

UNIVERSIDAD ATÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



“TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA DE “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”
POR “*Bactericera cockerelli*” (Sulc) EN PAPA.

TESIS

Que presenta KAREN BERENICE GARCÍA CONDE
Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2019

“TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA DE “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”
POR “*Bactericera cockerelli*” (Sule) EN PAPA.

Tesis

Elaborada por KAREN BERENICE GARCÍA CONDE como requisito parcial para obtener
el grado de Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación
del Comité de Asesoría

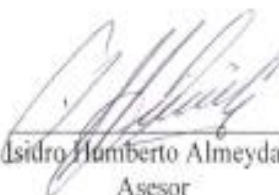


Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor Principal



Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza
Asesor

Dr. Gustavo Alberto Frías Treviño
Asesor



Dr. Isidro Humberto Almeyda León
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado

UAAAN

Agradecimientos

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

A esta gran casa de estudios y mi **Alma Mater** la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por haberme permitido lograr un mejor desarrollo en mi camino profesional.

A el **Dr. Alberto Flores Olivas** por la confianza otorgada al darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación. Porque, con cada una de sus enseñanzas, palabras de aliento y apoyo me demostró que con esfuerzo, dedicación y confianza puedo lograr un gran crecimiento profesional.

A la **Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza** por su apoyo en momentos donde ni yo misma creía poder con el trabajo, por su comprensión y paciencia, pero sobre todo por los conocimientos brindados durante este periodo de desarrollo profesional.

A el **Dr. Alberto Frías Treviño** por su apoyo en mi desarrollo profesional y por ser parte en este trabajo de investigación.

A el **Dr. Isidro Humberto Almeyda León** por su disponibilidad en la aclaración de dudas durante esta investigación, por recibirme en el INIFAP prestando sus instalaciones para el desarrollo experimental de esta investigación, como por cursos impartidos en dichas instalaciones.

A todos los maestros que me influyeron en mi aprendizaje mediante sus conocimientos durante esta etapa de formación profesional, pues gracias a cada uno de ellos puedo decir que mi estancia en esta maravillosa universidad fue amena y de gran provecho.

A mis compañeros y amigos **Dolores Barranco, Ulises Hernández, Néstor Aguilera, José Luis Guerra** y **Enrique García** por ayudarme cuando más lo necesitaba, por su apoyo, comprensión y sobre todo por su amistad, haciendo más agradable este periodo de formación, puedo decir que ustedes también me enseñaron muchas cosas en el ámbito personal y profesional. Gracias por todos esos momentos y por brindarme su amistad.

A cada una de las personas que se cruzaron en mi camino y me hicieron ver que las cosas no siempre son fáciles, que siempre puedes superarte día a día.

Dedicatoria

Principalmente a **Dios** por darme la fortaleza y fe que necesitaba para seguir adelante y no darme por vencida en ningún momento de mi vida.

A mis padres, **Ma Irene Conde García** y **Raúl García Rodríguez** por sus palabras de aliento y su apoyo constante e incondicional, aprecio y guardo cada uno de sus consejos, gracias a ustedes y sus enseñanzas soy esta mujer que logra lo que se propone y sabe el valor de las cosas, al enseñarme que las cosas cuestan y que si fueran fáciles cualquier persona las haría. Quiero que se sientan orgullosos porque este logro no solo es mío si no también es de ustedes.

A mi hermana **Tania Alejandra García Conde** por siempre estar ahí para apoyarme y enseñarme que puedo ser mejor cada día, por regañarme cuando no hago las cosas como debería, al ser la menor tú me has enseñado más que todos, tu carácter recio y fuerte, aunque yo siempre diré que eres mi niña.

A mi Familia por siempre alentarme a seguir adelante y decirme que se sienten orgullosos de mí, por sus palabras de apoyo y sus enseñanzas que me han sido útiles en mi vida personal y profesional.

A mi tía **Leandra Leonarda Conde García** y a mi tío **José García Rodríguez** dos personas muy importantes que se han convertido en mis ángeles, que extraño y quiero con todo mi corazón, ¡hasta donde estén mil Gracias!

Índice General

Agradecimientos.....	II
Dedicatoria	III
Índice General.....	IV
Lista de Cuadros	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Resumen	XI
Abstract	XIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo General	2
Objetivos Específicos	2
HIPÓTESIS	2
REVISION DE LITERATURA	3
Cultivo de Papa.....	3
Importancia de la papa a nivel mundial.....	3
Importancia de la papa en México	4
Principales plagas y enfermedades del cultivo de papa.....	5
Etiología de Zebra Chip/Punta Morada	6
“ <i>Candidatus Liberibacter</i> ”.....	6
“ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”: Patogeno Asociado a Zebra Chip.	7
Ubicación Taxonomica de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”.....	10
Distribucion y haplotipos de “ <i>Candidatus Loberibacter soanacearum</i> ” (<i>CaLso</i>)	10
“ <i>Candidatus Phytoplasma spp.</i> ”: Patogeno asociado a Punta Morada de la Papa.....	11
Ubicación Taxonomica de “ <i>Candidatus Phytoplasma spp.</i> ”:	12
Vectores asociados a la transmisión de fitoplasmas causantes de Punta Morada de la Papa	13
Importancia Economica de Zebra Chip/Punta Morada.....	13

“ <i>Bactericera cockerelli</i> ”: Vector de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	14
Clasificación Taxonomica de “ <i>Bactericera cockerelli</i> ”	15
Ciclo Biológico <i>Bactericera cockerelli</i>	16
Huevecillo.....	17
Estadios Ninfales.....	18
Adultos	19
Distribución:	20
Transmisión de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ” y “ <i>Candidatus Phytoplasma spp.</i> ”	20
Transmisión Horizontal: Planta infectada-Vector-Planta sana	21
Transmisión Vertical: Transovarica	22
Métodos de Diagnóstico	23
Diagnóstico Macroscópico.....	23
Diagnóstico Microscópico	24
Diagnóstico Molecular	26
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Ubicación del experimento.....	29
Obtención del material biológico.....	29
Obtención de los psilidos.....	29
Obtención del material vegetal.....	29
Desarrollo de los Experimentos de Transmisión.....	30
Establecimiento de la colonia de <i>B. cockerelli</i>	30
Transmisión de “ <i>Candidatus Phytoplasma spp.</i> ” por <i>B. cockerelli</i>	31
Transmisión transovárica de “ <i>Candidatus Phytoplasma spp.</i> ” y “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	32
Análisis Molecular de Muestras de Tejido Vegetal Insecto	35
Extracción de DNA de Tejido Vegetal.....	35
Extracción de DNA de Insecto.....	36

Extracción de DNA de Huevecillos de <i>B. cockerelli</i>	36
Validación de la Integridad del DNA de “ <i>B. cockerelli</i> ”	37
Detección de “ <i>CaPhy</i> ” Mediante Nested-PCR o PCR Anidado.	37
Detección de “ <i>CaLso</i> ” Mediante PCR en Punto Final.	38
Electroforesis de los Productos de PCR.	38
RESULTADOS	39
Detección de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ” mediante PCR punto final	39
Verificación de la integridad del DNA.....	40
Transmision Transovárica de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ” por “ <i>Bactericera cockerelli</i> ”	41
Transmision de “ <i>Candidatus Phytoplasma spp</i> ” por “ <i>Bactericera cockerelli</i> ”	45
Transmision Transovárica de “ <i>Candidatus Phytoplasma spp</i> ” por “ <i>Bactericera cockerelli</i> ”	47
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS	55

Lista de Cuadros

Cuadro 1 Los 10 países productores de papa más importantes a nivel mundial (FAOSTAT, 2017).....	4
Cuadro 2 Estados de la República Mexicana más importantes en la producción de papa.(SIAP, 2018)	5
Cuadro 3. Ciclo de Biológico de " <i>Bactericera cockerelli</i> ".	16
Cuadro 4 Características principales de cada uno de los estadios ninfales de " <i>Bactericera cockerelli</i> ". (Marín <i>et al.</i> , 1995).....	19
Cuadro 5 Oligonucleótidos reportados para la detección de la región 16S rRNA "CaLsol" mediante PCR y PCR en Tiempo Real. (Delgado <i>et al.</i> , 2019)	26
Cuadro 6 Detección por PCR punto final de "CaLsol" en muestras compuestas de ninfas, adultos de " <i>B. cockerelli</i> " y tejido vegetal de papa, para la determinación de transmisión transovárica.	44
Cuadro 7. Tiempo de eclosión de los huevecillos de " <i>B. cockerelli</i> " y temperatura en la que se desarrollaron cada uno de los cinco bioensayos	44

Lista de Figuras

Figura 1 Patrón rayado necrótico en tubérculos de papa freídos, característico de Zebra Chip enfermedad asociada a "*Candidatus Liberibacter solanacearum*".

Figura 2. Síntomas de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" en papa; A) Coloración amarilla-purpura del borde de las hojas, B) Entrenudos cortos, C) Proliferación de yemas axilares, D) Tubérculos aéreos.

Figura 3. Distribución geográfica de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*".

Figura 4. Síntomas característicos de Punta Morada de la Papa asociada a "*CaPhy*"; A) Coloración purpura en hojas de papa; B) Tubérculos aéreos.

Figura 5. Características morfológicas y ubicación en la planta según la etapa de desarrollo de "*Bactericera cockerelli*" vector de "*CaLso*".

Figura 6. Ciclo Biológico de las etapas de desarrollo de "*Bactericera cockerelli*".

Figura 7. Huevecillos de *Bactericera cockerelli*; A) Huevecillos con coloración amarilla, B) Huevecillo observado desde un Microscopio con objetivo a 40 X, C) Huevecillos coloración naranja.

Figura 8. Estadios ninfales de "*Bactericera cockerelli*".

Figura 9 Insecto adulto de "*B. cockerelli*", se puede apreciar como sus alas sobresalen de su cuerpo.

Figura 10. Micrografías donde se puede observar la presencia de "*CaLso*" en zanahoria transmitida por "*B. trigonica*" (Mawassi et al., 2018)

Figura 11. Detección de fitoplasmas por MEB. A) Presencia de fitoplasmas cumpliendo su ciclo biológico en el tejido vascular de la planta. B) Fitoplasmas dispersos en tejidos del tallo de la planta C. pepo L. (Vargas Salinas, 2017)

Figura 12 Colonia de "*B. cockerelli*" en plantas de papa variedad Fianna, establecidas en el Invernadero de Parasitología Agrícola de la UAAAN.

Figura 13 Metodología para el bioensayo de transmisión de "*CaPhy*" por "*B. cockerelli*"

Figura 14. Hoja de papa variedad Fianna con huevecillos de "*B. cockerelli*" sobre cámara húmeda, el peciolo de la hoja cubierto con algodón húmedo y plástico adherente, para conservar la humedad y mantener hidratada la hoja.

Figura 15. Huevecillos de “*B. cockerelli*” en hojas de papa variedad Fianna, de lado derecho se encuentran huevecillos con coloración naranja intenso; de lado izquierdo huevecillos con puntos rojos característica principal de su próxima eclosión.

Figura 16. Metodología del bioensayo de transmisión transovárica de “CaPhy” y “CaLso” por “*Bactericera cockerelli*” partiendo de huevecillos recolectados de una colonia inicial.

Figura 17. Detección de “CaLso” en “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 2-10: Muestras de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Figura 18. Ausencia de “CaLso” en tejido vegetal mediante PCR punto final utilizando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 50pb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-13: Muestras de tubérculos de papa, Carril (-): Control negativo.

Figura 19 Detección del gen COI en huevecillos de “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CO1F3/C01R3. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-8: Muestras de huevecillos de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Figura 20. Detección de “CaLso” en huevecillos de “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-16: Muestras de huevecillos de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Figura 21. Detección del gen COI en huevecillos de “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CO1F3/C01R3. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-8: Muestras de huevecillos de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Figura 22. Ausencia de “CaPhy” en tejido vegetal mediante PCR punto final utilizando los primers P1/P7 y R16F2n/R16R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 50pb, Carril (+): Control positivo, Carriles 2-11: Muestras de tejido vegetal, Carril (-): Control negativo.

Figura 20 Sintomatología presente plantas de papa al mes y medio de la inoculación. A- B) Tubérculos aéreos, C) Yemas axilares, síntomas característicos de características de PMP.

Figura 24 Amplificación de “CaLsol” en muestras de tejido vegetal usando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular de 50 pb, Carril (+): Control positivo, Carril TUB: Tubérculo aéreo, Carril M: Mes, Carril S: 15 días, Carril D: 24 horas, Carril (-): Control negativo.

Figura 25 Ausencia del “CaPhy” en huevecillos de “*B. cockerelli*” con los pares de primers P1/P7 y R16F2n/R16R2. Carriles; 1(MM), 2 control positivo (+), 3 control negativo (-), 4-15 ausencia de bandas de amplificación, 16 control negativo (-), 17 control positivo (+) y 18 (MM). Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador Molecular 1Kb

Resumen

TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA DE “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y
“*Candidatus Phytoplasma spp*” POR “*Bactericera cockerelli*” EN CULTIVO DE
PAPA.

Por

KAREN BERENICE GARCÍA CONDE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS – ASESOR

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2019

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma spp.*”, son patógenos que afectan a diversos cultivos de la familia de las solanáceas dentro de los cuales se encuentra la papa (*Solanum tuberosum* L.). Ambos patógenos se reportan asociados al complejo Zebra Chip (ZC)/Punta Morada de la Papa (PMP) y se ha sugerido que son complementarios, transmitidos por insectos vectores, entre los que se encuentra con mayor frecuencia “*B. cockerelli*”. La transmisión de ambos patógenos se da mediante alimentación directa de plantas infectadas en donde el insecto vector lo adquiere y propaga alimentándose de plantas sanas, generando un ciclo de transmisión constante. Reportes anteriores han sugerido la posible transmisión transovárica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”. Se llevaron a cabo bioensayos con plantas sanas certificadas libres de “CaLso” e insectos de *B. cockerelli* positivos a “CaLso”. En las pruebas de transmisión transovárica de “CaLso” los bioensayos estuvieron bajo condiciones cambiantes en cuestión del entorno y temperatura. Se realizaron cinco bioensayos de transmisión a nivel de invernadero en plantas de papa con huevecillos de “*B. cockerelli*”. Las muestras de los bioensayos fueron procesadas por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para detectar la presencia de la bacteria mediante la amplificación de la región intergénica de los genes 16-23s rRNA. Los resultados obtenidos indicaron la transmisión transovárica de “CaLso” para la primera generación en caso de “CaLso”. A la par del trabajo de transmisión transovárica de “CaLso”, se realizaron pruebas sobre la posible transmisión de fitoplasmas, con el fin de obtener datos para futuros trabajos.

Palabras Clave: *Bactericera cockerelli*, *Candidatus*, *Liberibacter*, transmisión, progenie, PCR

Abstract

TRANSOVARIAL TRANSMISSION OF “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” BY
“*Bactericera cockerelli*” IN POTATO CROP

BY

KAREN BERENICE GARCÍA CONDE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS – ADVISER

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2019

"*Candidatus Liberibacter solanacearum*" and "*Candidatus Phytoplasma* spp.", Are pathogens that affect various crops of the Solanaceae family within which the potato (*Solanum tuberosum* L.) is found . Both pathogens are reported to be associated with the Zebra Chip (ZC) / Potato Purple Top complex and it has been suggested that they are complementary, transmitted by vector insects, among which "*B. cockerelli*" is most frequently found. The transmission of both pathogens occurs through direct feeding of infected plants where the vector insect acquires it and propagates feeding on healthy plants, generating a constant transmission cycle. Previous reports have suggested the possible transovarian transmission of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*". Bioassays were carried out with certified healthy plants free of "*CaLso*" and *B. cockerelli* insects positive to "*CaLso*". In the "*CaLso*" trans-viral transmission tests, the bioassays were under changing conditions in terms of environment and temperature. They made five Transmission bioassays at the greenhouse level in potato plants with "*B. cockerelli*" eggs. Samples of the bioassays were processed by the technique of polymerase chain reaction (PCR), to detect the presence of bacteria by amplification of the intergenic region of the genes 16 -23 s rRNA. The results obtained indicated the transovarian transmission of "*CaLso*" for the first generation in case of "*CaLso*". Alongside the work of transovarial transmission of "*CaLso*", tests were carried out on the possible transmission of phytoplasmas, in order to obtain data for future work.

Key Words: *Bactericera*,

cockerelli, *Candidatus*, *Liberibacter*, transmission, progeny, PCR

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) se encuentra dentro de los cultivos más importantes a nivel mundial al igual que el maíz, frijol, arroz y trigo. El país con mayor producción de papa a nivel mundial es China con 99,147,000 ton/año, México ocupa el lugar 21 a nivel mundial en la producción de papa con 1,796,814 toneladas anuales. Los estados con mayor producción de papa en el país son Sonora, Sinaloa, Puebla, Veracruz y el estado de México.

Este cultivo es susceptible a diversos problemas fitosanitarios provocados por la presencia de nematodos, hongos, virus, bacterias y fitoplasmas. Dentro de las enfermedades de mayor importancia en México se encuentran aquellas que son transmitidas de manera horizontal (planta infectada-vector-planta sana) mediante la alimentación de insectos vectores, como “*Bactericera cockerelli*” (Sulc) y “*Circulifer tenellus*”, transmisores de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (CaLsol) y “*Candidatus Phytoplasma spp.*” (CaPhy), que se comportan como patógenos asociados a las enfermedades Zebra Chip (ZC) y Punta Morada de la Papa (PMP). Algunos reportes han documentado la presencia de “CaLsol” y “CaPhy” como agentes complementarios, lo que implica que ambos patógenos puedan ser transmitidos por el mismo insecto vector. Las pérdidas económicas generadas por el complejo Zebra chip/Punta Morada de la papa van desde un 20 a 60% esto dependiendo del desarrollo de la enfermedad.

La adquisición de la ambos patógenos se puede dar en cualquier etapa de crecimiento de *B. cockerelli*. En la actualidad existen pocos trabajos donde se reporta la posible transmisión transovárica de “CaLsol” por el vector “*B. cockerelli*”, en el caso de “CaPhy” se ha reportado la ~~de~~ presencia de este patógeno en los órganos reproductores de diversos insectos vectores, por lo cual la posibilidad de transmisión transovárica está latente. Por lo tanto, es necesario generar información sobre la transmisión transovárica de ambos patógenos mediante el vector “*B. cockerelli*”

OBJETIVOS

Objetivo General

"Determinar si "*Bactericera cockerelli*" transmite de manera transovárica a "*Candidatus Liberibacter solanacearum*"

Objetivos Específicos

Determinar si "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" se transmiten de manera transovárica.

HIPÓTESIS

"*Candidatus Liberibacter solanacearum*" se transmite de manera transovárica por *Bactericera cockerelli*".

REVISION DE LITERATURA

Cultivo de Papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo perteneciente a la familia de floríferas de las solanáceas, del género *Solanum*, originaria del lago Titicaca en la cordillera de los Andes en América del Sur hace aproximadamente 8000 años. Es una herbácea anual que alcanza una altura de un metro y produce tubérculos(FAO, 2008), su desarrollo se da básicamente en condiciones climáticas tropicales, subtropicales y templados, la temperatura óptima para su crecimiento oscila entre 18 y 20°C. Las características geográficas adecuadas para la producción de papa en relación con la altitud son 1,500 a 2,600 metros sobre el nivel del mar, condiciones de lluvia de 400 a 1,200 mm, con temperaturas que oscilan de 15 a 20 °C y el tipo de suelo más favorable para su cultivo, son aquellos de textura franca, arenosa, alto contenido orgánico, pH de 4.8-5.6 (SIAP, 2019).

