

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Transmisión Transovárica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” por
Bactericera cockerelli en *Solanum tuberosum* L

Por:

KAREN IVOON GALINDO GIL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Transmisión Transovárica de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" por
Bactericera cockerelli en *Solanum tuberosum* L

Por:

KAREN IVOON GALINDO GIL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor Principal



Dra. Ma Elizabeth Galindo Cepeda
Coasesor



M.C. Juan Mayo Hernández



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México.

Agosto, 2018

Agosto, 2018

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por permitirme estar aquí y cuidar de mí en todo momento a lo largo de este camino, por darme fuerzas para nunca rendirme aun en los días difíciles y poder concluir esta meta en la vida.

A MI ALMA TERRA MATER por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de superarme, por haberme dado las herramientas necesarias y conocimientos para poder formarme en el ámbito profesional.

Al Dr. Alberto Flores Olivas por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo, por los conocimientos compartidos y el apoyo brindado.

Al M.C. Juan Mayo Hernández por su disposición y contribución en la revisión de este trabajo, por su apoyo, confianza, por los conocimientos compartidos, por las buenas pláticas y sobre todo por su gran amistad a lo largo de este tiempo.

A la M.C. Flor S. Hernández Hernández por su paciencia y apoyo que me brindo para que este trabajo se haya realizado, por su tiempo y sus conocimientos compartidos.

Al M.C. Antonio Cárdenas Elizondo, por brindarme siempre su apoyo y alentarme a seguirme preparando, por compartirme sus experiencias y amistad.

A Eduardo Castañeda Michaca por compartir gran parte de este camino conmigo, por todos los momentos y locuras en este tiempo.

A Rodrigo Grimaldo Santana por acompañarme en gran parte de este camino, Por siempre darme ánimos, por su confianza, comprensión y amor en este tiempo.

A mis amigos por estar siempre en todo momento, por todo el apoyo y momentos compartidos y hacer más amena mi estancia en la universidad: Especialmente a Karla Citlaly Rodríguez, Liz N. Díaz, Uriel García, Elena Guadalupe García, Edgar de Jesús Guzmán, Dulce Cosme, Graciela Villatoro, Reyes López, Raquel Fajardo, Eduardo Hidalgo, Enrique Rodríguez.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES por darme la vida y ser mi motivación a lo largo de este camino. Por ser un excelente ejemplo de sacrificio y esfuerzo para mí, ustedes me inspiran a ser mejor y me dan la fuerza necesaria para afrontar mis problemas.

A mi padre Sebastián Galindo Urbina por ser un gran hombre, por su amor y dedicación a sus hijas y apoyarme siempre en cada una de mis metas, por aconsejarme y motivarme a crecer. Por enseñarme a valorar las oportunidades y enseñarme a nunca rendirme en la vida.

A mi madre Irene Gil Campos por ser una gran mujer y darme siempre alas para volar en la vida, por la paciencia, confianza, comprensión, apoyo y todo el amor que me ha brindado en todo momento. Por tener siempre los brazos y palabras adecuadas para nunca dejarme caer. Por enseñarme lo fuerte que puede ser a pesar de las adversidades.

A MIS HERMANAS Sandy y Yuliana, por acompañarme a lo largo de este camino, brindándome siempre su cariño y Comprensión.

A MI SOBRINO Dylan Anrubio Galindo por todo el amor que me brinda y ser una motivación más en mi vida, por cada abrazo y beso que alegra mis días.

A MI ABUELA Apolinar Campos Moreno por siempre motivarme a seguir, por su cariño y consejos que algún día me brindo.

