.* 61:358-359.
- Venkatesan G. S; Munyaneza J. E; Crosslin J. M; Buchman J. L; Pappu H. R. (2010). Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip disease of potato. *Ame. J. Potato Res.* 87:41-49.
- Virgen G. C. (2010). Control químico de bacterias fitopatógenas. III Simposio Nacional y II Internacional de Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara, Jalisco, México 28 y 29 de septiembre de 2010.
- Waksman S. A. (1996). Antibiotics today. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 42:623-632.
- Wallis, R. L. (1951). Potato psyllid selection of host plants. *J. Econ. Entomol.* 44: 815-817.
- Wallis R. (1955). Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. USDA Technical Bulletin No. 1107: 25 pp.
- Wang N; Pierson E. A; Setubal J. C; Xu J; Levy J. G; Zhang Y. Z; Li J. Y; Rangel L. T; Martins J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 451-482.
- Wen A; Mallik I; Alvarado V. Y; Pasche J. S; Wang X; Li W; Levy L; Lin H; Scholthof H; Mirkov, E; Rush C. M; Gudmestad N. C. (2009). Detection, distribution, and genetic variability of '*Candidatus Liberibacter*' species associated with the zebra complex disease of potato in the North America. *Plant Dis.* 93:1102-115.
- Wharton D. R; Lola J. E. (1969). Lysozyme action on the cockroach *Periplaneta americana* and its intracellular symbionts. *J Insect Physiol*, 15:1647-58.
- Whitehead L. F; Douglas A. E. (1993). A metabolic study of *Buchnera*, the intracellular bacterial symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Gen Microbiol.* 139:821-6.
- Woodcock J; Moazed D; Cannon M; Davies J; Noller H. F. (1991). Interaction of antibiotics with A- and P- sites specific bases in 16S ribosomal RNA. *The EMBO Journal* 10: 3099-3103.

- Xiang B; Tong X. (2009). Life History and Life Tables of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) on Eggplant and Bell Pepper. *Environmental Entomology*. doi.org/10.1603/022.038.0619.
- Zhang M. Q; Powell C. A; Zhou L. J; He Z. L; Stover E; Duan Y. P. (2011). Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in planta. *Phytopathology* 101:1097-1103.