Importancia de la papa a nivel mundial

Con el tiempo su consumo ha ido creciendo y su cultivo se ha expandido a todo el mundo, llegando a posicionarse dentro de los cuatro primeros cultivos de mayor importancia después del arroz (*Oriza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.)(FAOSTAT, 2008). A nivel mundial el cultivo de papa atraviesa grandes cambios. Hasta inicios de 1990, cerca del total de la producción mundial se generaba y consumía en Europa, América del norte y otros países de la antigua Unión Soviética(FAO, 2008).

En el año 2007 se registró una producción 314,208,368 tons de papa en el mundo, a comparación del 2017 donde se generaron 388,190, 674 tons, observando un incremento importante en los últimos 10 años. Según datos obtenidos por la FAOSTAT (Cuadro 1) China ocupa el primer lugar en producción a nivel mundial con un total de 99,147,000 toneladas en el 2017, seguido por India con una producción de 48,605,000 tons. (FAOSTAT, 2017)

Cuadro 1. Los 10 países productores de papa más importantes a nivel mundial (FAOSTAT, 2017)

<i>País</i>	<i>Producción (ton)</i>
<i>China</i>	99,147,000
<i>India</i>	48,605,000
<i>Rusia</i>	29,589,976
<i>Ucrania</i>	22,208,220
<i>Estados Unidos de América</i>	20,017,350
<i>Alemania</i>	11,720,000
<i>Polonia</i>	10,215,957
<i>Bangladesh</i>	91,717,33
<i>Francia</i>	7,391,881
<i>Bielorrusia</i>	7,342,203

Por lo tanto, Asia es la región que cuenta con el 47.6% de la producción a nivel mundial, seguida por Europa con 33.4%, América con 11.8%, África con 6.7% y Oceanía con el 0.5%.

Importancia de la papa en México

México a nivel mundial ocupa el lugar 21 en producción de papa con 1,796,814 toneladas anuales con un valor de 10.8 mil millones de pesos, el 29% de la producción se destina a la industria de las frituras, 56% para el mercado en fresco y 15% para la producción especializada de semilla. El cultivo de papa en México tiene un fuerte impacto económico en las zonas rurales, con 8,700 productores de papa en el país, 77,800 familias dependen del sector y se generan 17,500 empleos directos y 51,600 empleos indirectos (CONPAPA, 2018). En México se siembra anualmente un promedio de 68,000 hectáreas, en los ciclos de primavera-verano y otoño-invierno, bajo las condiciones de riego y temporal. La producción de papa se realiza en 24 de los 36 estados de la República Mexicana (Cuadro 2), y los estados con mayor producción Sonora con una producción de 417,742 ton el 2018 seguido por Sinaloa con 386,498, Puebla con 189,595, Edo. de México con 168,898 y Veracruz con 154,707 ton (SIAP, 2018).

Cuadro 2. Estados de la República Mexicana más importantes en la producción de papa.(SIAP, 2018)

<i>Estado</i>	<i>Producción (ton)</i>
<i>Sonora</i>	417,742
<i>Sinaloa</i>	386,498
<i>Puebla</i>	189,595
<i>México</i>	168,898
<i>Veracruz</i>	154,707
<i>Nuevo León</i>	97,899
<i>Baja California Sur</i>	82,148
<i>Chihuahua</i>	60,306
<i>Guanajuato</i>	36,190

Principales plagas y enfermedades del cultivo de papa

En los últimos años el cultivo de papa se ha visto afectado por problemas fitosanitarios relacionados con insectos vectores de patógenos como virus, bacterias y fitoplasmas, causantes de enfermedades de gran importancia, los cuales reducen el rendimiento además de ocasionar la pérdida del valor comercial de la cosecha (Flores *et al.*,2004). Algunos de los problemas fitosanitarios que se pueden llegar a encontrar en la papa son; Tizón tardío (*Phytophthora infestans*), Pudrición seca (*Fusarium* spp.), Costra negra (*Rizoctonia solani*), Zebra Chip (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) y Punta Morada (*Candidatus Phytoplasma* spp.).(INIFAP, 2000).

En México, el complejo Zebra Chip (ZC) y Punta Morada (PM) están asociados con síntomas de amarillamiento causado por el psilido “*Bactericera cockerelli*” (*B. cockerelli*), que son difíciles de diferenciar de los ocasionados por “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (*CaLsol*) y “*Candidatus Phytoplasma* spp.” (*CaPhy*). La transmisión de estos patógenos es realizada por los vectores *B. cockerelli* y “*Circulifer tenellus*” (Olivas, 2013).

Etiología de Zebra Chip/Punta Morada

“*Candidatus Liberibacter*”.

En el siglo XIX la sintomatología causada por este agente era denominada enfermedad de los brotes amarillos, la cual generaba la muerte de cítricos en lapsos cortos de tiempo (Bové, 2006; Zhao, 1981). Para el año de 1994 se llevó a cabo la primera descripción molecular y ubicación taxonómica, mediante el trabajo de extractos del floema de plantas de cítricos infectadas, identificando a organismos parecidos a bacterias (BLO: bacterium-like organism) como un nuevo miembro de la subdivisión de las α -*proteobacterium* de la clase *Proteobacterium* (Jagoueix *et al.*, 1994).

En el año 1994 se propuso la categoría de “*Candidatus*” para bacterias no cultivables que solo podían clasificarse mediante un número limitado de características y para 1995 se implementó para describir el estado provisional de los procariotas descritos de manera incompleta (Murray & Schleifer, 1994; Murray & Stackebrandt, 1995). Posteriormente se sugirió el nombre “*Liberibacter*” (del latín Liber = corteza y bacter = bacteria) para este nuevo grupo de bacterias (Reveles *et al.*, 2016)

En la actualidad se han descrito ocho especies de “*Candidatus Liberibacter*”; *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) el cual cuenta con “*Trioza erytreae*” como insecto vector, “*Candidatus Liberibacter americanus*” (CLam) cuyo vector es un psílido conocido como “*Diaphorina citri*”, “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) a diferencia de las otras especies “CLas”, además de “*Diaphorina citri*”, cuenta con otro vector conocido como “*Cacopsylla citrisuga*” (McClean *et al.*, 1965; Capoor *et al.*, 1967; Teixeira *et al.*, 2005; Cen *et al.*, 2012). Las especies antes mencionadas son las causantes de la enfermedad “Huanglongbing” (HLB) en cítricos (Zhao, 1981). “*Candidatus Liberibacter caribbeanus*” (CLca) cuenta como vector con “*Diaphorina citri*” (Keremane *et al.*, 2015), “*Candidatus Liberibacter europeus*” (CLEu) que se ha asociado con “*Arytainilla spartiophila*”, se ha encontrado que causa síntomas “*Cytisus scoparius*” y en el caso de “*Candidatus Liberibacter brunswickensis*” (CLbr) recientemente se identificó a “*Acizzia solanicola*”, asociada a cítricos como vector de este patógeno, siendo este el primer descubrimiento de una especie perteneciente al género *liberibacter* en Australia y el primer informe de una especie *liberibacter* en el género psílido “*Acizzia*” (Morris *et*

al., 2017). Los hospederos de estos patógenos corresponden a peral y psílicos de berenjena y otras solanáceas, respectivamente. “*Candidatus Liberibacter crescens*” (CLcr), 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 “CL”, aunque no ha sido identificada como patógena de plantas. Finalmente, “*Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLsol) que afecta a solanáceas y apiáceas. El vector de mayor importancia de este patógeno que afecta a solanáceas es “*Bactericera cockerelli*”, insectos que se alimentan del floema de las plantas (Liefing, Sutherland, et al., 2009).

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*”: Patógeno Asociado a Zebra Chip.

Zebra Chip (ZC) documentada por primera vez en Saltillo Coahuila México en 1994 (Munyanza, 2007) esta asociada con “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”(CaLsol) una α -proteobacteria, gram negativa, no cultivable, limitada al floema, que se transmite principalmente por los insectos psílicos, su morfología corresponde a la de un bacilo, con dimensiones de 0.2 μm de ancho y 4 μm de largo (Hansen *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009; Sengoda *et al.*, 2010). Se considera muy invasivo debido a su capacidad de ser transportado principalmente en psílicos infecciosos. La imposibilidad de “CaLsol” para 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.*, 2017).

ZC se caracteriza principalmente por un patrón rayado necrótico (Figura 1) producido en los tubérculos generados por plantas infectadas (Munyanza *et al.*, 2009a). Los tubérculos infectados recién cortados muestran un ennegrecimiento de los tejidos vasculares y rayas en los tejidos de los rayos medulares probablemente asociados con aumentos en los niveles de fenol y polifenol oxidasa (Wallis *et al.*, 2012). Los patrones variables comercialmente inaceptables de rayas y manchas claras y oscuras observado en rodajas fritas de tubérculos infectados es probable que sea causado por un aumento en la

reducción de azúcares (es decir, fructosa y glucosa) y aminoácidos (Rashed *et al.*, 2013). Otros de los síntomas presentes de esta enfermedad son retraso en el crecimiento, clorosis, entrenudos hinchados, proliferación de yemas axilares, tubérculos aéreos, pardeamiento del sistema vascular, hojas quebradizas y muerte prematura en plantas (Figura 2) (Munyaneza *et al.*, 2007a). Los síntomas de amarillamiento y decaimiento, que son confundidas fácilmente con deficiencias nutrimentales, se deben a la acumulación de almidón, indicando una alteración del transporte en el floema debido a la presencia de la bacteria. (Nelson *et al.*, 2013)



Figura 1 Patrón rayado necrótico en tubérculos de papa freídos, característico de Zebra Chip enfermedad asociada a "*Candidatus Liberibacter solanacearum*".



Figura 2. Síntomas de "Candidatus Liberibacter solanacearum" en papa; A) Coloración amarilla-purpura del borde de las hojas, B) Entrenudos cortos, C) Proliferación de yemas axilares, D) Tubérculos aéreos.

Dentro de las condiciones necesarias para la expresión de síntomas por infecciones de "CaLsol" se encuentra la temperatura, siendo un factor importante en el desarrollo de los mismos, por debajo de 17°C retardan el desarrollo de la bacteria y los síntomas de la enfermedad y temperaturas superiores a los 32°C son perjudiciales para la bacteria dado que es susceptible a altas temperaturas (Beltran Beache, 2014; Munyaneza *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que "*B. cockerelli*" se alimenta de hojas, pecíolos y tallos de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annuum*) y papa (*Solanum tuberosum*). La infección de las plantas huésped por "CaLsol" es sistémica: el patógeno se puede encontrar en el tejido superficial y subterráneo de las plantas de papa, pero la distribución es desigual (Levy *et al.*, 2011; Pitman *et al.*, 2011, Drayton *et al.*, 2009). La distribución bacteriana en la planta se verá influenciada por la etapa de crecimiento de la planta y la dirección neta de transporte de masa de la savia del floema (Rashed *et al.*, 2012).

Otra especie de *Candidatus Liberibacter* fue encontrada en Texas y California en poblaciones de psílidos de “*B. cockerelli*”, la cual se nombró “*Candidatus Liberibacter psyllaourous*” (“CaLps”). Los psílidos se colectaron en cultivos de papa y jitomate con síntomas de amarillamiento y se confirmó que *B. cockerelli* es el vector de “CaLps” (Hansen et al., 2008). Algunos autores mencionan que “CaLps” está relacionada con “CaLso” y que probablemente se trata de la misma especie (EPPO, 2011; J. E. Munyaneza et al., 2010).

Ubicación Taxonomica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”.

Dominio: Bacterias

Filo: Proteobacterias

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Phyllobacteriaceae.

Género: *Candidatus Liberibacter*

Especie: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CABI, 2013)

Distribucion y haplotipos de “*Candidatus Loberibacter soanacearum*” (CaLso)

Recientemente se han reportado seis haplotipos de “CaLso” A,B,C,D,E y U, identificados en diferentes cultivos con sintomas de infección (Delgado-Ortiz et al., 2019). Este patogeno ataca principalmente a la familia de las solanaceas como chile, tomate y papa, y está asociado a enfermedades economicamente importantes (Teresani et al., 2017).

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*” es una bacteria propagada por diferentes especies de psilidos (Hemiptera: Psylloidea), *Bactericera trigonica*, *Trioza apicalis*, *Trioza urticae* y *Trioza ortiga* vectores de los haplotipos C, D y U en apiaseas como la zanahoria,(Alfaro-Fernández et al., 2012; Haapalainen et al., 2018; Nissinen et al., 2014; Teresani et al., 2017) para el caso de la familia de las solanaceas como la papa y el tomate, la transmision de CaLso de los haplotipos A y B tienen como insecto vector a *Bactericera cockerelli* (Nelson et al., 2011), presentandose en numerosas poblaciones,

teniendo como principal daño el amarillamiento o coloración púrpura en la planta debido a la secreción de una toxina la cual inyecta al momento de alimentarse (Cranshaw, 1993; Olivas, 2013).

En la Figura 3 se puede observar la distribución de los seis haplotipos de “CaLso” en el mundo. Los haplotipos A y B se encuentran en Honduras y Guatemala a través del Oeste de México hasta Arizona, California, Oregón, Washington, Idaho, Nueva Zelanda y desde el este de México hacia el Norte hasta Texas. El haplotipo C, se ha encontrado en Finlandia, Francia, Noruega y Suecia. En el caso del haplotipo D, se ha encontrado en Marruecos y España. El haplotipo E, en Francia, Marruecos y España peninsular. Mientras que el haplotipo U, ha sido detectado recientemente en Finlandia (EPPO, 2019).

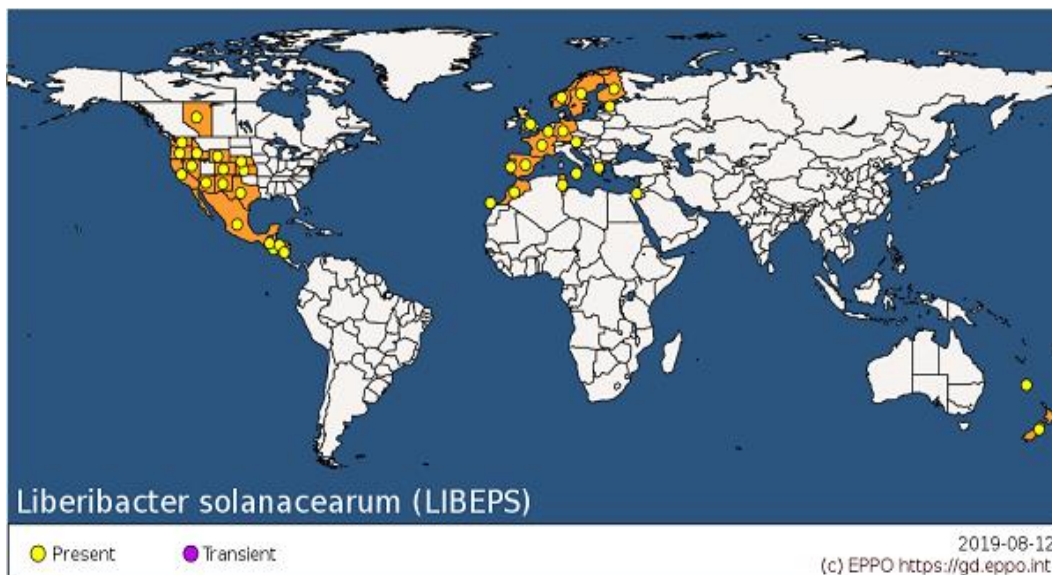


Figura 3. Distribución geográfica de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*".

“*Candidatus Phytoplasma spp.*”: Patógeno asociado a Punta Morada de la Papa.

Punta Morada de la Papa (PMP) refiere a un conjunto de síntomas relacionados con la presencia de fitoplasmas (“*Candidatus Phytoplasma spp.*”) (Cadena *et al.*, 2003; Garzón *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2011), microorganismos procariontes unicelulares, pertenecientes a la clase Mollicutes, los cuales carecen de pared celular y no pueden ser cultivados *in vitro* (Jones, 2002). PMP fue registrada por primera vez en México desde 1948, pero los primeros reportes de la enfermedad fueron hasta 1996 (Cadena, 1996).

Los síntomas característicos de PMP (Figura 4) son achaparramiento de la planta, abultamiento del tallo en los lugares de inserción de las hojas, formación de tubérculos aéreos, en las hojas superiores se presenta una coloración morada, en los tubérculos se presenta necrosidad alrededor y por lo general no brotan, en caso que lo llegaran hacer los brotes son muy delgados o ahilado, y por ultimo muerte prematura de las plantas (Almeyda *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2011).



Figura 4. Síntomas característicos de Punta Morada de la Papa asociada a "CaPhy"; A) Coloración purpura en hojas de papa; B) Tubérculos aéreos.

Las enfermedades de plantas asociadas a estos patógenos se reconocen por conjunto de síntomas, los cuales generan alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta, fotosíntesis y sustancias de reserva (García Negroe, 2007; Pertot *et al.*, 1998).

Ubicación Taxonomica de "Candidatus Phytoplasma spp.":

-Dominio: Bacteria

-Phylum: Firmicutes

-Clase: Mollicutes

-Orden: Acholeplasmatales

-Familia: Acholeplasmataceae

-Género: *Candidatus Phytoplasma* (CABI, 2019b)

Vectores asociados a la transmisión de fitoplasmas causantes de Punta Morada de la Papa

Los vectores relacionados a fitoplasmas causantes de la PMP son transmitidos por varias especies de chicharritas (Homoptera: Cicadelidae). Entre las que se encuentran *Macrostelus orientalis*, *M. fascifrons*, *M. striifrons*, *Scleroracrus flavopictus*, *Orosius albicinctus*, *Alebroides dravidamus* (Maramorosch, 1998). En Estados Unidos de América, se ha comprobado la importancia de *Circulifer tenellus* y *Ceratagallia spp.*, como vectores de fitoplasmas (J. E. Munyaneza, 2005). En México, en los estados de Nuevo León y Coahuila, se detectó la presencia de fitoplasmas en chicharritas de los géneros *Empoasca* y *Aceratagallia* (Almeyda León *et al.*, 2004). Otros estudios conducidos en México han permitido comprobar que el psílido de la papa *B. cockerelli* también es vector de los fitoplasmas causantes de la PMP *Bactericera cockerelli* con mayor porcentaje de asociación con los fitoplasmas que infectan la papa (Almeyda *et al.*, 2008; Garzón *et al.*, 2004)

Importancia Económica de Zebra Chip/Punta Morada

En México se ha relacionado al cultivo de papa con dos enfermedades de importancia económica; Zebra Chip y Punta Morada asociadas a “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma spp.*”.

Zebra Chip/Punta morada de la papa son las enfermedades más importantes de este cultivo en México, la cual se encuentra distribuida en gran parte de las zonas paperas, afectando la calidad y rendimiento al grado que dificulta o imposibilita la comercialización para consumo en fresco o su uso como semilla (Almeyda *et al.*, 2008). Es importante mencionar que dependiendo el grado de infección el daño al cultivo varía del 20 al 100% (Cadena, 1996).

Durante el 2004 a 2006, las pérdidas económicas debidas a Zebra Chip/Punta Morada para los productores de papa en los Estados Unidos y México a menudo condujeron al abandono de los cultivos resultando en pérdidas que excedían a varios millones de dólares. Un ejemplo claro de cómo puede llegar a afectar en producción y económicamente esta asociación de enfermedades, en Texas en 2009 fue responsable de la reducción del 20% en superficie cultivada de papa y una pérdida económica de

aproximadamente 25 millones de dólares durante el periodo del 2004 al 2006 (Wen *et al.*, 2009). La enfermedad también se ha documentado en los campos de papa en Guatemala y Honduras con la incidencia de hasta el 80% de pérdidas totales de campo a causa de los tubérculos no comercializables (Crosslin, 2010).