A MI TIO Humberto Gutiérrez Burgos por ser parte fundamental de mi crecimiento, por su apoyo y cariño incondicional. Por ser un ejemplo y enseñarme que puedo llegar tan lejos como yo quiera.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
El cultivo de la papa.....	5
Origen y distribución	5
Importancia económica.	5
Principales enfermedades de la papa.....	5
Descripción de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	6
Transmisión “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	9
Detección “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	9
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	9
Electroforesis	10
Vector de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	10
<i>Bactericera cockerelli</i>	11
Descripción morfológica	12
Temperatura y desarrollo.....	17
Daño Ocasionado por <i>Bactericera cockerelli</i>	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Localización del proyecto.....	19
Obtención de material biológico.....	19
Obtención de psílicos	19
Obtención de minitubérculos	19
Infestación de plantas de papa con <i>B. cockerelli</i>	19
Extracción de ADN vegetal.....	20
Extracción de ADN insectos	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Detección de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	25
CONCLUSIÓN.....	27
LITERATURA CITADA.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Bactericera cockerelli</i> Fuente: Garzón et al., 2007	13
Figura 2. Huevecillos de <i>B. cockerelli</i> depositados en márgenes de las hojas	13
Figura 3. Primer estadio de <i>B. cockerelli</i>	14
Figura 4. segundo estadio de <i>B. cockerelli</i>	15
Figura 5. Tercer estadio de <i>B. cockerelli</i>	15
Figura 6. Cuarto estadio de <i>B. cockerelli</i>	16
Figura 7. Quinto estadio de <i>B. cockerelli</i>	16
Figura 8. Adulto de <i>B. cockerelli</i>	17
Figura 11. Se observa el gel de electroforesis en la cual no se detectó la presencia de CaLso en los insectos de <i>B. cockerelli</i> , utilizados en la inoculación de las plantas. Al igual que no se detectó CaLso en las muestras de tejido vegetal de papa.	24
Figura 9. En la imagen se puede observar gel de agarosa resultado de electroforesis para visualizar la integridad del ADN en material vegetal de papa (1-7).....	24
Figura 10. En la imagen se puede observar el gel de agarosa resultado de electroforesis para visualizar calidad de ADN en adultos de <i>B. cockerelli</i>	25

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo de gran importancia en México debido a sus cualidades alimenticias, adaptación climática y alto rendimiento, superado por el maíz, frijol, trigo y arroz (Hooker, 1998).

En 2016, se registró una superficie mundial de 19.3 millones de hectáreas, con producción de 376 millones de toneladas (FAOSTAT, 2016), sembrada en 100 países. En México, para ese mismo año, la SAGARPA reportó una producción de 1 millón 796 mil 813 toneladas, en una superficie de 64,465 ha, de las cuales en Sinaloa se cultivaron 13 mil ha, con una producción de 360 mil ton, haciendo notar que la producción de este tubérculo ha ido a la alza en los últimos 10 años. Actualmente se cultiva en 22 estados de la República Mexicana durante todo el año (SIAP, 2016).

Desafortunadamente estos rendimientos y calidad son afectados por la presencia de enfermedades causadas por hongos, bacterias, nemátodos, virus y fitoplasmas. En la actualidad los productores se han visto perjudicados por la presencia de la punta morada de la papa, mencionada por primera vez en México por Niederhauser y Cervantes en 1956, fue observada en el valle de Toluca, en Guanajuato, en Zamora, Michoacán y en los estados de Puebla y Tlaxcala. García (1996) señaló que para la década de los noventa en las áreas paperas de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y otras zonas, se comenzó a manifestar una enfermedad que ocasionaba amarillamientos, enrollamientos de folíolos de color morado, formación de tubérculos aéreos, necrosis vascular en tallo y tubérculos, lo que actualmente se llama “Síndrome de la punta morada de la papa” (PMP). Y que se encuentra prácticamente presente en todos los continentes. A nivel nacional la incidencia de ésta enfermedad se ha mantenido en porcentajes altos, para 1993 alcanzó un 30%, el 60% en 1994 y hasta el 90% en 1995 de tubérculos dañados. Durante los años 2003 y 2004., la incidencia de esta enfermedad se incrementó considerablemente, llegando al 100 por ciento en algunas áreas productoras de Coahuila y Nuevo León (Flores, *et al.* 2004).

El síndrome PMP es un conjunto de síntomas desarrollados principalmente por el ataque de la bacteria "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" (CaLso) y fitoplasmas (Cadena *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2013; Garzón *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Alarcón, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2011). En Estados Unidos la enfermedad causada en la papa por CaLso se le conoce como Zebra Chip (ZC) debido al pardeamiento que ocasiona en la pulpa del tubérculo (Abad *et al.*, 2009; Liefting *et al.*, 2009), inicialmente a la bacteria se le nombro "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" (Hansen *et al.*, 2008). Otro problema sanitario es el Amarillamiento del Psílido (AP), ocasionado según algunos autores por la inyección de toxinas que realiza el psílido *Bactericera cockerelli*. Al alimentarse de la planta (Severin, 1940; Wallis, 1948; Liu *et al.*, 2006), aunque hasta la fecha no se ha realizado la descripción bioquímica de esas toxinas.