“*Bactericera cockerelli*”: Vector de *Candidatus Liberibacter solanacearum*”

“*B. cockerelli*” es una de las plagas más destructivas de la papa en el hemisferio occidental. En 1909 se reconoció que “*B. cockerelli*” tenía el potencial de ser un insecto invasivo y dañino, particularmente en el oeste de los Estados Unidos y México (Compere, 1915; Crawford, 1914; Sulc, 1909). Posteriormente Sulc en el mismo año, la denomina científicamente como *Trioza cockerelli* (Sulc, 1909). Años más tarde asigna a esta especie al género *Paratrioza* (Crawford, 1911). Actualmente se conoce como *Bactericera cockerelli* (Burckhardt & Lauterer, 2007).

El psílido de la papa, *B. cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) es una plaga grave de la papa y otros cultivos solanáceos (Figura 5). Se ha asociado con la bacteria "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" (CaLso), asociada con la enfermedad Zebra Chip, una enfermedad nueva y económicamente importante de la papa en los Estados Unidos, México, América Central y Nueva Zelanda (Sengoda *et al.*, 2013).

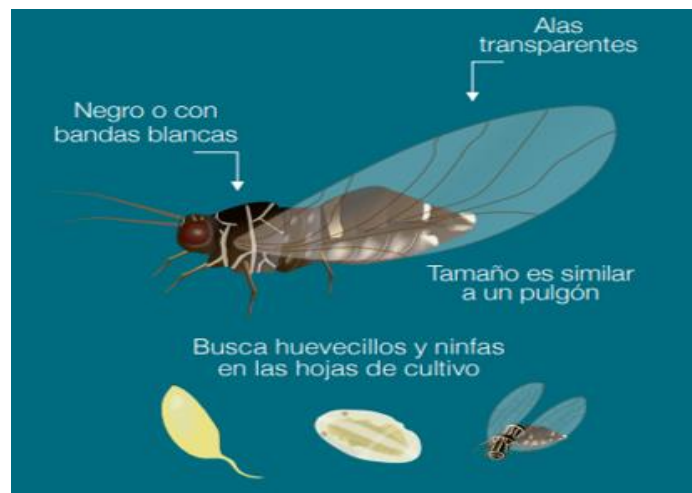


Figura 5. Características morfológicas y ubicación en la planta según la etapa de desarrollo de “*Bactericera cockerelli*” vector de “CaLso”.

“*B. cockerelli*” es un alimentador de floema polífago, puede reproducirse con éxito en una amplia variedad de especies de plantas hospederas, y ha sido una plaga de importancia para cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y tomate (*Solanum lycopersicon* L.) durante muchos años (Pletsch, 1947; Wallis, 1955).

Este psilido daña principalmente a sus hospederos mediante la alimentación, por medio del aparato bucal tipo picador-chupador, conformado por un estilete formado por dos conductos. El adulto de “*B. cockerelli*” introduce el estilete hasta el floema; por uno de los conductos el insecto succiona la savia y por el otro inyecta saliva a la planta (Delgado *et al.*, 2019). Al momento de que *B. cockerelli* se alimenta de la savia del floema de una planta infectada con “CaLso”, el patógeno puede ser ingerido por el vector. Las células bacterianas deben pasar a través de la pared celular del canal alimentario, moverse por la hemolinfa y finalmente llegar a las glándulas salivales (Cooper *et al.*, 2014; Haapalainen *et al.*, 2014; Pearson, *et al.*, 2010). El daño directo por la alimentación de éste induce el amarillamiento de las hojas, además de los daños indirectos por la transmisión de los fitopatógenos (Garzón *et al.*, 2005; Nachappa *et al.*, 2012; Swisher *et al.*, 2018)

Clasificación Taxonomica de “*Bactericera cockerelli*”

-Dominio: Eucariota

-Reino: Metazoa

-Filo: Artrópodos

-Subfilo: Uniramia

-Clase: Insecta

-Orden: Hemiptera

-Suborden: Sternorrhyncha

-Desconocido: Psylloidea

-Familia: Triozidae

-Género: *Bactericera*

-Especie: *Bactericera
cockerelli*

Nombres comunes: Pulgón saltador de papa, Pulgón saltador de tomate, Salerillo, Psílidos de la papa/ del tomate. (CABI, 2019a)

Ciclo Biológico *Bactericera cockerelli*

El insecto *B. cockerelli* expresa una metamorfosis incompleta estableciendo un periodo comprendido de 34.5 días (Abdullah, 2008). El ciclo biológico (Cuadro 3) típico de “*B. cockerelli*” comprende una etapa de huevecillo, cinco estadios ninfales y una etapa de reproducción sexual en los insectos adultos (Figura 6) (Hodkinson, 2009). Una sola generación se puede completar en tres a cinco semanas, dependiendo de la temperatura debido a que su desarrollo óptimo ocurre aproximadamente a los 27°C con 60 a 70% de humedad relativa. El número de generaciones varía considerablemente de una región a otra, generalmente de tres a siete. Sin embargo, una vez que los psílidos colonizan un área, la oviposición prolongada hace que las generaciones se superpongan, lo que dificulta la distinción entre generaciones (Munyanza *et al.*, 2009b; Pletsch, 1947; R. L. Wallis, 1955)

Cuadro 3. Ciclo de Biológico de "*Bactericera cockerelli*".

Instar	Días
Total del ciclo	34.5
Periodo total de desarrollo	28.4
Desarrollo ninfal	21.4
Incubación	6.7
Longevidad del adulto en laboratorio	
Macho	22.0
Hembra	48.7
Longevidad del adulto en campo	
Macho	18.0
Hembra	16.0

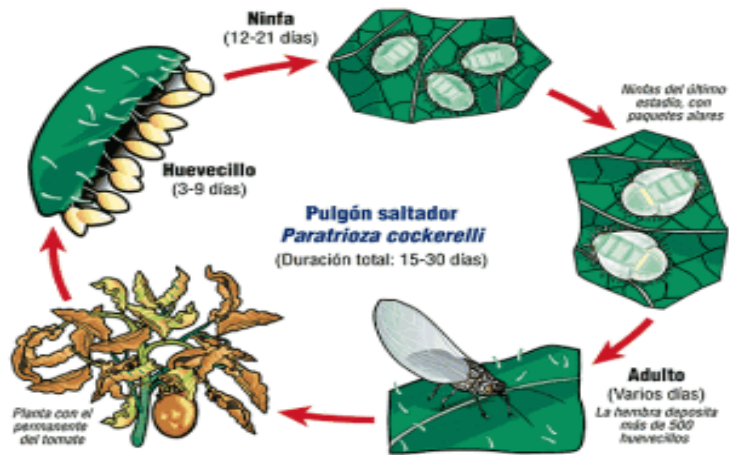


Figura 6. Ciclo Biológico de las etapas de desarrollo de "*Bactericera cockerelli*".

Huevecillo

Los huevecillos del psílido se adhieren a la hoja mediante un pedicelo corto localizado en uno de sus extremos, la mayoría se ovipositan a lo largo del borde del folíolo (Figura 7), son de forma oblonga y una coloración amarilla tornándose de naranja conforme se desarrolla el embrión. En los huevecillos próximos a eclosionar se pueden observar unos puntos de color rojo, correspondientes a los ojos de la ninfa del primer instar (Becerra, 1989; Garza & Rivas, 2003; Marín *et al.*, 1995). Los psílicos hembra pueden ovipositar hasta 231 huevos a lo largo de las cuatro semanas de vida (Abdullah, 2008).



Figura 7. Huevecillos de *Bactericera cockerelli*; A) Huevecillos con coloración amarilla, B) Huevecillo observado desde un Microscopio con objetivo a 40 X, C) Huevecillos coloración naranja.

Estadios Ninfales

Presenta cinco estadios ninfales (Cuadro 4 y Figura 8) con forma oval, aplanados dorsoventralmente, con ojos bien definidos, son en gran parte similares en su morfología. Al eclosionar adquieren un color amarillo conforme se van cada uno de los estadios las ninfas se tornan de un color verde claro (Lorus & Marguery, 1980). Las antenas presentan sencillas placoides (estructuras circulares con función olfatoria), las cuales aumentan en número y son más notorias conforme el insecto alcanza los diferentes estadios. El perímetro del cuerpo presenta estructuras cilíndricas que contienen filamentos cerosos, los cuales forman un halo alrededor del cuerpo (Figura 8) (Marín *et al.*,1995; Rowe & Knowlton, 1935).



Figura 8. Estadios ninfales de "*Bactericera cockerelli*".

Cuadro 4. Características principales de cada uno de los estadios ninfales de "*Bactericera cockerelli*". (Marín et al.,1995)

Estadios Ninfales	Características
1er estadio	-Coloración naranja. -Tórax con pequeños paquetes alares. -División del cuerpo no definida
2do estadio	-Divisiones claras entre cabeza, tórax y abdomen -Tórax verde-amarillento -Espiráculos en cada uno de los cuatro primeros segmentos
3er estadio	-Cabeza color amarillo -Ojos color rojiza - Paquetes alares en el mesotórax y metatórax
4to estadio	-La segmentación de las patas está bien definida -Antenas gruesas en su base y estrechas hacia la parte apical, con dos setas sensoras.
5to estadio	-Tonalidad verde más oscura -Antenas seccionadas en dos; Basal gruesa, apical filiforme -Paquetes alares, sobre saliendo del resto del cuerpo

Todas las etapas ninfales se alimentan del floema y, por lo tanto, producen excreta líquida (comúnmente conocida como azúcares psílicos) que favorece la infestación por hongos y puede causar daños a la planta (Vereijssen *et al.*, 2018)

Adultos

El insecto adulto emergente presenta una coloración verde; es inactivo y de alas blancas que al paso de 3 o 4 horas se tornan transparentes, posteriormente en 3 días toman una tonalidad oscura. Se tienen datos que la coloración cambia cuando el adulto se aparea. Cabeza: 1/10 del largo del cuerpo, con una mancha de color café que marca la división con el tórax, ojos grandes de color café y antenas filiformes. Tórax: blanco amarillento con manchas café bien definidas (Figura 9), la longitud de las alas es aproximadamente

1.5 veces el largo del cuerpo, venación propia de la familia (Marín et al., 1995; Pletsch, 1947). Los adultos tienen una longitud de 2.5 mm. Los machos tienen una duración promedio de 20 días, mientras que la hembra puede vivir hasta tres veces más que el macho, unos 60 días (Toledo, 2016).



Figura 9 Insecto adulto de “*B. cockerelli*”, se puede apreciar como sus alas sobresalen de su cuerpo.

Distribución:

Bactericera cockerelli se encuentra ampliamente distribuida en gran parte del Norte y Centro de América, abarcando climas no tan extremos de Canadá, Estados Unidos de América y México, en este último encontrado en regiones como Aguascalientes, Nuevo León, Coahuila, Chihuahua, Durango, Baja California Norte, Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí, Sonora y Sinaloa (Rubio *et al.*, 2006).

Transmisión de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma spp.*”

La transmisión de los patógenos “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma spp.*” se lleva a cabo por medio de “*Bactericera cockerelli*” y “*Circulifer tenellus*” y algunas especies de cicadélidos, siendo el más importante “*B. cockerelli*” por presentarse en numerosas poblaciones, teniendo como principal daño el amarillamiento o coloración púrpura en la planta debido a la secreción de una toxina la cual inyecta al momento de alimentarse (Cranshaw, 1993; Olivas, 2013).

Transmision Horizontal: Planta infectada-Vector-Planta sana

Al momento de que *B. cockerelli* se alimenta de la savia del floema de una planta infectada con “CaLso”, el patogeno puede ser ingerido por el vector. Las células bacterianas deben pasar a través de la pared celular del canal alimentario, moverse por la hemolinfa y finalmente llegar a las glándulas salivales (Haapalainen, 2014), dando pie a una transmisión horizontal, pues al momento de alimentarse de plantas infectadas, este vector puede transmitir a “CaLso” por medio de secreciones salivales a plantas no infectadas. (Hansen *et al.*, 2008; EPPO, 2013). Se ha informado sobre la transmisión de “CaLso” por “*B. cockerelli*” después de una semana de exposición en plantas de papa, y posteriormente la visualización de la sintomatología descrita para ZC (Hansen, 2008). Datos obtenidos por Munyaneza indican que solo es necesario un espécimen de “*B. cockerelli*” para transmitir a “CaLso”, dos horas después de realizada la infestación en la planta (Munyaneza *et al.*, 2010).

El método de transmisión de “Candidatus Phytoplasma spp.” al igual que “CaLso” se da principalmente por insectos chupadores de savia, vectores pertenecientes a las familias Cicadellidae, Fulgoridae y Psyllidae, estos insectos se alimentan del floema donde adquieren al patogeno de plantas infectadas y posteriormente lo transmiten plantas sanas, las cuales sirven como reservorio en invierno para los fitoplasmas o lo pueden transmitir a plantas perennes que sirven como fuente de inóculo en la primavera (Tanne *et al.*, 2001). En tiempos anteriores se creía que el agente causal de la enfermedad era un fitoplasma transmitido por chicharritas; sin embargo, también se observaron altas poblaciones “*B. cockerelli*”. En el año 2007, se reportó la capacidad de “*B. cockerelli*” de transmitir fitoplasmas a partir de la cuarta semana desde la adquisición del patogeno, por otro lado se demostró la transmisión de tres grupos diferentes de fitoplasmas (16SrI, 16SrII y 16SrIII) en plantas de Chile, papa y tomate (García Negroe, 2007).

La transmisión de “CaPhy” mediante los vectores “*B. cockerelli*” y “*C. tenellus*” se puede dar en cualquiera de sus etapas fenológicas (Salas Marina & Flores Olivas, 2006). Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre los síntomas provocados por la enfermedad PMP con la presencia de *B. cockerelli* y “CaLso” (Rubio *et al.*, 2011). Los síntomas descritos asociados con la presencia de fitoplasmas (Almeyda *et al.*, 1999;

Cadena Hinojosa *et al.*, 2003; Maramorosch, 1998), pueden estar también relacionados con el efecto de una posible toxina inyectada a las plantas por “*B. cockerelli*” . Sin embargo, esa "toxina" nunca ha sido aislada y el desorden metabólico pudiera ser debido a la posible presencia de metabolitos producidos por las ninfas del insecto e introducidos por éste al momento de alimentarse (Rubio *et al.*, 2006).

Transmision Vertical: Transovarica

La transmision transovarica o verical se define como la transferencia de patogenos a las siguientes generaciones a través de la invasion del ovario y la consecuente infeccion de los huevecillos ovipositados por un insecto adulto (Vereijssen, *et al.*, 2018). La infeccion de “CaLso” puede ocurrir en todas las etapas del ciclo biologico de *B. cockerelli*, existiendo una variacion en los huevecillos los cuales muestran una frecuencia de un 15 a 47% de infeccion, lo que sugiere la transmision transovarica (transmision vertical) de “CaLso”.

El primer informe reportado en donde se sugirio la posible transmision transovarica de “CaLso” por *B. cockerelli* lo llevo acabo Hansen en el 2008 en donde se encontro un de 15 a 47% de infeccion en los huevecillos del psilido (Hansen,2008). Casteel en el 2012, realizó un estudio de frecuencia de transmision vertical a través de huevecillos para caracterizar de manera concreta la interacción microorganismo-insecto-planta, obteniendo como resultado la transmision transovarica de la bacteria en porcentajes que osilaban entre un 47 y 88% en seis lineas puras de *B.cockerelli* (Casteel, *et al.*, 2012). Un estudio publicado en el 2018, sobre la presencia de “CaLsol” en plantas de tomate, chile y papa informo sobre la presencia de este patógeno en huevecillos de *B.cockerelli* (Melgoza *et al.*, 2018) .

Existe la posibilidad de que la transmision de “CaLsol” a huevecillos de *B.cockerelli* no sea de manera transovarica. Durante años se ha reconocido que los huevecillos de psyidos están unidos a su planta huesped por medio de un “pedicelo” a través de la epidermis del tejido vegetal, de manera que absorban agua y nutrientes disueltos del hospedero (Reaumur, 1740; White, 1968). Por lo tanto, esta latente la posibilidad de que los huevecillos de “*B. cockerelli*” sean infectados a través del transporte de solutos y no de manera transovarica (Vereijssen, *et al.*, 2018).

En el caso de la transmisión transovárica de fitoplasmas la información es limitada. Se ha reportado la presencia de fitoplasmas en los órganos reproductivos (ovarios, testículos y receptáculos seminales), huevecillos, ninfas e insectos adultos de la primera y segunda generación de vectores como *Mutsumuratettix hiroglyphicus*, *Hishimonoide sellatiformis* y *Cacopsylla melanoneura* (Kawakita *et al*, 2000; Hanboonsong *et al.*,2002; Tedeschi *et al*, 2006). Esto podría indicar una gran relación en la co-evolución entre patógeno y su insecto vector (Weintraub & Beanland, 2006). Los fitoplasmas son adquiridos más rápidamente por las ninfas que por los adultos y sobreviven durante las mudas del insecto pero no son transmitidos de adultos a los huevecillos en la siguiente generación, por lo que estos al eclosionar deben alimentarse de plantas infectadas para que se vuelvan infecciosos (Agrios, 1995) . Aunque Nault y Rodríguez (1985), reportan que es rara la transmisión transovárica de los fitoplasmas en los vectores, esto va a depender mucho del vector mismo, pues la transmisión en cada caso específico es diferente. Sin embargo se han dado casos de la transmisión transovárica de los fitoplasmas y el resultado ha sido reducción en el número de la prole de las hembras infectadas. El periodo de vida de un insecto sano es mayor y el de un insecto infectado es menor y el 30% de las hembras infectivas serán estériles. Los fitoplasmas además de necesitar a los insectos para transportarse de una planta a otra, los necesitan para poder penetrar el hospedero y son inyectados al floema por la herida que es creada por el insecto mismo (Mount y Lacy, 1982).En el caso de “*B. cockerelli*” no se ha reportado información que verifique la posibilidad de transmisión transovarica.

Métodos de Diagnostico

Diagnostico Macroscópico

Debido a que “*CaLso*” y “*CaPhy*” no se han podido cultivar de manera *in vitro* y en consecuencia no se pueden aplicar los postulados de Koch, existen aspectos biológicos que se desconocen. Una manera para detectar la presencia de ambos patógenos es observando la sintomatología que se llega a presentar en el hospedero, pero se trata de un método poco o nada específico debido a que la sintomatología de “*CaLso*” y “*CaPhy*” es prácticamente similar. En plantas de papa infectadas con “*CaLso*” se

observa retraso en el crecimiento y clorosis, sobrecrecimiento de los entrenudos, proliferación de yemas axilares, brote de tubérculos aéreos, oscurecimiento del sistema vascular y muerte (J. E. Munyaneza et al., 2007). La sintomatología reportada en caso de presencia de fitoplasmas es amarillamiento o clorosis, enrollamiento de las hojas, enanismo generalizado, proliferación de yemas axilares, acortamiento de entrenudos, abultamiento del tallo en los lugares de inserción de las hojas, formación de tubérculos aéreos y una decoloración en las hojas superiores, las cuales tienden a tornarse moradas en algunas variedades (Almeyda León *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2003; Pertot *et al.*, 1998). Se puede observar una gran similitud en la sintomatología de ambas enfermedades ZC y PMP, por lo cual no es un método de diagnóstico confiable en su totalidad.

Diagnostico Microscópico

El diagnostico de “CaLso” y “CaPhy”, se puede determinar mediante el uso del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). En observaciones de microscopia electrónica “*Candidatus Liberibacter*” presenta una morfología en forma de varilla similar a un bacilo, con medidas aproximadas de 2-3 μm de largo, 0.2-0.3 μm de ancho, extremos redondeados y con una superficie exterior suave. Por lo cual, la pared de peptidoglicanos es apenas visible al no poseer una membrana externa (Tanaka et al., 2007). Es negativa a la tinción Gram y no hay evidencia de pilis o flagelos para su locomoción. Sin embargo, en su genoma se encuentran regiones que codifican para proteínas de ensamble de pilis y flagelos (Lin *et al.*, 2011). Su citoplasma es menos denso con respecto a otras bacterias fitopatógenas y con frecuencia muestran plasmólisis (Jagoueix, *et al.*, 1994).

En el 2018 se utilizó esta técnica para la detección de “CaLso” en peciolo de zanahoria positivos en la presencia de la bacteria, transmitida por “*B. trigonica*”. En las micrografías se puede observar secciones transversales de pecíolo de zanahoria infectadas muestran organismos similares a bacterias (BLO) indicados por flechas blancas, la estructura de la membrana cilíndrica que parece haberse desprendido de la pared celular y colapsado hacia adentro se indica con flechas blancas discontinuas, los

BLO se pueden ver desde dentro de la estructura de la membrana cilíndrica (Figura 10) (Mawassi *et al.*, 2018).

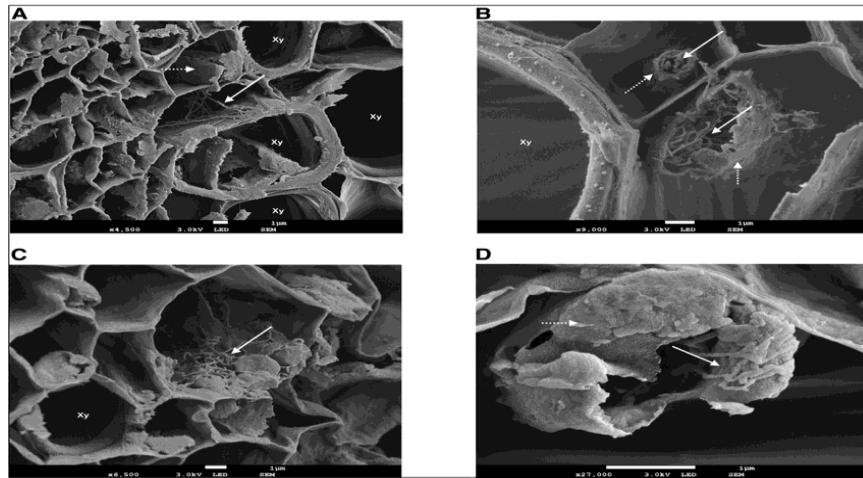


Figura 10. Micrografías donde se puede observar la presencia de "CaLso" en zanahoria transmitida por "*B. trigonica*" (Mawassi *et al.*, 2018)

En el caso de "CaPhy" este diagnóstico se ha llevado a cabo en calabacita (*Cucurbita pepo* L.). En la Figura 11 se muestra un corte del tejido del tallo de plantas con síntomas asociados a fitoplasmas, donde se pueden distinguir cuerpos esféricos con un tamaño aproximado de entre 500 y 1000 nm. Se aprecia como estos patógenos se encuentran dispersos en el tejido vascular de la planta, en aparente cumplimiento de su ciclo biológico de fisión binaria (Vargas Salinas, 2017).

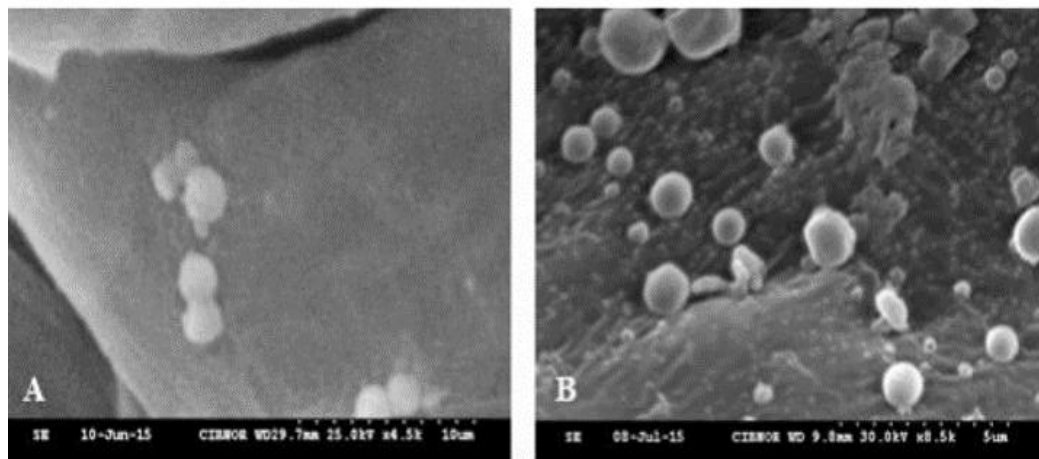


Figura 11. Detección de fitoplasmas por MEB. A) Presencia de fitoplasmas cumpliendo su ciclo biológico en el tejido vascular de la planta. B) Fitoplasmas dispersos en tejidos del tallo de la planta *C. pepo* L. (Vargas Salinas, 2017)

Diagnóstico Molecular

Es esencial la detección de “CaLsol” y “CaPhy” en plantas hospederas e insectos, para el estudio de la etiología, epidemiología y manejo de la enfermedad (Goolsby, *et al.*, 2007). La técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la más utilizada debido a su especificidad y rapidez con la que se realiza. La detección de “CaLso” mediante PCR está dirigida a la amplificación de la región 16S rDNA de su genoma (Jagoueix, Bové, *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2005). En la Cuadro 5 se muestran los principales iniciadores para el género “*Candidatus Liberibacter*” y específicos para la detección de “CaLsol”.

Cuadro 5. Oligonucleótidos reportados para la detección de la región 16S rRNA de “CaLsol” mediante PCR y PCR en Tiempo Real. (Delgado *et al.*, 2019)

Primers	Secuencia	Organismo	referencia
*OI2c/Cli.po.F/LsoF/OA2/ZCf	GCCTCGCGACTTCG CAACCCAT/ TACGCCCTGAGAA GGGGAAAGATT/ GTCGAGCGCTTATT TTTAATAGGA/ GCGCTTATTTTTAA TAGGAGCGGC/CGA GCGCTTATTTTTAT TAGGAGC	<i>Candidatus Liberibacter</i>	(Jagoueix, Bove, & Garnier, 1994; Liefting, Weir, Pennycook, & Clover, 2009; Secor <i>et al.</i> , 2009)
LG774F/LG1463R	GTAAACGATGAGT GCTAGCTGTTGGG/ CTGACCRTACCGTG GCCGG	<i>Candidatus Liberibacter</i>	(Morris <i>et al.</i> , 2017)
LsoadkF/LsoadkR	GCGCCACACTAAC ATCTCCTTCC/ CGCAGCAGTATGA	<i>CaLsol</i>	(Ravindran <i>et al.</i> , 2011)

	GGGCC		
LsoTX16/23F/Lso TX16/23R	AATTTTAGCAAGTT CTAAGGG/ GGTACCTCCCATAT CGC	CaLsol	(Ravindran <i>et al.</i> , 2011)
OMB1482F /OMB2086R CLZC-F/CLZC-R	GGCGTGGTTATAAG CAGAGT/ ATCTACACGCGGA CCTATAC TCGGATTTAGGAGT GGGTAAGTGG/ ACCCTGAACCTCAA TTTTACTGAC	CaLsol (Proteína de la membrana externa de Liberibacter)	(Crosslin, Lin, & Munyanza, 2011)
CL514F/ CL514R	CTCTAAGATTTCCGG TTGGTT/ TATATCTATCGTTG CACCAG	<i>Candidatus</i> Liberibacter	(J. E. Munyanza, Sengoda, et al., 2009)
LpFrag4-1611F/LP Frag 4-480R	GGTTGATGGGGTCA TTTGAG/ CACGGTACTGGTTC ACTATCGGTC	<i>Candidatus</i> Liberibacter psyllaourous	(Hansen et al., 2008)

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

El reconocimiento de la secuencia conservada del gen 16S rDNA en fitoplasmas, permitió el uso y diseño de primers universales mediante los cuales amplifican secuencias comunes a todos los fitoplasmas y pueden ser utilizados para determinar la presencia o ausencia de fitoplasmas en plantas e insectos. Para el caso en específico de fitoplasmas en brotes de hilo (HS-16SII), punta morada en papa (PT-16SrI) (Lee *et al.*, 1994; Leyva, 2002).

Para la detección de fitoplasmas en diferentes especies de plantas en México, se han utilizado los pares de primers MMF/MMR, R16F2/R16R2, P1/Tint, P1/Bltvaint, P1/Ayint, P1/P7 y P3/P7 (Almeyda *et al.*, 2001).

Almeyda y colaboradores (2004) utilizaron la técnica de PCR conocida como PCR anidado o NESTED-PCR, para la detección de fitoplasmas en insectos. En el primer ciclo de amplificación se utilizaron los primers P1/P7 y en el segundo ciclo se utilizaron los pares de primers R16mF2 /R116 mR1, R16F2/R16R2 y R16F2/MMR

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo consistió en definir la posible transmisión de “*Candidatus Phytoplasma spp.*” (*CaPhy*) en cultivo de papa mediante el vector “*Bactericera cockerelli*”, así como determinar la existencia de la transmisión transovárica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (“*CaLso*”) y “*Candidatus Phytoplasma spp.*” (“*CaPhy*”) mediante el análisis de 5 generaciones de “*Bactericera cockerelli*”. El análisis de las muestras para la detección de “*CaLso*” se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR-PF) y la de detección de “*CaPhy*” se llevó a cabo mediante la técnica de NESTED-PCR o PCR anidado.

Ubicación del experimento.

El desarrollo del experimento se llevó a cabo en Laboratorio de Parasitología Molecular e Invernadero del Departamento de Parasitología de Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Obtención del material biológico.

Obtención de los psílicos

Se realizó un muestreo de insectos adultos de *B. cockerelli* en un lote de cultivo de papa ubicado en el Campo Experimental “Ing. Humberto Treviño Siller” en la Colonia Agrícola Navidad, en Galeana, Nuevo León (25°04’N y 100° 37’ O). Los psílicos se recolectaron con un aspirador entomológico y colocados en tubos Falcon de 50 ml, cubiertos con tela de organza. Posteriormente se trasladaron a el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Campus Saltillo, donde se mantuvo a los insectos en un periodo de ayuno durante 24 horas y a una temperatura de $14\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Obtención del material vegetal.

Los minitubérculos de papa certificada variedad *Fianna*, fueron proporcionados por el Ingeniero Manuel Villareal Gonzales productor de semilla de papa y secretario de la Confederación Nacional de Productores de Papa.

Desarrollo de los Experimentos de Transmisión

Siembra de papa (*Solanum tuberosum* L.). Los minitubérculos fueron sembrados en macetas de 2 kg de capacidad con sustrato para germinación (Peat Moss) y perlita en proporciones 3:1, se mantuvieron en condiciones de invernadero, a una temperatura promedio de 26.5 ± 1.5 °C., con fotoperiodos de 16:8, el tiempo de riego era cada tercer día, las plantas se mantuvieron en el Invernadero del Departamento de Parasitología ubicado en la UAAAN, Campus Saltillo para su posterior uso en los bioensayos de transmisión.

Previamente se realizó el análisis molecular para la detección de presencia-ausencia de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en tubérculos de papa e insectos adultos de *B. cockerelli*.

Establecimiento de la colonia de *B. cockerelli*

Se estableció una colonia de “*B. cockerelli*” en condiciones de invernadero, colocando 100 insectos adultos, dentro de una jaula entomológica de 80x60cm, colocando 4 plantas de papa en su interior, las cuales contaban con 4 hojas verdaderas y con alrededor de 15 cm de alto (Figura12). Durante el periodo en el que se estableció la colonia se realizaban monitoreos continuos sobre la presencia de “CaLso” y el porcentaje de infectividad de la colonia. Para comprobar la infectividad de la colonia se tomaron 10 insectos adultos y se realizó la detección de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” mediante PCR punto final.



Figura 12 Colonia de “*B. cockerelli*” en plantas de papa variedad Fianna, establecidas en el Invernadero de Parasitología Agrícola de la UAAAN.

Transmisión de “*Candidatus Phytoplasma spp.*” por *B. cockerelli*.

Al comprobar la infectividad de la colonia, se recolectaron de la colonia inicial con un aspirador bucal 20 insectos adultos, puestos en un periodo de ayuno durante 24 horas a una temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ en una Cámara Bioclimática en el Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN. Posteriormente se procedió a la inoculación de plantas sanas de papa con los insectos antes recolectados (Figura 13), dejándolos durante 24 horas para que procedieran a alimentarse. Al pasar las 24 horas, se realizó la extracción de los insectos adultos y posibles huevecillos ovipositados en las plantas, se prosiguió con la toma de muestra de tejido vegetal de las plantas, volviendo a realizar muestreos a la semana y al mes de la infestación (Garzón-Tiznado et al., 2009).

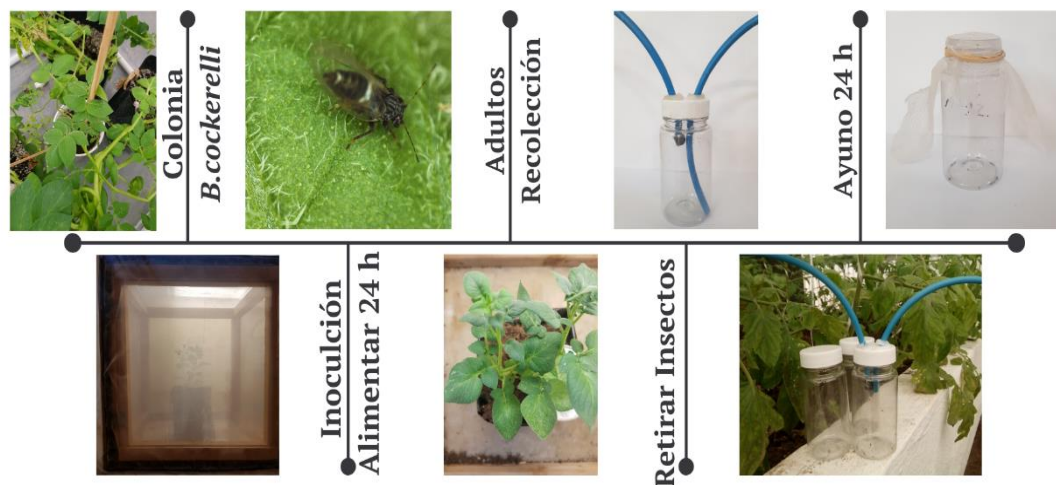


Figura 13 Metodología para el bioensayo de transmisión de “CaPhy” por “*B. cockerelli*”

Transmisión transovárica de “*Candidatus Phytoplasma spp*” y “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Para llevar a cabo los bioensayos se requirió tener un monitoreo previo de la colonia inicial de “*B. cockerelli*” desde el primer día del establecimiento hasta llegar a observar la presencia de huevecillos. El establecimiento de los bioensayos se realizó en una cámara bioclimática de crecimiento con una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y con fotoperíodos de 14 horas y oscuridad de 10 horas.

Para el desarrollo del bioensayo se tomó una hoja de planta de papa de la colonia inicial, dicha hoja fue tomada de la parte superior de la planta en donde se pudo observar la presencia de huevecillos de “*B. cockerelli*”, la cual se colocó en una cámara húmeda con la parte del envés hacia arriba, el peciolo de la hoja fue cubierto con algodón húmedo y plástico adherente (Figura 14), para mantenerla húmeda y evitar que se marchitara antes de la eclosión huevecillos.



Figura 14. Hoja de papa variedad *Fianna* con huevecillos de "*B. cockerelli*" sobre cámara húmeda, el peciolo de la hoja cubierto con algodón húmedo y plástico adherente, para conservar la humedad y mantener hidratada la hoja.

Las características que se tomaron en cuenta para la selección de huevecillos fueron el cambio de coloración de amarilla a naranja y en algunos casos poder observar la presencia de un punto rojo en la zona apical de huevecillo, esto último como indicativo de que el huevecillo está por eclosionar (Figura 15).



Figura 15. Huevecillos de “*B. cockerelli*” en hojas de papa variedad Fianna, de lado derecho se encuentran huevecillos con coloración naranja intenso; de lado izquierdo huevecillos con puntos rojos característica principal de su próxima eclosión.

Posteriormente la hoja fue colocada a pie de planta dentro de una jaula entomológica de madera de 50x50cm forrada con organza. La hoja se mantuvo en constante monitoreo y aproximadamente cada 24 horas se rehidrataba el algodón de la cámara húmeda y del peciolo de la hoja. La eclosión de los huevecillos se pudo observar en un intervalo de tiempo de entre 4-5 días después de haber colocado la hoja dentro de la jaula. La cámara humera fue colocada lo más próxima a las hojas de la parte inferior de la planta de papa para facilitar la movilidad de las ninfas de la hoja a la planta sana, en algunos casos se tomó una aguja entomológica para trasladar a las ninfas a la planta sana. Se realizó el seguimiento en del desarrollo de las ninfas a su estado adulto hasta la oviposición una nueva generación de huevecillos.

Se tomaron muestras de huevecillos, ninfas y adultos conservándolos en alcohol etílico al 70%, y de tejido vegetal específicamente de las primeras hojas de la planta. Dichas muestras se refrigeraron a una temperatura de -20 °C (Negroe, 2007). El procedimiento de desarrollo para el bioensayo de transmisión se realizó 5 veces bajo las mismas condiciones (Figura16).

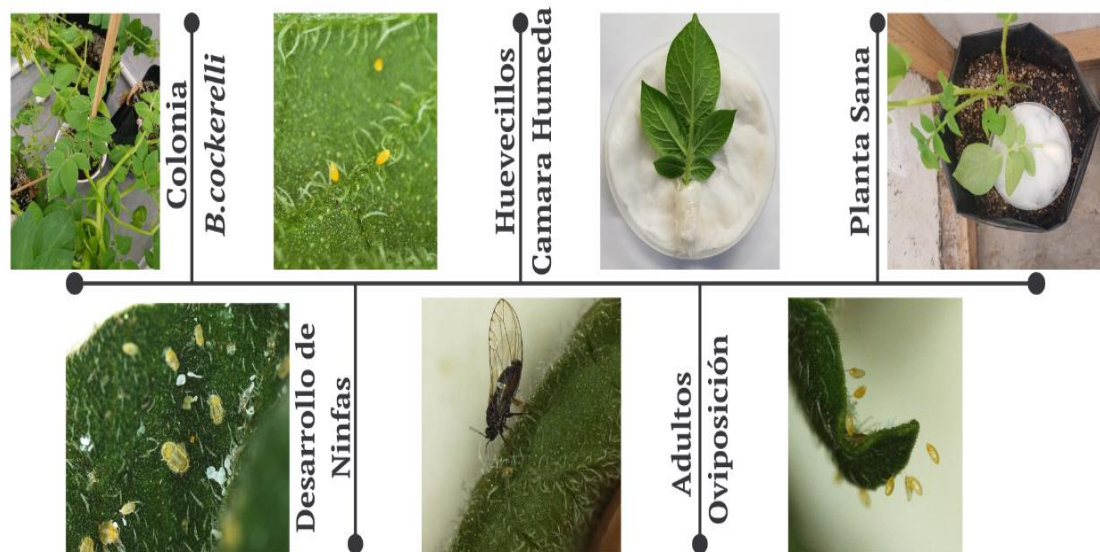


Figura 16. Metodología del bioensayo de transmisión transovárica de “CaPhy” y “CaLsol” por “*Bactericera cockerelli*” partiendo de huevecillos recolectados de una colonia inicial.