La PMP es uno de los principales problemas que afectan el cultivo de papa en México (Rubio *et al.*, 2006) y también tiene gran importancia en varias regiones de Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2008), Estados Unidos de América y Centro América (Munyanza *et al.*, 2007; Munyanza *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009). Las regiones más afectadas en México son el Centro (Edo. de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Veracruz), el Noreste (Coahuila y Nuevo León) y el Bajío (Guanajuato y Michoacán). La región Noroeste (Sonora, Sinaloa, Baja California, Chihuahua) y la zona de Tapalpa, Jal. Son afectadas en menor grado que las anteriores; sin embargo, el problema se ha ido incrementando en los últimos años (Rubio *et al.*, 2011b).

Las plantas infectadas desde el inicio de su desarrollo pueden ser aniquiladas y los tubérculos provenientes de plantas infectadas en etapas posteriores son de tamaño pequeño y presentan un pardeamiento interno por lo que son rechazados en el mercado en fresco y tampoco sirven para la producción de hojuelas fritas, la cual es la principal forma de procesamiento de la papa en México. Dependiendo de la etapa de desarrollo en que las plantas son infectadas, el rendimiento de tubérculos puede disminuir entre 10 y 100% y como consecuencia las pérdidas económicas son muy cuantiosas si es que se toma en cuenta que los costos de producción son en promedio \$ 230,000.00 pesos /ha (*comunicación personal).

(* Dr. Alberto Flores Olivas, Maestro Investigador de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Mayo-2018)

En la actualidad, el control de la PMP se basa exclusivamente en la aplicación intensiva de insecticidas químicos, por lo que es necesario establecer un sistema de control integrado de la enfermedad que incluya el uso de variedades tolerantes, insecticidas biológicos y prácticas culturales (Rubio *et al.* 2011a).

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe transmisión transovarial de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" en *Bactericera cockerelli*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Conocer si existe transmisión de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" en papa por ninfas N1 y N2.

2.- Conocer si existe transmisión de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" de adultos de *Bactericera cockerelli* a ninfas de *Bactericera cockerelli*.

3.- Obtener colonias de *Bactericera cockerelli* libres de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*".

REVISIÓN DE LITERATURA

El cultivo de la papa

Origen y distribución

La papa (*S. tuberosum*) es originaria de la cordillera de los Andes, en el altiplano andino, y puede ser encontrada hasta los 4300 msnm. Se considera que se originó en el sur de Perú, en los límites de Bolivia a partir del complejo *Solanum brevicaulis*, y la *ssp tuberosum* en las tierras bajas de la parte central de Chile (Spooner *et al.*, 2005). En América hay unas 200 especies de papas silvestres, y en el suroeste de Estados Unidos y Centro América, generalmente se encuentran en altitudes que van de medias a altas; mientras que en Sudamérica se localizan a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta el noroeste de Argentina y en las tierras bajas de Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay y el sureste de Brasil (Hawkes, 1994). México, Bolivia y el norte de Argentina se consideran centros de diversificación de las papas silvestres (Hawkes, 1990). La mayoría de especies crecen en los Andes, 28 de ellas se desarrollan en México (Spooner *et al.*, 2004), y se localizan en todos los estados, con excepción de Baja California, Campeche, Tabasco, Quintana Roo y Yucatán (Villa-Vázquez y Rodríguez, 2010).

Importancia económica.

La papa está ubicada entre los primeros cuatro cultivos de mayor importancia en el mundo, después del arroz, trigo y maíz (CONPAPA, 2010). Sin embargo, la producción de este cultivo es afectada por una gran cantidad de factores parasitológicos, la enfermedad de PMP está causando mayores daños, ya que actualmente está afectando al 50% de la superficie nacional y sobre la cual se ha determinado a *B. cockerelli* como vector (Salas, 2006).

Principales enfermedades de la papa

Los principales problemas fitosanitarios a los que se enfrenta la producción de papa son principalmente *Phytophthora infestans*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter*

michiganensis subsp. *sepedonicus* y “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (CaLso). Esta bacteria es transmitida por *B. cockerelli* o pulgón saltador, considerándose una plaga de suma importancia al ser vector de la misma (CONPAPA, 2013). Liefting y colaboradores (2009) reportaron que CaLso causo pérdidas de 4 millones de dólares en invernaderos comerciales de tomate en Nueva Zelanda. Así mismo se ha encontrado afectando cultivos de zanahoria (Munyanza *et al.*, 2010).