Análisis Molecular de Muestras de Tejido Vegetal Insecto

Extracción de DNA de Tejido Vegetal

La extracción de DNA de tejido vegetal se realizó mediante la técnica de Almeyda-León, 2004 con algunas modificaciones. Se maceraron 250 mg de tejido foliar en mortero con hielo seco, posteriormente se le agregaron 2 mL de buffer de extracción 2-ME/CTAB (2% p/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% PVP) precalentado con β -mercaptoetanol al 2%. Se toman 750 μ l de la muestra macerada y se transfirieron a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, y se incubaron 45 minutos a 65°C. Después del periodo de incubación se le agrego el mismo volumen de la muestra recuperada de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1) para posteriormente centrifugar a 10,000 rpm x 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agrego la mitad del volumen del sobrenadante de acetato de amonio al 7.5 M, la muestra fue puesta en hielo 10 min, y centrifugada a 14,000 rpm x 10 min. Para la precipitación del DNA se le agrego el mismo volumen de lo recuperado de isopropanol frio y se dejó precipitar toda la noche. Después del tiempo de precipitación se centrifugo a 10,000 rpm x 20 min, se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70% centrifugando a

10,000 rpm x 15 min, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 45 min y se resuspendió en 50 ml en agua Milli-Q estéril.

Extracción de DNA de Insecto

La extracción de DNA de adultos de *B. cockerelli* se realizó mediante la metodología de (Doyle & Doyle, 1990) con algunas modificaciones, se maceró un insecto adulto, colocándolo en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml posteriormente se le adicionaron 300 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8.5, NaCl nM, SDS 2%) y se maceraron con un pistilo de plástico, agregando 200 ml para el lavado del mismo, después se procedió a llevar la muestra al vórtex durante 30 seg., se adicionó un volumen de 500 ml de Cloroformo: Alcohol-Isoamilico frío (24:1), se agitó a inmersión la muestra para después centrifugar a 12,000 rpm x 15 min. El sobrenadante se recuperó colocándolo en un tubo eppendorf estéril frío, adicionando el mismo volumen de lo recuperado de isopropanol frío, se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm x 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó en 300 ml de etanol al 70%, se dejó secar el tubo durante 45 min sobre sanitas y se resuspendió en 30 ml de agua Milli-Q estéril.

Extracción de DNA de Huevecillos de *B. cockerelli*

Para el caso de la extracción del DNA de huevecillos de *B. cockerelli* se utilizó la metodología (DNAzol[®]ES, 2014). Se tomaron 21 huevecillos de *B. cockerelli*, los cuales fueron lavados con agua Milli-Q, posteriormente fueron colocados en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml, adicionando 100 µl de DNAzol[®]ES (Extra Strength), con ayuda de un pistilo estéril, se procedió a macerar la muestra de huevecillos se agregaron 500 µl de DNAzol[®]ES, se llevó al vortex durante 30 seg. y se dejó reposar la muestra 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se llevó a centrifugar 10 min x 12000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se adicionó 0.75 volúmenes de etanol al 100%, mezclando por inversión de 8 a 10 veces, centrifugando 4 minutos x 5000 rpm, después de este tiempo se decantó la muestra. Se agregaron 600µl de una mezcla de DNAzol y Etanol al 100%, dejando reposar la muestra durante 5 minutos y llevándola a centrifugar nuevamente 4 min x 5000 rpm, se decantó y agregó 750 µl de Etanol al 75% dando unos ligeros golpes para mezclar y se centrifugó a las mismas condiciones antes mencionadas.

Se dejó secar la pastilla, y posteriormente se resuspendió en 25 µl de agua Milli-Q estéril.

El DNA extraído de tejido vegetal y de *B. cockerelli* se almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis.

Validación de la Integridad del DNA de “*B. cockerelli*”

Las muestras de DNA extraídas de adultos y huevecillos de “*B. cockerelli*” fueron utilizadas para la validación del DNA mediante la amplificación del fragmento COI (Citocromo Oxidasa subunidad I). La amplificación se llevó a cabo mediante PCR punto final con los primers CO1F3/CO1R3 (5'-TACGCCATACTAGCAATCGG-3'/5'-GAGTAACGTCGTGGTATTCC-3') reportados por (Liu, *et al.* 2006), los cuales tienen un rango de amplificación de 500 pb.

El volumen de reacción fue de 25µl, conteniendo lo siguiente: Buffer de PCR 1X, 3mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 20 pMol de cada primer, 1 U de enzima Go-Taq, y 24 ng de ADN, en tubos de 100 µl previamente estériles. El programa de amplificación fue: Un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 min, 40 ciclos a tres temperaturas; desnaturalización 95°C por 30 seg, hibridación 59°C 30 seg, extensión 72°C por 1 min, por último, la extensión final de un ciclo de 72 por 10 min. Se usó un termociclador Thermo Scientific Hybaid PX2 thermal cycler (HBPX2110).

Detección de “*CaPhy*” Mediante Nested-PCR o PCR Anidado.

Para la amplificación de “*Candidatus Phytoplasma spp.*” se llevó a cabo una NESTED-PCR (López *et al.*, 2017), mediante el uso de dos pares de primers, en el primer ciclo de amplificación se utilizó el par de primers P1/P7 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT3'/5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') con un rango de amplificación de 1830 pb. La reacción de PCR contenía lo siguiente: Buffer 1X, 1.5 µM de MgCl₂ y 200 µM dNTPs, 0.4 pMol de cada primer (P1/P7), 0.05 U My Taq DNA Polimerasa marca Bioline, 30-80 ng de DNA, con un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación constó de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 50 segundos, y 72 °C por 2 minutos, con un ciclo de extensión final de 72°C por 5 minutos. Para la segunda amplificación o reacción de PCR se realizó una dilución 1:30 del primer producto de

PCR. En el segundo ciclo de amplificación se utilizó el par de primers R16F2N/R12R2 (5'-GAAACGACTGCTAAGA-3'/5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAAC-3') que amplifica un fragmento de 1250 pb. La segunda reacción de PCR contenía: Buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 200 μM, dNTP's, 0.4 pMoles de cada iniciador, 0.05 U de My Taq DNA Polimerasa marca Bioline y 5μl de la disolución 1:30 como DNA molde, con un volumen final de 25 μl. El programa de amplificación fue el siguiente: Un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, y 72 °C por 2 minutos, finalmente un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos. Las PCR se realizaron en un termociclador Thermo Scientific Hybaid PX2 thermal cycler (HBPX2110).

Detección de “CaLso” Mediante PCR en Punto Final.

Para detectar la presencia de “CaLso”, en muestras de tejido vegetal, insectos adultos y huevecillos se realizó una PCR en punto final usando los primers CL514F/CL514R (5'-CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT-3'/5'-TATATCTATCGTTGCACCAG-3'), los cuales amplifican en un fragmento aproximado de 669 pb (Crosslin, 2009). La composición de reacción fue la siguiente: 1 μl de agua destilada estéril, 10 μl de mastermix 2X (Genscript), 2 μM de cada primer (10 μM), y 1 μl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 5 min, seguido de 42 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos y 72°C por un minuto, más un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Las PCR se realizaron en un termociclador Thermo Scientific Hybaid PX2 thermal cycler (HBPX2110).

Electroforesis de los Productos de PCR.

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% a 80 voltios por 45 minutos con buffer TAE 1X. Para la visualización de los productos amplificados los geles se tiñeron con Bromuro de etidio y se analizaron en un transiluminador UVP GelDoc-It Imaging System Ultraviolet M-26X Transilluminator.

RESULTADOS

Detección de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” mediante PCR punto final

Se tomaron 10 insectos adultos de *B. cockerelli* de los 100 recolectados para comprobar la infectividad de la colonia. Se pudo observar la amplificación de un fragmento de 669 pb, de esta manera, se detectó la presencia de “CaLsol” en la totalidad de las muestras, lo que refleja un 100% de infectividad de los insectos (Figura 17). En el caso de los minitubérculos de papa certificada, se realizó el mismo procedimiento para descartar que fueran portadores de “CaLsol”. Los resultados reflejaron ser negativos a la presencia de “CaLsol” (Figura 18), lo que representa 0% de infección.

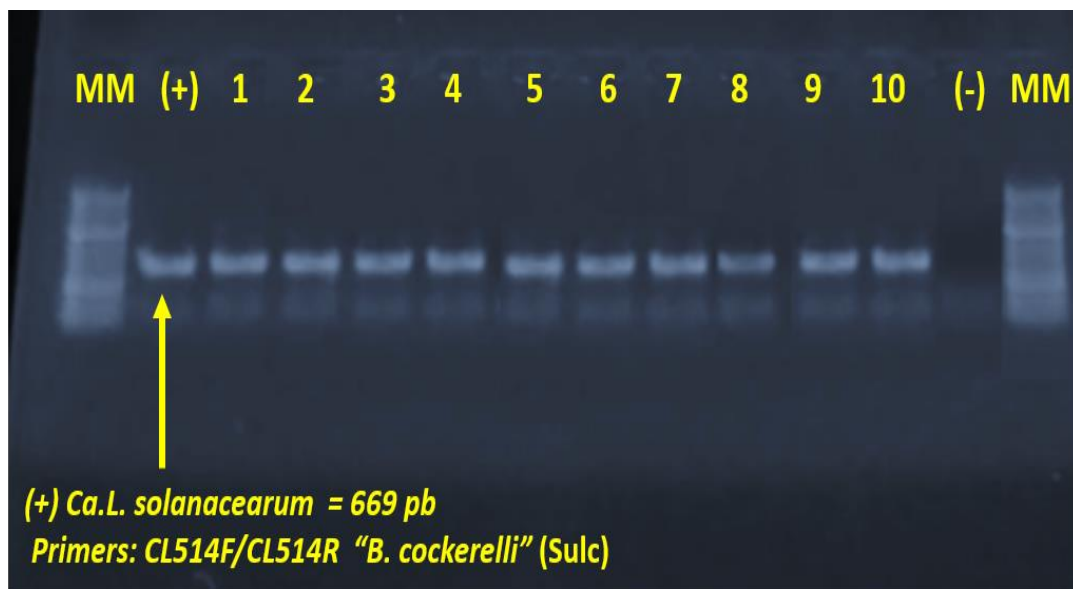


Figura 17. Detección de “CaLso” en “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 2-10: Muestras de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

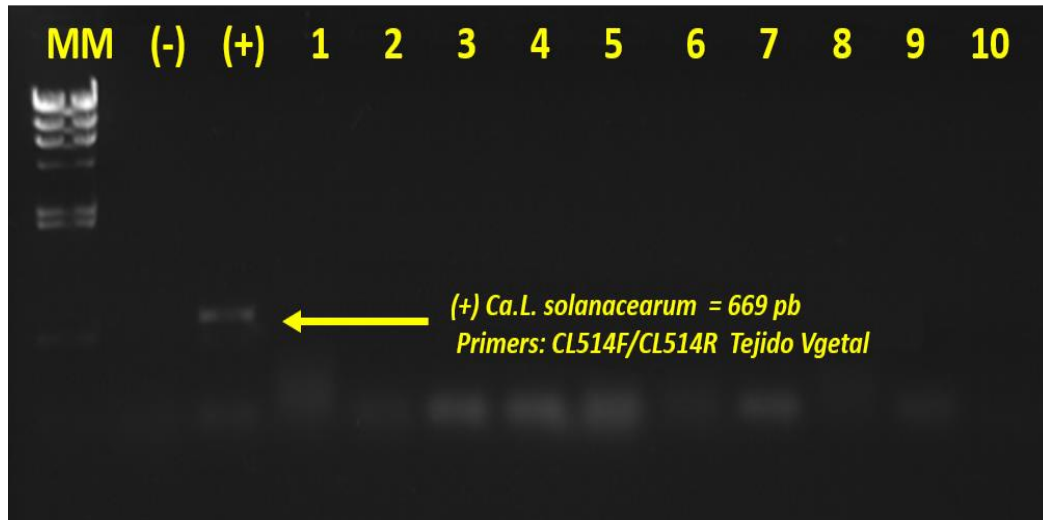


Figura 18. Ausencia de “CaLso” en tejido vegetal mediante PCR punto final utilizando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 50pb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-13: Muestras de tubérculos de papa, Carril (-): Control negativo.

Con los resultados obtenidos se descarta la posible transmisión de “CaLso” por medio de plantas infectadas, lo que representaría un factor de riesgo para el desarrollo de los bioensayos de transmisión tanto de “CaPhy” como de “CaLso”.

Verificación de la integridad del DNA

En los 5 bioensayos de transmisión transovárica de “CaLso”, se obtuvo una banda de 500 pb perteneciente a un gen endógeno conocido como Citocromo Oxidasa I (COI), para cada una de las muestras analizadas de huevecillo de “*B. cockerelli*”, cada muestra correspondía a 21 huevecillos por extracción (Figura 25). Lo cual, corrobora la calidad de ADN utilizado en las diferentes reacciones de PCR y los resultados negativos obtenidos en este trabajo pudieron deberse a que no existe la transmisión transovárica de este patógeno por “*B. cockerelli*”, o que la concentración de la bacteria es demasiado baja que no puede ser detectada mediante PCR punto final.

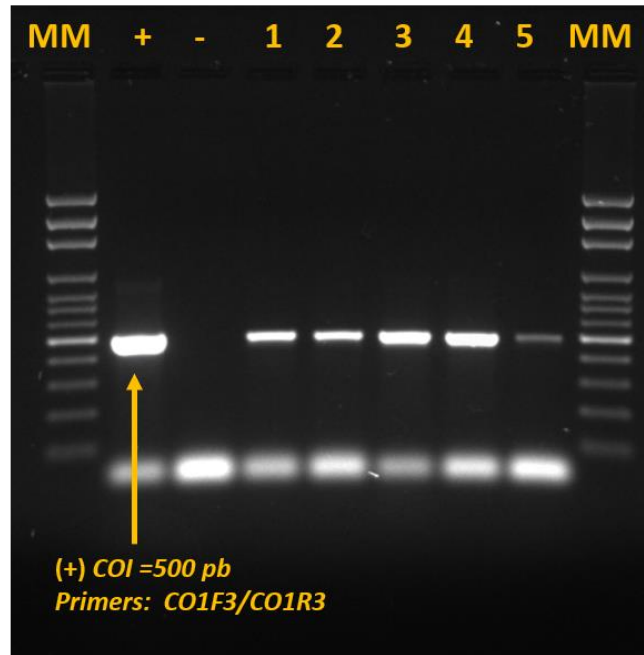


Figura 19 Detección del gen COI en huevecillos de “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CO1F3/CO1R3. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-8: Muestras de huevecillos de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Transmision Transovárica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” por “*Bactericera cockerelli*”

Se realizaron 3 análisis de huevecillos de “*B. cockerelli*” para observar la presencia o ausencia de “*CaLsol*”, el primer análisis se realizó con muestras que partían desde uno hasta 45 huevecillos. Las reacciones de PCR resultaron negativas, ya que no se detectó el fragmento de 669 pb en todas las muestras correspondientes a los 3 primeros bioensayos.

Con base en los resultados negativos que se obtuvieron con los 3 primeros bioensayos se optó por realizar la extracción de ADN a partir de 50, 55 y 60 huevecillos de “*B. cockerelli*”. Las reacciones de PCR a partir del ADN extraído fueron positivas para el primer bioensayo de transmisión, ya que se amplificó el fragmento esperado de 669 pb, lo cual corrobora la detección y presencia de “*CaLso*” (Figura 22).

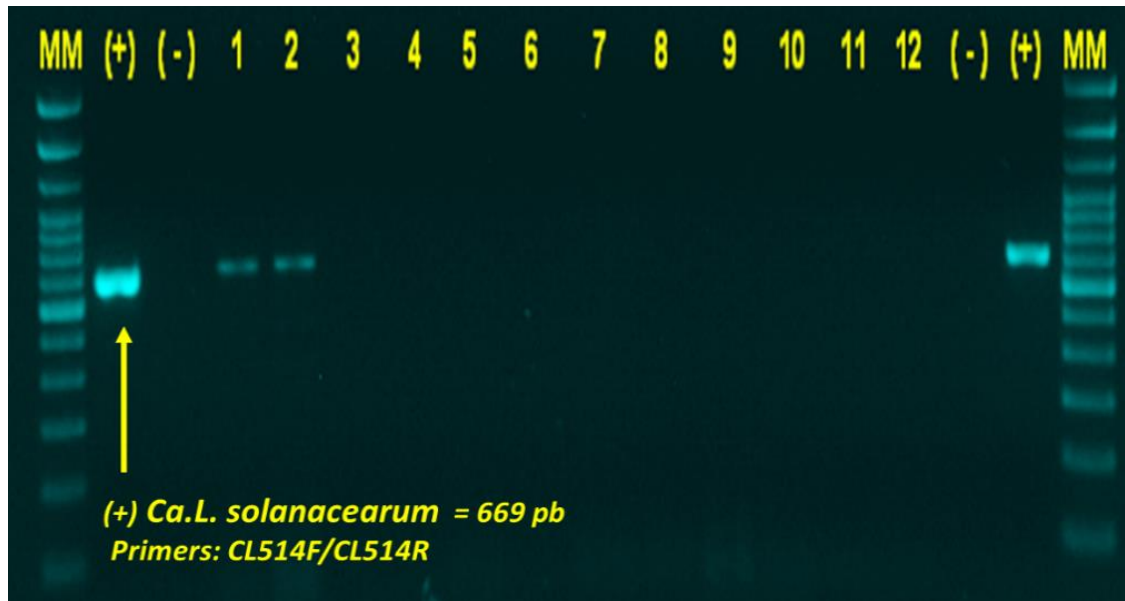


Figura 20. Detección de “CaLso” en huevecillos de “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-16: Muestras de huevecillos de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Debido a los resultados negativos en la detección de la bacteria, fue necesario realizar otro análisis para definir con toda seguridad la ausencia del patógeno en las muestras del segundo al quinto bioensayo, en los cuales no se había observado ninguna amplificación. Se cambió el número de huevecillos por muestra a 21 y se utilizó un nuevo método de extracción de DNA. En las PCR realizadas con los DNA extraídos utilizando el nuevo método de extracción no se observó ninguna amplificación, lo cual, corroboraba la ausencia de “CaLso” en las muestras de los cinco bioensayos (Figura 23)

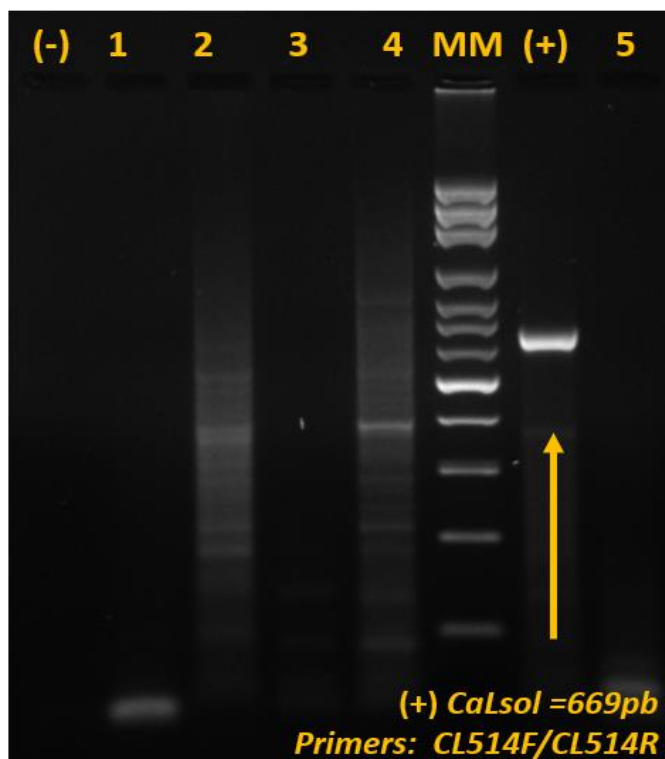


Figura 21. Detección del gen COI en huevecillos de “*B. cockerelli*” mediante PCR punto final utilizando los primers CO1F3/C01R3. Carriles MM: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril (+): Control positivo, Carriles 4-8: Muestras de huevecillos de “*B. cockerelli*”, Carril (-): Control negativo.

Tomando en cuenta los resultados positivos de la primera generación de “*B. cockerelli*” y para poder respaldarlos, se realizó la extracción de DNA de ninfas, adultos y tejido vegetal tomados de los bioensayos establecidos. En el Cuadro 6 se puede observar en el caso de los bioensayos 1,2 y 3 la presencia de “*CaLsol*” en ninfas y tejido vegetal en un 55.5%, mientras que en adultos se registró un 100%. En el caso de los bioensayos 4 y 5 la presencia de “*CaLsol*” se encuentra en un 16.6%, en ninfas, para adultos el porcentaje se encuentra alrededor de 66.6% y en tejido vegetal en un 0% esto podría deberse a la presencia de las plagas antes mencionadas.

Cuadro 6. Detección por PCR punto final de “CaLsol” en muestras de ninfas, adultos de “*B. cockerelli*” y tejido vegetal de papa, para la determinación de transmisión transovárica.

Bioensayo	Ninfas Muestras	Infectados	Adultos	Infectados	Tejido vegetal	Infectados
1	3	1	3	3	3	2
2	3	2	3	3	3	3
3	3	2	3	3	3	2
4	3	1	3	2	3	0
5	3	0	3	2	3	0

Otro factor que se debe tomar en cuenta es que en el 4to bioensayo las condiciones no fueron las mismas que en los bioensayos anteriores y se tuvo que repetir debido al cambio de temperatura, ambiente y la presencia de plagas como araña roja y mosca blanca, los cuales no permitían un buen desarrollo de los bioensayos. A mediados del 5to bioensayo se regresaron a las mismas condiciones de los tres primeros bioensayos, pero se pudo observar una disminución en la reproducción de “*B. cockerelli*”, lo cual implica una evidente disminución en la oviposición de huevecillos y su eclosión (Cuadro 7), lo cual pudo influir en la cantidad de DNA de “CaLso” presente en las muestras de DNA total extraído.

Cuadro 7. Tiempo eclosión de huevecillos de “*B. cockerelli*” y temperatura en la que se desarrollaron cada uno de los cinco bioensayos.

Bioensayo	Numero de huevecillos	Tiempo de eclosión días	# de huevecillos eclosionados	Temperatura °C
1	25	5	22	25±2
2	53	5	48	25±2
3	75	4	71	25±2
4	28	5	160	30±2

5	30	4	24	30±4
---	----	---	----	------

Transmisión de “*Candidatus Phytoplasma spp*” por “*Bactericera cockerelli*”

No se detectó la transmisión de “*CaPhy*” a plantas de papa (Figura 21), mediante la inoculación con insectos adultos de “*B. cockerelli*” infectivos con “*Candidatus Phytoplasma spp*”. Esto se determinó mediante los resultados obtenidos en el análisis molecular de muestras de tejido vegetal tomadas en periodos de 24 horas, 15 días, 1 mes y mes y medio después. No se observó la amplificación del fragmento esperado de 1245 pb, lo cual se interpreta como la ausencia de “*CaPhy*” en todas las muestras analizadas (Figura 21).

Durante el desarrollo del bioensayo se observaron algunos de los síntomas reportados para PMP y ZC, como lo son; los tubérculos aéreos y yemas axilares (Figura 20). Por lo tanto, se realizó el análisis de las muestras de tejido vegetal para determinar la presencia o ausencia de “*CaLso*”. Se obtuvo la amplificación del fragmento esperado de 669 pb correspondientes al gen 16S ribosomal de “*CaLso*” en todas las muestras evaluadas. Se puede observar un incremento de la presencia de la bacteria conforme pasa el tiempo de recolección de las muestras (Figura 23).

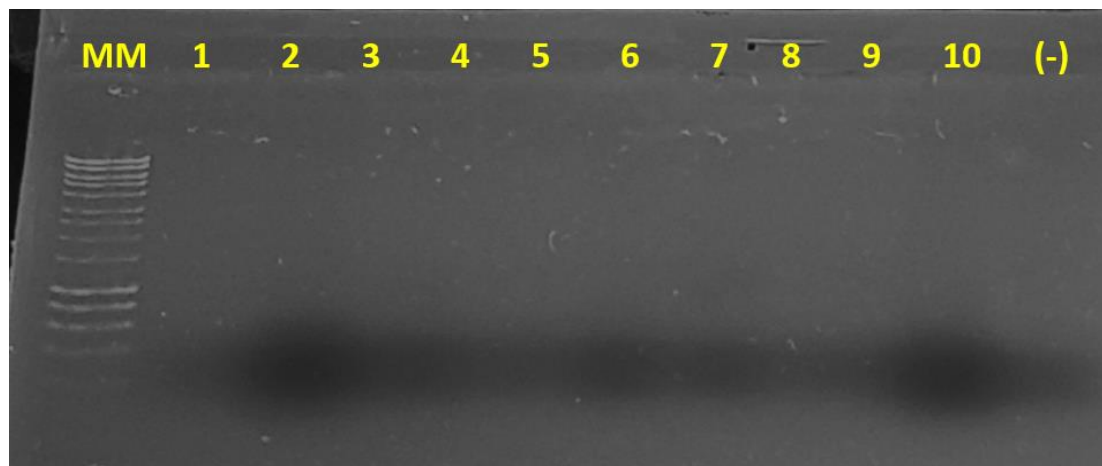


Figura 22. Ausencia de “*CaPhy*” en tejido vegetal mediante PCR punto final utilizando los primers P1/P7 y R16F2n/R16R. Carriles MM: Marcador de peso molecular 50pb, Carril (+): Control positivo, Carriles 2-11: Muestras de tejido vegetal, Carril (-): Control negativo.

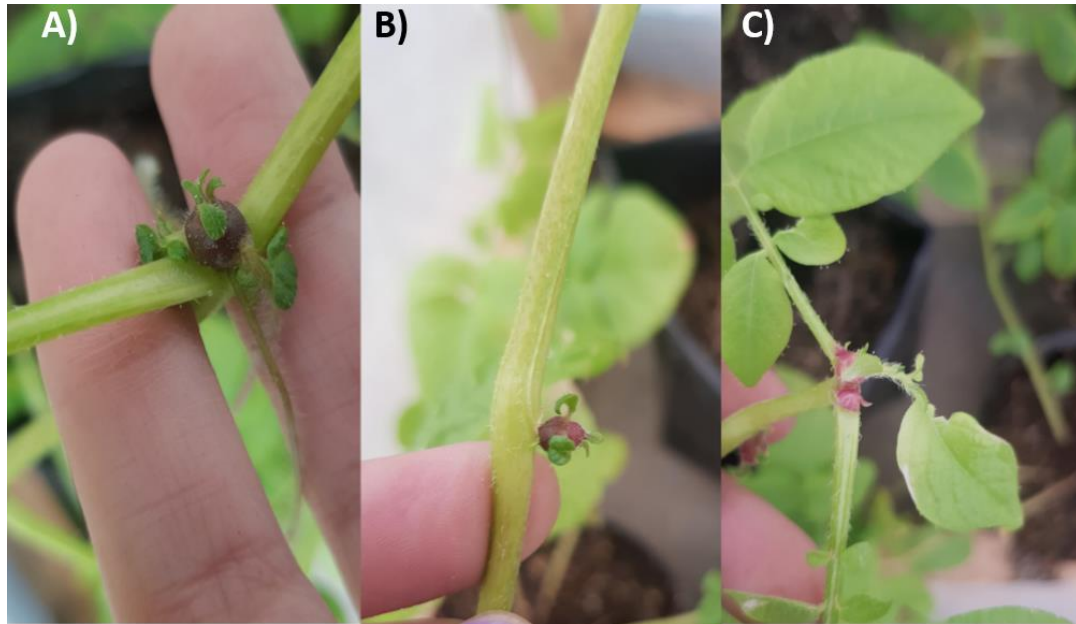


Figura 23 Sintomatología presente plantas de papa al mes y medio de la inoculación. A- B) Tubérculos aéreos, C) Yemas axilares, síntomas característicos de PMP.

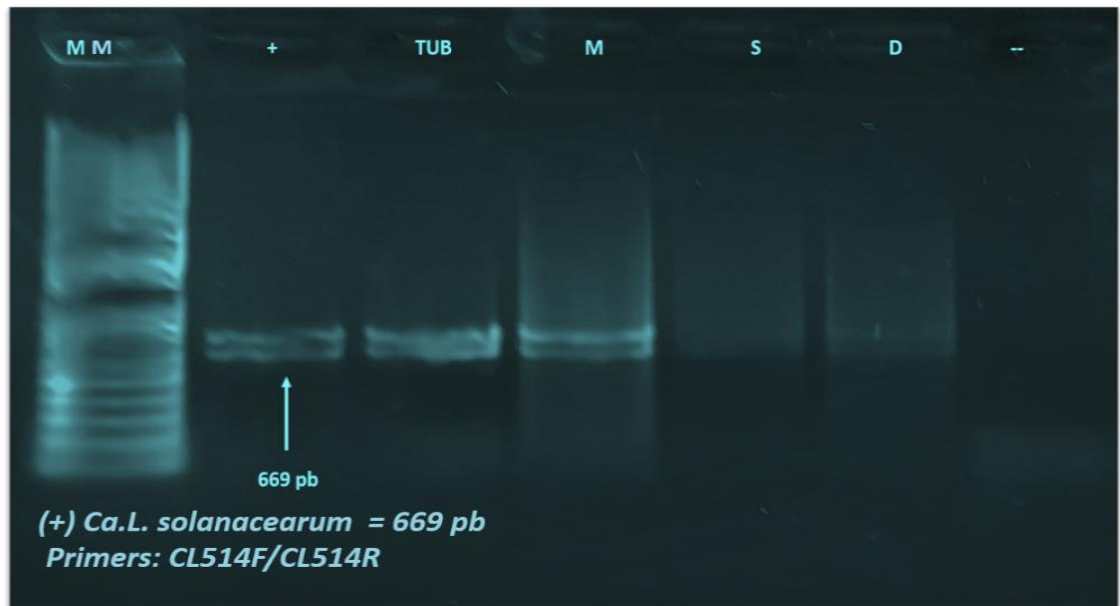


Figura 24 Amplificación de “CaLsol” en muestras de tejido vegetal usando los primers CL514F/CL514R. Carriles MM: Marcador de peso molecular de 50 pb, Carril (+): Control positivo, Carril TUB: Tubérculo aéreo, Carril M: Mes, Carril S: 15 días, Carril D: 24 horas, Carril (-): Control negativo.

Transmisión Transovárica de “*Candidatus Phytoplasma spp*” por “*Bactericera cockerelli*”

En el análisis molecular para la detección de “CaPhy” no se pudieron observar las bandas de amplificación de 1245 pb, lo que indica la ausencia de fitoplasmas en los huevecillos de “*B. cockerelli*”. Por lo cual se establece que no hay transmisión transovárica de este patógeno (Figura 25).

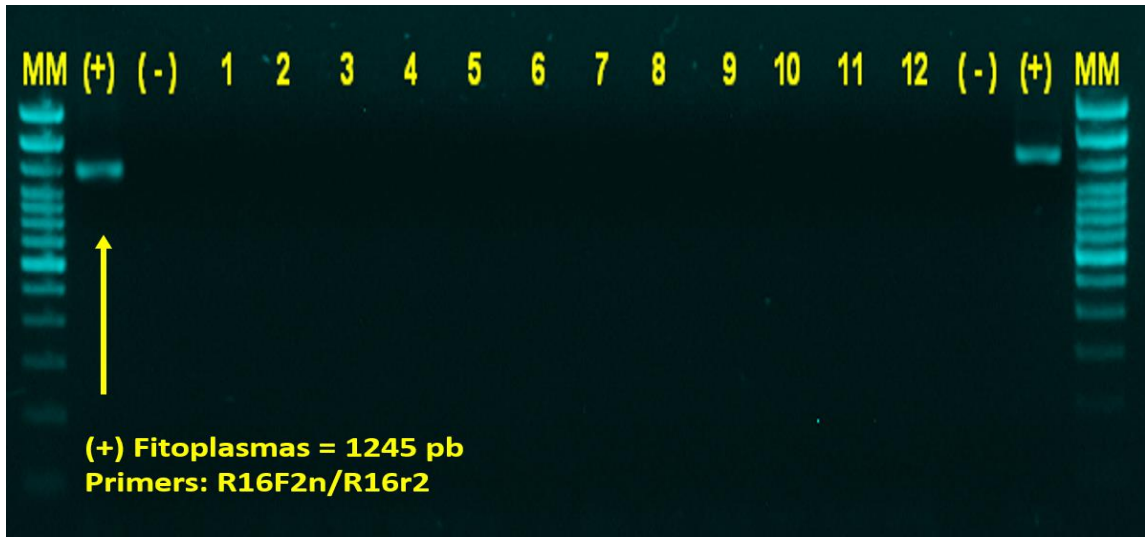


Figura 25 Ausencia del “CaPhy” en huevecillos de “*B. cockerelli*” con los pares de primers P1/P7 y R16F2n/R16R2. Carriles; 1(MM), 2 control positivo (+), 3 control negativo (-), 4-15 ausencia de bandas de amplificación, 16 control negativo (-), 17 control positivo (+) y 18 (MM). Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador Molecular 1Kb

DISCUSIÓN

La comprobación de la presencia o ausencia de “CaLso” en tubérculos certificados de papa e insectos adultos de “*B. cockerelli*”, se realizó con la finalidad de descartar de manera precisa la posible adquisición de la bacteria directamente de plantas infectadas, de manera tal, que la transmisión de los patógenos a estudiar fuera exclusivamente por parte del insecto vector a plantas sanas y a su progenie.

En los resultados obtenidos en los bioensayos de transmisión transovárica de “CaLso” se pudo observar un 66.7% (2 muestras de 3) de transmisión del patógeno solamente en la primera generación a partir de la inoculación con huevecillos de plantas sanas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hansen y colaboradores en el 2008, quienes reportan la existencia de transmisión transovárica, donde la presencia de “CaLso” fue detectada en un 100% (3 de 3 pooled positivos) y un 47.36% (9 de 19 huevecillos positivos), estos resultados fueron obtenidos de ensayos realizados en plantas de papa. De igual manera Casteel y colaboradores (2012) realizaron pruebas de frecuencia de infección en huevecillos de *B. cockerelli* procedentes de líneas isofemale en plantas de tomate, indicando un rango de infección de 46.7 a 87.5%, pasando de una infección moderada a alta. Melgoza Villagómez y colaboradores (2018) reportaron la presencia de CaLsol en huevecillos de *B. cockerelli* en cultivos de tomate, chile y papa, siendo este el primer reporte realizado en México que respalda la hipótesis sobre la transmisión transovárica de este patógeno.

Sin embargo, en el caso de los resultados negativos durante el desarrollo de los siguientes bioensayos, existen factores que pudieron llegar a influenciar la ausencia de “CaLso” en los huevecillos de “*B. cockerelli*”, como lo fue el cambio drástico de las condiciones de desarrollo los bioensayos, lo cual se pudo corroborar con la baja en la oviposición y eclosión de huevecillos, debido que en el tercer bioensayo la cantidad de huevecillos eclosionados era de 70, mientras que para el cuarto bioensayo solamente se desarrollaron 20 huevecillos, esto podría deberse que las condiciones, específicamente a la temperatura dentro del invernadero fluctuaba con periodos muy intensos de calor, por lo tanto no se podía controlar el aumento o descenso en la temperatura, la cual debió ser de 26°C, pero no fue así. A los 17 °C o menos, “CaLso” se ve afectada, pero esto no

previene su desarrollo en la planta; mientras que, a 32 °C, o más, la bacteria se inhiben así como los síntomas que ocasiona Munyaneza (2012), reportó que el desarrollo óptimo de la bacteria se encuentra de 27 a 32 °C. List (2009) menciona que el desarrollo óptimo de “*B. cockerelli*” se da a 27 °C; mientras que la oviposición, eclosión, desarrollo y sobrevivencia son retardados o reducidos en 32 °C, y cesan a partir de 35 °C. Por lo tanto, como lo indican Munyaneza y List una sola generación puede completarse en tres a cinco semanas, según las condiciones de temperatura, mismas que son favorables a “CaLso” y al desarrollo de los síntomas de “ZC”. Otro factor de importancia es como afecta el patógeno el desarrollo y reproducción del insecto. Nachappa (2012) demostró que “CaLso” afecta negativamente la fecundidad, los porcentajes de supervivencia de ninfas de “*B. cockerelli*” y el número de progenie de primera generación filial (F1), incluidos huevecillos, ninfas y adultos. En general, las hembras experimentaron niveles decrecientes de fecundidad al aumentar la concentración del patógeno.

En los tres primeros bioensayos se puede observar una constante en la presencia de la bacteria, con porcentajes para ninfa y tejido vegetal del 55.5% y en adultos de un 100%, debido a que las condiciones de desarrollo del patógeno y de “*B. cockerelli*” eran las óptimas, lo cual se confirma con los resultados de amplificación. Caso contrario para los bioensayos 4 y 5 donde las condiciones como ya se mencionaron no eran las óptimas y el desarrollo de vector-patógeno se vio afectado, obteniendo resultados de un 16.6% de presencia en ninfas, 66.7% en adultos y ausencia de la bacteria en el tejido vegetal. Incluso la presencia de ácaros (araña roja) y mosca blanca afectaron el desarrollo de los bioensayos, donde no se pudo controlar su presencia y afectaba a las colonias de “*B. cockerelli*”, llegando casi a la eliminación de estas. La detección de CaLsol ninfas e insectos adultos coinciden con reportes en donde se señala que las ninfas en su quinto estadio son capaces de transmitir con menor eficiencia a la bacteria en comparación a los adultos, esto se puede deber a el comportamiento en la alimentación o en los sitios de alimentación de las ninfas. También es posible que la incidencia y la concentración de la bacteria en las diferentes etapas del psilido puedan diferir conforme a su desarrollo. Debido a la poca movilidad de las ninfas, es probable que sean menos efectivas en la propagación de “CaLso”(Buchman *et al.*, 2011; Cooper *et al.*, 2014).

La transmisión de “CaPhy” a plantas sanas mediante la inoculación con adultos de “*B. cockerelli*”, fue negativa y se determinó con la ausencia del patógeno en las plantas inoculadas. Estos resultados no coinciden con datos en donde se habla de la detención con respecto a la presencia de “CaPhy” y “CaLsol” en un 47.7% de plantas de papa, lo cual los señala como patógenos complementario haciendo referencia a la presencia en conjunto donde se puede detectar fitoplasmas se encuentra “CaLsol”.(Gutiérrez Ibañez *et al.*, 2013), pero sí coinciden con los datos reportados por J. E. Munyaneza (2005) y Salas Marina & Flores Olivas (2006), quienes reportan que especies de la familia Cicadellidae como lo es “*Circulifer tenellus*”, tienen capacidad de transmitir fitoplasmas a cultivo de papa en cualquiera de sus etapas fenológicas y son más eficientes que “*B. cockerelli*” en la transmisión de fitoplasmas. Rubio (2006), mediante el muestreo de regiones productoras de papa detecto la presencia de fitoplasma en un 34% de las muestras colectadas. Con anterioridad se han reportado a “*B. cockerelli*” como vector de “CaPhy” asociado a PMP (Almeyda León *et al.*, 2004; García Negroe, 2007; Garzón *et al.*, 2004). Por lo cual, se debe investigar más a profundidad los factores que intervinieron en los resultados negativos encontrados en este estudio con respecto a la detección de “CaPhy”, como es el hecho de evaluar a especies reportadas como eficientes en la transmisión de fitoplasmas como lo es “*Circulifer tenellus*”. De manera tal, que el uso de este vector como medio de inoculación de fitoplasmas a plantas sanas, podría ser de utilidad para corroborar que los resultados negativos en la detección de “CaPhy” en plantas colonizada por “*B. cockerelli*” infectivos se debe a su ineficiencia en la transmisión de fitoplasmas y no a la ausencia del patógeno.