Descripción de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Existe una bacteria denominada “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, descubierta recientemente, que afecta la producción en cultivos como la papa, tomate, pimiento (*Capsicum annum*) y zanahoria (*Daucus carota*); esta bacteria es miembro del genero *Liberibacter*, pertenece a la subdivisión Proteobacteria. Organismo pleomorfo sin pared celular) se desarrolla en el floema de las plantas y en el sistema digestivo del insecto vector (*B. cockerelli*) no se ha podido cultivar in vitro. (Cadena *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2013; Garzón *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Alarcón, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2011).

Ubicación taxonómica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Dominio: Bacteria

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Phyllobacteriaceae

Género: *Candidatus Liberibacter*

Especie: “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (sin. *psyllaourous*)
(CABI, 2015).

CaLso es una bacteria perteneciente a la familia Phyllobacteriaceae, Gram-negativa, limitada al floema de las plantas cuya transmisión principalmente se da a través de insectos vectores (de forma circulatoria y transovarial en algunas especies), aunque también puede darse por injerto, por semilla o por tubérculos de patata infectados (Buttler y Trumble, 2012.)

Situación a nivel mundial

Hasta la fecha se han descrito 5 haplotipos: A, B, C, D y E, los cuales tienen diversos hospedantes y cuya identificación está basada en la secuencia de 3 genes.

- Haplotipo A: se encuentra en Honduras y Guatemala a través del Oeste de México hasta Arizona, California, Oregón, Washington, Idaho y en Nueva Zelanda.
- Haplotipo B: se encuentra desde el Este de México hacia el Norte hasta Texas.
- Haplotipo C: se ha encontrado en Finlandia, Francia, Noruega y Suecia
- Haplotipo D: se ha encontrado en Marruecos y España
- Haplotipo E: se ha encontrado en Francia, Marruecos y España peninsular

Los haplotipos A y B hasta la fecha solo se han encontrado en el continente Americano y Nueva Zelanda. Causan daño en el cultivo de papa y en otras solanáceas, en los que los principales síntomas que se pueden apreciar en la parte aérea son: clorosis generalizada, coloración purpúrea del follaje con ahuecamiento basal de las hojas, enrollamiento de las hojas a lo largo de toda la planta, acortamiento y ensanchamiento de los entrenudos terminales e interrupción de la formación de frutos; mientras que en el caso de la papa en los tubérculos, además se genera un colapso de estolones, oscurecimiento del tejido vascular y estrías medulares que afectan completamente a todo el tubérculo. Los síntomas de esta enfermedad son más pronunciados cuando los tubérculos se fríen y por esa razón las papas fritas o procesadas de tubérculos afectados muestran manchas necróticas, rayas o vetas que provocan una devaluación comercial del tubérculo. Los síntomas provocados en los tubérculos de papa han permitido que esta enfermedad se

denomine “zebra chip” (Buttler y Trumble, 2012.). CaLso haplotipos A y B se transmiten principalmente a través de *B. cockerelli*. Este vector es el único que se conoce capaz de transmitir la bacteria de papa a papa, asimismo es capaz de transmitir la bacteria de manera transovarial de manera muy eficiente (Buttler y Trumble, 2012.).

Por otro lado, en México se reportaron tubérculos de papa sintomáticos (necrosis y rayado) y asintomáticos en la zona agrícola de Saltillo, Coahuila. Al realizarse el análisis de PCR utilizando los oligonucleótidos CL514F/R y OA2/OI2c, específicos para amplificar al fragmento 16S rDNA, ambos indicaron la presencia de CaLSo (Munyanza *et al.*, 2009c).

De acuerdo con las investigaciones realizadas, los análisis de tubérculos mostraron que los extractos metabólicos de las plantas sintomáticas infectadas con CaLSo, revelaron una alteración importante en los aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos, además, las concentraciones de tirosina se incrementaron hasta ocho veces, en algunos tubérculos sintomáticos (Navarrete *et al.*, 2009). Se ha demostrado que durante el ataque patogénico de la bacteria CaLSo, las células presentan una sobreproducción oxígeno, esto provoca estrés oxidativo y daño fisiológico. Las plantas aprovechan éstas moléculas reactivas para desarrollar estrategias que conducen a la autoprotección contra el patógeno (Sánchez *et al.*, 2010). Se ha considerado que “PMP”, es un problema que a nivel bioquímico, muestra alteraciones en la composición mineral del tubérculo, resultando en la producción de manchas necróticas internas en el mismo, tanto en la pulpa como en cutícula, indicando también, en resultados de análisis, niveles altos en P (fósforo), K (Potasio) y Ca (Calcio) en el tejido del floema, mientras que en otros tubérculos infectados, se han expresado niveles mayores de los minerales Mg (Magnesio), Cu (Cobre), Zn (Zinc) y B (Boro) (Miles *et al.*, 2009).