Durante el desarrollo del bioensayo de transmisión de fitoplasmas se pudieron observar de manera gradual la presencia de sintomatología relacionada a PMP como lo fueron los tubérculos aéreos, yagas axilares, enroscamiento de las hojas y una ligera decoloración en las puntas de hojas nacientes de las plantas de papa, los cuales coinciden con lo reportado por Almeyda (1999) y Rubio (2011) que reportan achaparramiento de la planta, formación de tubérculos aéreos, coloración morada en las hojas superiores y por último muerte prematura de las plantas infectadas por fitoplasmas. Debido a que la sintomatología consistía con la presencia de “CaPhy”, pero los resultados del análisis molecular indicaban lo contrario, se optó por realizar el análisis molecular de las

muestras para determinar la presencia de “CaLso”, obteniendo resultados positivos y pudiendo observar el aumento gradual de la presencia de la bacteria relacionado al tiempo de muestreo, indicando que desde el primer día de realizada la inoculación las plantas de papa adquirieron la bacteria, de manera tal, que al mes y medio después de la inoculación del fragmento aplicado de 669 pb se ve mucho más evidente y clara. Estos resultados coinciden con la sintomatología en papa para ZC reportada por Munyaneza (2007).

Rashed y colaboradores (2012) indican que la distribución de “CaLso” en toda la planta se verá influenciada por la etapa de crecimiento de la planta y la dirección neta de transporte de masa de la savia del floema. Un factor a considerar es el número de insectos vectores el cual puede afectar el tiempo que toma la expresión de los síntomas, debido a la diferencia inicial del inóculo inyectado; aunque después de la multiplicación bacteriana y el movimiento sistémico dentro del hospedante, la enfermedad se incrementa en la misma tasa. Por lo tanto, el aumento gradual de la concentración de la bacteria en las muestras de tejido vegetal, puede depender del desarrollo de la planta, la distribución de la bacteria en el hospedero y la cantidad de insectos vectores que se utilizaron para la inoculación de las plantas.

Los resultados negativos a la presencia de “CaPhy” en huevecillos de “*B. cockerelli*” coinciden con lo publicado por Agrios (1995), indicando que la transmisión transovárica de fitoplasmas no es posible, por lo cual al eclosionar las ninfas deben alimentarse de plantas infectadas para que se vuelvan infecciosas. Aunque en algunos casos se puede dar la transmisión de fitoplasmas a huevecillos, esto dependerá del vector, debido a que la transmisión difiere entre vectores (Nault & Rodríguez, 1985). Se ha reportado la presencia de fitoplasmas en los órganos reproductivos (ovarios, testículos y receptáculos seminales), huevecillos, ninfas e insectos adultos de la primera y segunda generación de vectores como *Mutsumuratettix hiroglyphicus* (Familia: Cicadellidae), *Hishimonoide sellatiformis* (Familia: Cicadellidae) y *Cacopsylla melanoneura* (Familia: Psyllidae) (Kawakita *et al*, 2000; Hanboonsong *et al*, 2002; Tedeschi *et al*, 2006).

Es necesario que se realice un estudio más preciso sobre la interacción que existe entre los huevecillos de “*B. cockerelli*” y su planta hospedera, debido a que pudiera existir la

adquisición de la *CaLsol* por la absorción de agua, nutrientes y solutos disueltos en el hospedero, los cuales son tomados por medio del “pedicelo” del huevecillo y no directamente del insecto madre (White, 1968), lo cual eliminaría la posibilidad de la transmisión transovárica por “*B. cockerelli*”. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo y los reportes anteriores sobre transmisión transovárica de Casteel, Hansen y Melgoza deben ser tomados con minuciosa consideración, debido a que durante el proceso de cada uno de los experimentos los insectos adultos portadores de la bacteria no fueron retirados del entorno en donde se encontraron los huevecillos, por lo cual pudieron ovipositar en hojas infectadas, y los huevecillos que realmente no estaban infectados pudieron adquirir a “*CaLso*” a través del transporte de solutos y no por la transmisión del adulto a la progenie.

CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en huevecillos provenientes de poblaciones infectivas de “*B. cockerelli*” del 1er bioensayo.
- No se detectó la presencia de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en huevecillos de “*Bactericera cockerelli*” del 2do al 5to bioensayo.
- Se detectó la presencia de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en ninfas y adultos de “*Bactericera cockerelli*” en todos los bioensayos.
- Se detectó la presencia de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en tejido vegetal de papa en todos los bioensayos.
- Se determinó la transmisión transovárica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” por “*Bactericera cockerelli*”, al menos en la primera generación proveniente de insectos infectivos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el estudio más preciso de la interacción que existe entre los huevecillos de “*B. cockerelli*” y un hospedero infectado con “CaLso”, esto debido a la posible adquisición de este patógeno mediante la absorción directamente de una planta infectada y no necesariamente mediante la transmisión de un insecto adulto a su progenie.

Se requiere establecer un procedimiento de extracción de DNA exclusivamente de huevecillos de *B. cockerelli* y estandarización de la técnica.

Uso de la técnica de q-PCR es indispensable para respaldar los resultados obtenidos mediante PCR punto final, debido a que el PCR tiempo real es más sensible que el PCR punto final y puede realizar la detección del patógeno de interés con concentraciones mínimas de DNA.

Es necesario establecer una colonia de “*Circulifer tenellus*” portadores de “CaPhy” en papa con la finalidad de tener la seguridad de que la colonia está infectiva con el fitoplasma, y pueda ser utilizada en los ensayos de transmisión con este mismo insecto y con “*B. cockerelli*”.

Implementación de técnicas no destructivas para la detección de “CaLsol” y “CaPhy”

REFERENCIAS

- Abdullah, N. M. M. (2008). Life history of the potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in controlled environment agriculture in Arizona. *African Journal of Agricultural Research*, 3, 60–67.
- Agrios, G. (1995). *Fitopatología* (2da.; E. Limusa, ed.).
- Alfaro-Fernández, 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(4), 581–581. <https://doi.org/10.1094/pdis-10-11-0878-pdn>
- Almeyda León, I. H., Rocha, P. M., Piña, R. J., & Martínez, S. J. (2001). The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19, 1–9.
- Almeyda León, I. H., Rubio Covarrubias, O. A., & Zavala, Q. T. (1999). Determinación de la implicación de fitoplasmas con la expresión sintomatológica de punta morada en papa (*Solanum tuberosum*). *IV Simposio de Ciencia y Tecnología Desarrollo Agropecuario*, 45. Monterrey, N.L.
- Almeyda León, I., S., S., & Garzón-Tiznado, J. (2004). Detección molecular de fitoplasma en papa. In: *XXI Semana Internacional de Parasitología. Memorias Del Simposio Punta Morada de La Papa*, 4–13. Saltillo, Coah.
- Almeyda León Isidro Humberto, Sánchez Salas José Alfredo, & Garzón Tiznado José Antonio. (2008). Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica En México*, 34(2), 141–150. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172008000200001
- Becerra, A. F. (1989). *Biología de Paratrioza cockerelli (Sulc) y su relación con la enfermedad del “Permanente de tomate” en el Bajío*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Beltran Beache, M. (2014). *Inducción de resistencia en tomate (Solanum lycopersicum L.) a Candidatus Liberibacter solanacearum, mediante la aplicación de alcaloides*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Bové, J. . (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88, 7–37.
- Buchman, J. L., Sengoda, V. G., & Munyaneza, J. E. (2011). Vector transmission efficiency of *Liberibacter* by *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in zebra chip potato disease: effects of psyllid life stage and inoculation access period. *Journal Economic Entomology*, 104, 1486–1495.

- Burckhardt, D., & Lauterer, P. (2007). A taxonomic reassessment of the trioqid genus *Bactericera* (Hemiptera: Psylloidea). *Journal of Natural History*, 31, 99–153.
- CABI. (2013). “Candidatus *Liberibacter solanacearum*.” *EPPO Bulletin*, 43(2), 197–201. <https://doi.org/10.1111/epp.12043>
- CABI. (2019a). *Bactericera cockerelli* (psílido de tomate / patata). Retrieved November 25, 2019, from CABI website: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45643#3E251AEE-1674-4FA3-94BB-19EBB02F5E5D>
- CABI. (2019b). Candidatus *Phytoplasma australiense*. Retrieved November 26, 2019, from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/39956>
- Cadena Hinojosa, M. A. (1996). La punta morada de la papa en México: II. Efecto cubiertas flotantes cultivares y productos químicos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 14, 20–24.
- Cadena Hinojosa, M. A., Guzman, P., & Díaz, V. (2003). Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tuberculos de papa (*Solanum tuberosum*) en valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 248–258.
- Capoor, S. P., Rao, D. G., & Viswanath, S. M. (1967). *Diaphorina citri* Kuway., a vector of greening disease of citrus in India. *Indian of Agricultural Sciences*, 37, 527–575.
- Casteel, C. L., Hansen, A. K., Walling, L. L., & Paine, T. D. (2012). Manipulation of Plant Defense Responses by the Tomato Psyllid (*Bactericera cockerelli*) and Its Associated Endosymbiont Candidatus *Liberibacter Psylla*rous. *PLoS ONE*, 7(4), e35191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035191>
- Cen, Y., Zhang, L., Xia, Y., Guo, J., Deng, X., Zhou, W., ... Gao, Y. (2012). Detection of ‘Candidatus *Liberibacter Asiaticus*’ in *Cacopsylla* (*Psylla*) *citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae) . *Florida Entomologist*, 95(2), 304–311. <https://doi.org/10.1653/024.095.0210>
- Compere, H. (1915). *Paratrioza cockerelli* (Sulc).
- CONPAPA. (2018). CONPAPA. Retrieved June 26, 2019, from <https://www.conpapa.org.mx/>
- Cooper, W. R., Sengoda, V. G., & Munyaneza, J. E. (2014). Localization of ‘Candidatus *Liberibacter solanacearum*’ (Rhizobiales: Rhizobiaceae) in *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 107(1), 204–210. <https://doi.org/10.1603/an13087>

- Crawford, D. L. (1911). American Psyllidae III (Triozinae). *Pom. J. Entomol*, 3, 422–453.
- Crawford, D. L. (1914). *A monograpy of the jumping plant-lice of the new world*.
- Crosslin, J. M. (2010). Potato zebra chip disease a phytopatological tale. *Plant Health Progress*.
- 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(2), 125–135. <https://doi.org/10.3958/059.036.0202>
- Delgado-Ortiz, J. C., Beltrán-Beache, M., Cerna-Chávez, E., Aguirre-Uribe, L. A., Landero-Flores, J., Rodríguez-Pagaza, Y., & Ochoa-Fuentes, Y. M. (2019). Candidatus Liberibacter solanacearum patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y control. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990, January 1). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Retrieved from <https://www.scienceopen.com/document?vid=46e6093b-769a-467f-be1a-fd0c2ecfa9c0>
- EPPO. (2011). European and Mediterranean Plant Protection Organizati6n.
- EPPO. (2019). “Candidatus Liberibacter solanacearum.” *EPPO Bulletin*. <https://doi.org/10.1111/epp.12043>
- FAO. (2008). A6o internacional de la PAPA 2008, Tesoro enterrado, Variedades de la papa. Retrieved November 5, 2019, from FAO website: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/index.html>
- FAOSTAT. (2008). Food and Agricultural Organization of United Nations. Retrieved from <http://faostat.fao.org>.
- FAOSTAT. (2017). FAOSTAT. Retrieved November 5, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Flores Villela, O. A., Aleman, N. I. A., & Notario, Z. M. I. (2004). Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. In O. A. Flores, M. G. Gallegos, & M. O. Garcia (Eds.), *Memorias de Simposio Punta Morada de la Papa* (pp. 40–63).
- García Negroe, C. B. (2007). *TRANSMISI6N DE FITOPLASMAS POR Bactericera cockerelli (Sulc) A PLANTAS DE CHILE, PAPA Y TOMATE*. Instituto Polit6cnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaci6n para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.

- 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*, 47. San Luis Potosí, México.
- Garzón-Tiznado, J. A., Cárdenas-Valenzuela, O. G., Bujanos-Muñiz, R., Marín-Jarillo, A., Becerra-Flora, A., Velarde-Felix, S., ... Martínez-Carrillo, J. L. (2009). Asociación de Hemiptera: Triozidae con la Enfermedad ‘Permanente del Tomate’ en México*. *Agricultura Técnica En México*, 35(1), 61–72. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172009000100006
- Garzón, T. J. ., Bujanos, M. R., Velarde, F. S., Marin, J. A., Parga, T. V. M., Almeyda León, I. H., & Sánchez, A. J. (2004). Bactericera (Paratrioza) cockerelli Sulc., vector de fitoplasmas en México. *Memorias de Simposio Punta Morada de La Papa*, 64–83.
- Garzón, T. J. ., Garzón, C. J. A., Velarde, F. S., Marin, J. A., & Cardenas, V. O. G. (2005). Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al “permanente del tomate” por el psílido Bactericera cockerelli SULC en México. *Entomología Mexicana*, 4, 672–674.
- Goolsby, J. A., Adamczyk, A., Bextine, B., Munyaneza, J. E., & Bester, G. (2007). Development of an IMP program for management of the potato psyllid to reduce incidence of zebra chip disorder in potatoes. *Subtrop. Plant. Sci. J.*, 59, 85–94.
- Gutierrez Ibañez, A. T., Sánchez Pale, J. R., & Ramírez Dávila, J. F. (2013). *Detección de Ca Liberibacter solanacearum y fitoplasmas en cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) en el Valle de Toluca* . 145–149. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/39844/41765>
- Haapalainen, M. (2014). Biology and epidemics of Candidatus Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 172–198. <https://doi.org/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. <https://doi.org/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 Bactericera cockerelli (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5862–5865. <https://doi.org/10.1128/AEM.01268-08>
- Hodkinson, I. D. (2009, January). Life cycle variation and adaptation in jumping plant

- lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): A global synthesis. *Journal of Natural History*, Vol. 43, pp. 65–179. <https://doi.org/10.1080/00222930802354167>
- INIFAP. (2000). *Manual para la Producción de Papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México*.
- Jagoueix, S., Bove, J.-M., & Garnier, M. (1994). The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus Is a Member of the Subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 379–386. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379>
- Jones, P. (2002). Phytoplasma plant pathogens. In M. Waller & J. M. Lenné (Eds.), *Plant Pathologists Pocketbook*. Wallingford, UK.
- Keremane, M. L., Ramadugu, M. L., Castaneda, A., Diaz, J. E., Penarada, E. A., Chen, J., ... Lee, R. F. (2015). Report of Candidatus *Liberibacter caribbeanus*, a new citrus and psyllid associated *Liberibacter* from Colombia, South America. *American Phytopathological Society Annual Meeting*, 101. Pasadena, CA.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Hammond, R. W., & Davis, R. E. (1994). Use of mycoplasma-like (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested- to mixed -MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84, 559–556.
- Levy, J., Ravindran, A., Gross, D., Tamborindeguy, C., & Pierson, E. (2011). Translocation of “Candidatus *Liberibacter solanacearum*”, the Zebra Chip pathogen, in potato and tomato. *Phytopathology*, 101(11), 1285–1291. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-11-0121>
- Leyva, N. E. (2002). *Detección y caracterización de fitoplasmas asociados a enfermedades de la papa*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas.
- 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. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0208>
- Liefting, L. W., Weir, B. S., Pennycook, S. R., & Clover, G. R. G. (2009). “Candidatus *Liberibacter solanacearum*”, associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(9), 2274–2276. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007377-0>
- Lin, H., Lou, B., Glynn, J. M., Doddapaneni, H., Civerolo, E. L., Chen, C., ... Vahling, C. M. (2011). The complete genome sequence of “Candidatus *Liberibacter solanacearum*”, the bacterium associated with potato Zebra Chip disease. *PLoS*

ONE, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019135>

- List, G. M. (2009). The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Journal Economic Entomology*, 32, 30–36.
- Liu, D., Trumble, J. T., & Stouthamer, R. (2006). Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 118(3), 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00383.x>
- López Buenfil, J. A. (2017). *Protocolo para la Detección de Fitoplasmas por PCR Convencional y PCR cuantitativa (qPCR)*. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/240517/PROTOCOLO_PARA_LA_DETECCION_DE_FITOPLASMAS_POR_PCR_CONVENCIONAL_Y_PCR_CUANTITATIVA__qPCR_.pdf
- Lorus, M., & Marguery, M. (1980). Field guide to North American insects and spider. *National Audubon Society. Alfred, A. Knopf, New Cork*, 499.
- Maramorosch, K. (1998). Current status of potato purple top wilt. *J. Trop. Plant Dis*, 16, 61–72.
- 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.*, 84–96. Saltillo, Coah.
- Marín, J. A., Garzón, T. J. ., Becerra, A. F., 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*, 38, 25–32.
- Mawassi, M., Dror, O., Bar-Joseph, M., Piasezky, A., Sjölund, J. M., Levitzky, N., ... Bahar, O. (2018). “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” is tightly associated with carrot yellows symptoms in Israel and transmitted by the prevalent psyllid vector *bactericera trigonica*. *Phytopathology*, 108(9), 1056–1066. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-17-0348-R>
- McClellan, A. P. D., & Oberholzer, P. C. J. (1965). Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *South African Journal Of Agricultural Science*, 8, 297–298.
- Melgoza Villagómez, C. M., León Sicairos, C. D. R., López Valenzuela, J. Á., Hernández Espinal, L. A., Velarde Félix, S., & Garzón Tiznado, J. A. (2018). Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa. *Revista Mexicana de Ciencias*

Agrícolas, 9(3), 499–509. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.267>

- Morris, J., Shiller, J., Mann, R., Smith, G., Yen, A., & Rodoni, B. (2017). Novel ‘Candidatus Liberibacter’ species identified in the Australian eggplant psyllid, *Acizzia solanicola*. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 833–844. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12707>
- Munyaneza, J. E. (2005). Purple top disease and beet leafhopper transmitted virescence agent (BLTVA) phytoplasma in potatoes of Pacific Northwest of the United States. *Potato in Progress, Science Meets Practice. Proceedings of the Potato Congress*, 211–220. Emmloord, The Netherlands.
- Munyaneza, J. E., Buchman, J. L., Sengoda, V. G., Fisher, T. W., & Pearson, C. C. (2011). Susceptibility of selected potato varieties to zebra chip potato disease." *American Journal of Potato Research*, 88, 435–440.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., & Buchman, J. L. (2009). Seasonal occurrence and abundance of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, in South Central Washington. *American Journal of Potato Research*, 86, 513–518.
- Munyaneza, 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. *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 656–663. <https://doi.org/10.1093/jee/100.3.656>
- Munyaneza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. (2010). First Report of “Candidatus Liberibacter solanacearum” Associated with Psyllid-Affected Carrots in Europe . *Plant Disease*, 94(5), 639–639. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-5-0639a>
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., De la Rosa-Lozano, G., & Sanchez, A. (2009). First Report of ‘Candidatus Liberibacter psyllaourous’ 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, Joseph E., Sengoda, V. G., Buchman, J. L., & Fisher, T. W. (2012). Effects of temperature on “Candidatus liberibacter solanacearum” and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease*, 96(1), 18–23. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0185>
- 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*, Vol. 44, pp. 174–176. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-174>
- 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(1), 186–187.
<https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-186>
- 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.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-11-0084>
- Nault, L., & Rodríguez, J. (1985). *The leafhoppers and planthoppers* (I. John Wiley & Sons, Ed.).
- Nelson, W.R., Munyaneza, T. E., McCue, K. F., & Bové, J. . (2013). The Pangaean origin of ‘Candidatus *Liberibacter*’ species. *Journal of Plant Pathology*, 95, 455–461. <https://doi.org/10.4454/JPP.V9513.001>
- Nelson, Warrick R, Fisher, T. W., & Munyaneza, J. E. (2011). Haplotypes of “Candidatus *Liberibacter solanacearum*” suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 5–12.
<https://doi.org/10.1007/s10658-010-9737-3>
- Nissinen, A. I., Haapalainen, M., Jauhiainen, L., Lindman, M., & Pirhonen, M. (2014). Different symptoms in carrots caused by male and female carrot psyllid feeding and infection by ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*.’ *Plant Pathology*, 63(4), 812–820. <https://doi.org/10.1111/ppa.12144>
- 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.*, 15–22. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/323178654_Candidatus_Liberibacter_agentes_causales_de_enfermedades_importantes_en_cultivos_de_interes_en_Espana
- Pearson, C. C., Backus, E. A., & Munyaneza, J. E. (2010). Feeding biology of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*. In A. Workneh, Rashed, & C. M. Rush (Eds.), *Proceedings of the 10th Annual Zebra Chip Reporting Session* (pp. 178–182). San Antonio, TX.: 6-9 November 2012.
- Pertot, I., Musetti, R., Pressaco, L., & Osler, R. (1998). Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharatus roseus* infected for the agent of the cloverly phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasmas morphology. *Journal Entomology*, 95, 13–23.