Actualmente, la estrategia más efectiva para controlar esta enfermedad es enfocarse al control químico del psílido utilizando sustancias activas como el Imidacloprid, Abamectina y Spiromesifen. Aunque es importante considerar que un manejo más efectivo de este insecto plaga, requiere también del conocimiento de su biología,

ecología, distribución geográfica y dinámica poblacional (Munyaneza *et al.*, 2011; Gharalari *et al.*, 2009).

Transmisión “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

CaLso es una bacteria persistente que se transmite a través de insectos, reproduciéndose dentro de estos y es capaz de transferirse de generación en generación de forma transovarial (Pelz-Stelinski *et al.*, 2010). Como se mencionó previamente, la transmisión de la bacteria se lleva a cabo por los insectos psílidos de *B. cockerelli*, por el fenómeno de adquisición e inoculación por alimentación (Garnier *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2008; Liefiting *et al.*, 2008; Liefiting *et al.*, 2009a).

Detección “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase Chain Reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

Electroforesis

Es una técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular y carga eléctrica. Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que las proteínas se cargan con sustancias como el SDS (detergente) que incorpora cargas negativas de una manera dependiente del peso molecular. Para la separación se usa un gel de agarosa o poliacrilamida (fibras cruzadas, como una malla). Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla, por la que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

Vector de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Es transmitida por el psílido *B. cockerelli*, insecto polígrafo que se alimenta del floema de una amplia variedad de plantas, entre las que se encuentran principalmente el tomate, la papa y el chile (Hansen *et al.*, 2008). Cuando el insecto se alimenta de las plantas infectadas, adquiere a la bacteria que pasa a través de la barrera intestinal, se multiplica dentro del individuo y una vez que llega a las glándulas salivales es transmitida a otra planta durante la alimentación (Liefting *et al.*, 2009).

Una característica común de los vectores de *Candidatus Liberibacter* es que se alimentan de dietas que contienen un exceso de una sola clase de compuestos (carbohidratos) y una deficiencia en nutrientes esenciales, por lo que requieren la presencia de simbiontes intracelulares procarióticos (endosimbiontes) que ayudan a proporcionar los nutrientes esenciales que faltan en la dieta del vector (Moran y Telang, 1998). Varios estudios reportan que *B. cockerelli*, contiene tres de estos simbiontes procarióticos; uno de estos es *Carsonella ruddii*, un simbionte obligado es requerido para la sobrevivencia del vector (Thao *et al.*, 2000). Los otros dos, son simbiontes facultativos de dos cepas diferentes de *Wolbachia spp.*, los cuales participan en la manipulación de la aptitud del insecto, proveyendo a estos de una ventaja reproductiva principalmente en las hembras que los portan (Nachappa *et al.*,

2011). Esto incrementa la dispersión de *Wolbachia* aumentando el número de vectores infectivos y por ende, la transmisión de CaLso. Sin embargo, existen evidencias que la presencia de CaLso en el interior del insecto, reduce significativamente los días de fecundación de la hembra y el porcentaje de supervivencia de las ninfas; hechos que afectan negativamente tanto la tasa de crecimiento de la población como la aptitud del vector (Nachappa *et al.*, 2012).

Bactericera cockerelli

El psílido de la papa y tomate *B. cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) ha sido una de las principales plagas de cultivos de solanáceas durante los últimos años. Esta plaga puede causar daño a los cultivos por alimentación directa y mediante la transmisión de la bacteria patógena CaLso. Se han realizado diversos estudios para determinar la relación de esta plaga y el daño que produce y para desarrollar estrategias de manejo para mitigar los daños causados por esta plaga en una amplia variedad de plantas solanáceas, aunque no se tienen resultados concluyentes de dichos estudios debido a la complejidad del patosistema *B. cockerelli* -solanáceas- CaLso. Los estudios realizados en la última década han documentado la variabilidad genética sustancial en esta especie invasora, mejorando la comprensión de la rápida evolución de las interacciones entre el insecto y la enfermedad que transmite, y la mejora de la valoración del potencial invasor de la plaga (OIRSA, 2013).