- Pitman, A. R., Drayton, G. M., Kraberger, S. J., Genet, R. A., & Scott, I. A. W. (2011). Tuber transmission of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” and its association with zebra chip on potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, *129*, 389–398. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9702-1>
- Pletsch, D. J. (1947). The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. *Mont. Agric. Exp. Stn. Bull*, *446*, 95.
- Product: DNAzol®ES (Extra Strength)*. (2014).
- Rashed, A., Nash, T. D., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2012). Transmission efficiency of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” and potato zebra chip disease progress in relation to pathogen titer, vector numbers, and feeding site. *Phytopathology*, *102*, 1079–1185.
- Rashed, A., Wallis, C. M., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2013). Zebra chip disease and potato biochemistry: tuber physiological changes in response to “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection over time. *Phytopathology*, *103*, 419–426.
- Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., & Gross, D. (2011). Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, “*Candidatus Liberibacter solanacearum*.” *Plant Disease*, *95*, 1542–1546.
- REAUMUR. (1740). *Memoires pour servir a l’histoire des insectes : Réaumur, René-Antoine Ferchault de, 1683-1757: Free Download, Borrow, and Streaming: Internet Archive*. Retrieved from <https://archive.org/details/memoirespourserv02ra/page/182>
- Reveles Torres, L. R., Velásquez Valle, R., Mena Covarrubias, J., Salas Muñoz, S., & Mauricio Castillo, J. A. (2016). *Candidatus Liberibacter solanacearum: Un nuevo fitopatogeno en el cultivo del chile en el norte centro de México*.
- Rowe, J. A., & Knowlton, G. F. (1935). Studies upon the morphology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Utah Acad. Sci. Arts. Lett.*, *12*, 223–239.
- Rubio-Covarrubias, O. Á., Almeyda-León, I. H., Cadena-Hinojosa, M. A., & Lobato-Sánchez, R. (2011). Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaureus* en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *2*(1), 17–28.
- Rubio-Covarrubias, O. Á., Humberto Almeyda-León, I., Armando Cadena-Hinojosa, M., & Lobato-Sánchez, R. (2011). Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaureus* en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *2*, 17–28. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n1/v2n1a2.pdf>

- Rubio Covarrubias, O. A., Almeyda León, I. H., Moreno, J. I., Sanchez, A., Sosa, J. A., Borbon, S. J., Cadena Hinojosa, M. A. (2006). Distribution of potato purple top and "*Bactericera cockerelli*" Sulc. in the main potato production zones in México. *Agricultura Técnica En México*, 32, 201–211.
- Salas Marina, M. A., & Flores Olivas, A. (2006). *EFICIENCIA DE INSECTOS VECTORES EN LA TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Secor, G. A., Rivera, V. V., Clover, G. R. G., Liefing, L. W., Li, X., & De Boer, S. H. (2009). New Diseases and Epidemics Association of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" with Zebra Chip Disease of Potato Established by Graft and Psyllid Transmission, Electron Microscopy, and PCR. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0574>
- Sengoda, V. G., Buchman, J. L., Henne, D. C., Pappu, H. R., & Munyaneza, J. E. (2013). "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" Titer Over Time in "*Bactericera cockerelli*" (Hemiptera: Triozidae) After Acquisition From Infected Potato and Tomato Plants. *Journal of Economic Entomology*, 106(5), 1964–1972. <https://doi.org/10.1603/ec13129>
- Sengoda, V. G., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Buchman, J. L., & Pappu, H. R. (2010). Phenotypic and Etiological Differences Between Psyllid Yellows and Zebra Chip Diseases of Potato. *American Journal of Potato Research*, 87(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s12230-009-9115-x>
- SIAP. (2018). Resumen producción de papa por estado. Retrieved November 22, 2019, from http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- SIAP, S. de I. A. y P. (2019). La papa, el cuarto cultivo de mayor producción en el mundo | Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | Gobierno | gob.mx. Retrieved November 5, 2019, from <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-papa-el-cuarto-cultivo-de-mayor-produccion-en-el-mundo>
- Sulc, K. (1909). A novelty front North America, being also of economic importance. *Acta Societate Entomologia Bohemicae*, 6, 102–108.
- Swisher, K. D., Munyaneza, J. E., Velásquez Valle, R., & Mena Covarrubias, J. (2018). Detection of pathogens associated with psyllids and leafhoppers in *Capsicum annum* L. in the Mexican states of Durango Zacatecas and Michoacan. *Plant Disease*, 102, 146–153.
- Tanaka, F. A. O., Colletta-Filho, H. D., Alves, K. C. S., Spinelli, M. O., A., M. M., & Kitajima, E. W. (2007). Detection of the "*Candidatus Liberibacter americanum*" in phloem vessel of experimentally infected *Cataranthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 519–519.

- Tanne, E., Boudon-Padeu, E., Clair, D., Davidovich, M., Melamed, S., & Klein, M. (2001). Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Phytopathology*, *91*, 741–746.
- Teixeira, D. D. O. C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., & Bove, J. (2005). Candidatus *Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1857–1862).
- Teresani, G. R., Hernández, E., Bertolini, E., Siverio, F., Moreno, A., Fereres, A., & Cambra, M. (2017). Transmission of ‘Candidatus *Liberibacter solanacearum*’ by *Bactericera trigonica* Hodkinson to vegetable hosts. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *15*(4). <https://doi.org/10.5424/sjar/2017154-10762>
- Toledo, M. (2016). Manejo de la paratritioza (*Bactericera cockerelli*) en cultivo de papa. In *OI*. Retrieved from www.dicta.hn
- Vargas Salinas, M. (2017). *Caracterización Molecular de Begomovirus y Fitoplasmas Asociados a una Infección Mixta en Calabacita Cucubirta pepo L. en B.C.S., México*.
- Vereijssen, J., Smith, G. R., & Weintraub, P. G. (2018). *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) and *Candidatus liberibacter solanacearum* in potatoes in New Zealand: Biology, transmission, and implications for management. *Journal of Integrated Pest Management*, *9*(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmy007>
- Wallis, C. M., Chen, J., & Civerolo, E. L. (2012). Zebra chip-diseased potato tubers are characterized by increased levels of host phenolics, amino acids, and defense-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *78*(66–72).
- Wallis, R. L. (1955). Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. *USDA Tech. Bull.*, *1107*, 25.
- Weintraub, P. G., & Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, *51*, 91–111.
- Wen, A., Mallik, I., Alvarado, V. Y., Pasche, J. S., Wang, X., Li, W., ... Mirkov, T. E. (2009). Detection, distribution, and genetic variability of “Candidatus *Liberibacter*” species associated with zebra complex disease of potato in North America. *Plant Disease*, *93*, 1102–1115.
- White, T. C. R. (1968). Uptake of water by eggs of *Cardiospina densitexta* (Homoptera: Psyllidae) from leaf of host plant. *Journal of Insect Physiology*, *14*(11), 1669–1683. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90100-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90100-5)
- Zhao, X. Y. (1981). Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) in China. a review,

Proceedings of international society of citriculture. *Internacional Society of Citriculture, 1*, 466–469.

ANEXOS

Anexo 1. Fechas, lugar y condiciones donde se realizaron la recolección y el ayuno de los insectos adultos, así como el establecimiento de la colonia de “*B. cockerelli*”

Establecimiento de Colonia de “<i>Bactericera cockerelli</i>”			
Actividad	Fecha	Lugar	Condiciones
Recolección insectos	5 de Septiembre del 2018	Campo Experimental “Ing. Humberto Treviño Siller” en la Colonia Agrícola Navidad, en Galeana, Nuevo León (25°04’N y 100° 37’ O)	Aspirador bucal, ± 100 insectos adultos de <i>B. cockerelli</i> trasladados en recipientes de 50 ml y cubiertos con tela de organza
Ayuno	5 de Septiembre del 2018	Departamento de Parasitología de la UAAAN	Temperatura de 14±2°C
Establecimiento de Colonia	6 de Septiembre del 2018	Invernadero de Parasitología de la UAAAN	Temperatura 26±2°C, 14 horas de luz 8 horas de oscuridad, Jaula de forrada con tela de organza, 4 plantas de papa
Chequeo de la colonia en periodos de 2 a 3 días, rotación de plantas de papa para su mantenimiento, peligros constantes ácaros araña roja y mosca blanca			

Anexo 2. Metodología y calendarización del bioensayo de transmisión de "CaPhy" por "*B. cockerelli*"

Transmisión de "CaPhy" por " <i>Bactericera cockerelli</i> " en plantas de papa				
Actividad	Fecha	Lugar	Condiciones	Observaciones
Toma de Insectos	18 de Septiembre del 2019	Invernadero de Parasitología de la UAAAN	Aspirador bucal, 30±1 insectos adultos de <i>B. cockerelli</i>	El aumento en la población de insectos era evidente desde el establecimiento de la colonia
Ayuno	18 de Septiembre del 2018	Departamento de Parasitología De la UAAN	Temperatura de 14±2°C, en un recipiente de plástico cubierto con organza, 24 horas de ayuno	Al principio los insectos estaban inquietos, conforme el cambio de temperatura y el paso de las horas la actividad fue bajando
Inoculación	19 de Septiembre del 2018	Invernadero de Parasitología de la UAAAN	Temperatura 28±2°C, 14 horas de luz 8 horas de oscuridad, Jaula de forrada con tela de organza, 4 plantas de papa, 24 horas de alimentación	Se colocaron los insectos poco a poco en las primeras hojas de las plantas, algunos seguían en el recipiente por lo que se optó por dejarlo dentro de la jaula hasta que salieran solos
Retiro	20 de Septiembre del 2018			4 insectos murieron, los insectos restantes se retiraron de las plantas y se pasaron a la colonia inicial, revisaron las plantas para evitar dejar huevecillos ovipositados en las hojas de la planta
Toma de muestra	20 de Septiembre del 2018			De las hojas donde se dejaron a los insectos alimentando y se tomaron muestras, con tijeras, colocadas en sanitas, papel aluminio y bolsa rotulada día de la muestra

Toma de muestra	27 de Septiembre del 2018			Se tomaron muestras de las hojas nacientes, con tijeras, colocadas en sanitas, papel aluminio y bolsa ziploc, rotulada semana de la muestra
Toma de muestra	19 de Octubre del 2018			Se pudo observar un ligero cambio en la coloración de algunas hojas y brotes axilares, se tomaron muestras, colocadas en sanitas, papel aluminio y bolsa ziploc, rotulada mes de la muestra
Toma de muestra	8 de Noviembre del 2018			Se pudieron observar síntomas más claros como los tubérculos aéreos, holas ligeramente enroscadas y con coloración amarilla, se tomaron muestras de los tubérculos aéreos, muestra etiquetada al mes y medio

Chequeo continuo del bioensayo, riego de plantas cada 3er día, peligros constantes ácaros araña roja y mosca blanca

Anexo 3. Metodología de los bioensayos de transmisión transovárica de "CaLsol" y "CaPhy" por "*B. cockerelli*".

Transmisión Transovárica de " <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> " por " <i>Bactericera cockerelli</i> " en plantas de papa					
Actividad	Fecha	Lugar	Condiciones	Observaciones	# Huevecillos
Toma de huevecillos	22 de Octubre del 2018	Invernadero de Parasitología de la UAAAN	Caja húmeda: caja petri y algodón húmedo. La hoja se cortó del peciolo, se enredó en algodón húmedo y plástico adherente y se colocó en la cámara	La coloración de los huevecillos era en una tonalidad amarilla casi naranja y se podían observar en algunos huevecillos unos puntos rojos	25±2
1era Transmisión Transovárica	22 de Octubre del 2018	Departamento de Parasitología De la UAAAN	Temperatura de 25±1°C, 14 horas de luz 10 de oscuridad, jaula de madera forrada con organza, lámparas de 17 watts luz cálida y fría	Debido a la presencia de ácaros y mosca blanca en el Invernadero de Parasitología, los bioensayos se realizaron en una cámara bioclimática	25±2
2da Transmisión Transovárica	26 de Noviembre del 2018			Se tomaron del primer bioensayo hojas con huevecillos usando el mismo procedimiento con cama húmeda	53±2
3ra Transmisión Transovárica	29 de Diciembre del 2018			Algunas de las plantas se veían etioladas por lo cual se procedió a cambiar la luz por un poco más cálida	75±2
4ta Transmisión Transovárica	30 de Enero del 2019			Algunas de las plantas se veían etioladas por lo cual se procedió a cambiar a luz amarilla cálida	64±2
4ta Transmisión Transovárica	14 de Febrero del 2019			Temperatura 20±2°C, se colocó bolsas y tela de organza sobre las jaulas para evitar que las bajas de temperatura afecten el bioensayo	Debido a problemas externos al experimento, las colonias obtenidas desde la 1era hasta la 4ta fueron cambiadas al invernadero
4ta Transmisión Transovárica	25 de Febrero del 2019	Invernadero del Departamento de Parasitología UAAAN	Temperatura no regulada 22±2°C, la temperatura empezó a ir en aumento	La colonia se infestó de araña roja, las plantas se iban marchitando y tomando una coloración blanca debido a los ácaros, los cuales no permitieron un buen desarrollo de las ninfas por lo cual se tomó la decisión de tomar huevecillos de la 3ra generación y empezar nuevamente con el 4to bioensayo	Se tomaron 40±2
4ta Transmisión Transovárica	13 de Marzo del 2019		Temperatura 30±2°C, temperatura y humedad alta	Problemas con mosca blanca y ácaros retrasaron de nuevo el cuarto bioensayo, por lo cual al no contar con los productos necesarios para su control se optó por repetir el bioensayo, ahora con una limpieza extrema y más cuidado, el desarrollo	Se tomaron 28±2

				de los insectos disminuyo en gran parte a las condiciones de temperatura las cuales no se podían regular	
5ta Transmisión Transovárica	17 de Abril del 2019		Temperatura no regulada de 30±4°C, los cambios de temperatura eran drásticos y no se podían controlar.	el desarrollo de este último bioensayo se vio ligeramente más lento a comparación con los tres primeros, seguía la escases de huevecillos en las hojas.	Se tomaron 30±2
5ta Transmisión Transovárica	30 de Abril del 2019	Departamento de Parasitología UAAAN	Temperatura no regulada de 25±1°C, 14 horas de luz 8 de oscuridad, lampara 17 watts luz cálida	A mediados de este bioensayo las condiciones de luz, ambiente y temperatura cambiaron, esperando a que no se viera afectado el desarrollo de <i>B. cockerelli</i>	

Chequeo continuo del bioensayo, riego de plantas cada 3er día, peligros constantes ácaros araña roja y mosca blanca

Anexo 4 Fecha de oviposición de los huevecillos de “*B. cockerelli*”. Fecha de la inoculación con huevecillo

Origen de los Huevecillos	Fecha de oviposición	*Fecha de inoculación
Colonia “ <i>B. cockerelli</i> ”	17-18 de Octubre del 2019	22 de Octubre del 2019
1er Bioensayo	23-24de Noviembre del 2019	26de Noviembre del 2019
2do Bioensayo	27 de Diciembre del 2019	29 de Diciembre del 2019
3er Bioensayo	10 de Marzo del 2019	13 de Marzo del 2019
4to Bioensayo	15 de Abril del 20199	17 de Abril del 20199

Anexo 5. Número de huevecillo utilizados para la inoculación, tiempo de eclosión y número de huevecillos eclosionados.

Bioensayo	Numero de Huevecillos	Tiempo de Eclosión(Día)s	# de Huevecillos Eclosionados	Fecha de eclosión
1	25	5±1	22	27 de Octubre del 2019
2	53	5±1	48	28 de Noviembre del 2019
3	75	4±1	71	1 de Enero del 2019
4	28	5±1	16	19 de Marzo del 2019
5	30	6±2	24	22 de Abril del 2019

Anexo 6 Calendarización de siembra de tubérculos de papa.

Calendario de Siembra papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)			
Fecha	# de plantas	Días de riego	Uso
4 de Julio del 2018	48	Cada 3er día	Producción de semilla: 36 tubérculos variedad <i>Fianna</i> 12 tubérculos variedad <i>Ágata</i>
16 de Agosto del 2018	8	Cada 3er día	4 plantas=Para establecimiento de Colonia de " <i>Bactericera cockerelli</i> " 4 plantas= Mantenimiento de Colonia
6 de Septiembre del 2018	8	Cada 3er día	4 = Bioensayo de Transmision de " <i>CaPhy</i> " 4= Mantenimiento de Colonia

21 de Septiembre del 2018	12	Cada 3er día	4 = 1er Bioensayo de Transmisión Transovárica 4= Mantenimiento de Colonia
5 de Octubre del 2018	8	Cada 3er día	8= Mantenimiento de Colonia
22 de Octubre del 2018	8	Cada 3er día	4= 2do Bioensayo de Transmisión Transovárica 4= Mantenimiento de Colonia
5 de Noviembre del 2018	8	Cada 3er día	8= Mantenimiento de Colonia
21 de Noviembre del 2018	8	Cada 3er día	4= 3er Bioensayo de Transmisión Transovárica 4= Mantenimiento de Colonia
6 de Diciembre del 2018	8	Cada 3er día	8= Mantenimiento de Colonia
20 de Diciembre del 2018	8	Cada 3er día	4= 4to Bioensayo de Transmisión Transovárica 4= Mantenimiento de Colonia
10 de Enero del 2019	8	Cada 3er día	8= Mantenimiento de Colonia
25 de Enero del 2019	8	Cada 3er día	4= 5to Bioensayo de Transmisión Transovárica 4= Mantenimiento de Colonia

8 de Febrero del 2019	8	Cada 3er día	8= Mantenimiento de Colonia
25 de Febrero del 2019	12	Cada 3er día	12= Mantenimiento de Colonia y repetición de bioensayos
19 de Marzo del 2019	12	Cada 3er día	8 = Mantenimiento de Colonia y repetición de bioensayos 4= 5to Bioensayo
Temperatura 25 ± 1 °C, 14 h de luz 8 h de oscuridad, 3:1 sustrato-perlita			