Los psílicos (Hemiptera: Triozidae) eran considerados como plagas secundarias hasta hace algunos años, pero recientemente en varias regiones de México y Centroamérica, se ha asociado a la especie *B. cockerelli*, como responsable de la transmisión de enfermedades Fitopatógenas en cultivos de solanáceas (chile, papa y tomate), y de producir daños por su efecto toxinífero en sus plantas hospedantes. *B. cockerelli*, se ha convertido en motivo de gran preocupación debido a su impacto destructivo sobre la papa, tomate y otros cultivos de solanáceas en los Estados Unidos, México y América Central (Munyaneza *et al.*, 2007b).

Es importante mencionar que CaLso, asociada con *B. cockerelli* no se ha podido cultivar de manera separada del insecto para probar los postulados de Koch (Davis *et al.*, 2008; Sechler *et al.*, 2009), lo cual ha derivado en diversas dificultades para precisar la etiología de síntomas asociados y así entender su papel como vector de dicho patógeno (Cadena *et al.*, 2003; Rubio-Covarrubias *et al.*, 2011). Debido a esta problemática, algunos países, incluido México, como Nueva Zelanda (Rubio-Covarrubias *et al.*, 2011), Australia y partes de Europa (Teresani *et al.*, 2015), consideran como plaga cuarentenaria al insecto y a la bacteria asociada y se emiten medidas de manejo de riesgo, ante cualquier intento de movilización de productos agrícolas relacionados.

Ubicación taxonómica

Según Hodkinson (2009) la ubicación taxonómica de *B. cockerelli* es la siguiente:

Reino: Animal

Phyllum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Familia: Triozidae

Género: Bactericera

Especie: *B. cockerelli* Sulc

Descripción morfológica

B. cockerelli expresa una metamorfosis incompleta estableciendo un periodo comprendido de 34.5 días, iniciando en la etapa de huevo y cinco etapas de ninfa hasta llegar a adulto, estas etapas se determinan por la temperatura, teniendo como optima 26-27 °C con 60 a 70% de humedad relativa. Este insecto se presenta con mayor incidencia en zonas agrícolas de papa, tomate, tomate de cáscara y chile, (Abdullah, 2008; Gao, 2009).

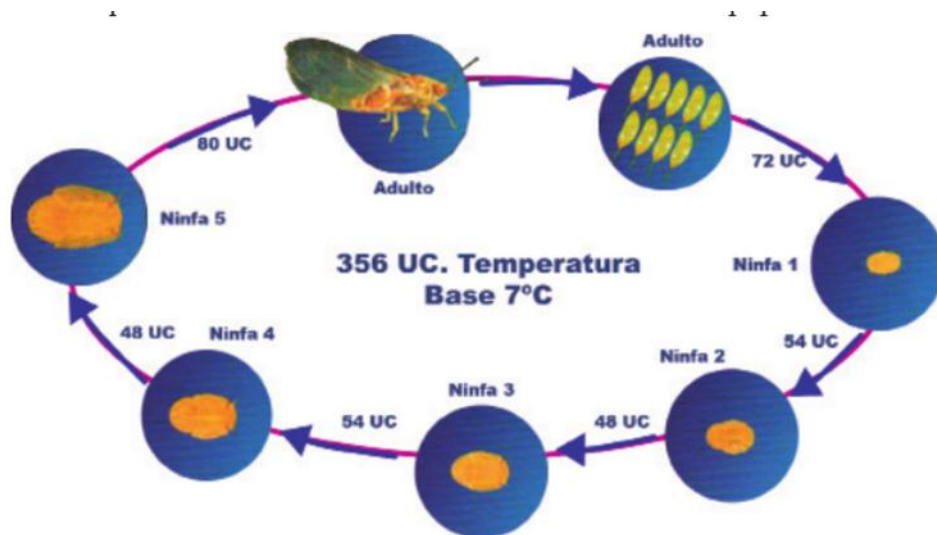


Figura 1. Ciclo biológico de *Bactericera cockerelli* Fuente: Garzón *et al.*, 2007

Huevecillos. De forma ovoide, de color anaranjado-amarillento, corion brillante, (Figura 2) presentan en uno de sus extremos un pequeño filamento, con el cual se adhieren a la superficie de las hojas (Marín *et al.*, 1995), depositados por separado, principalmente en el envés de la hoja y por lo general cerca del borde de la misma (CABI, 2015).



Figura 2. Huevecillos de *B. cockerelli* depositados en márgenes de las hojas

Los huevecillos son depositados en el haz y envés de las hojas y a lo largo de los márgenes, algunos en pecíolos o tallos y mayormente sobre hojas apicales jóvenes. Con frecuencia una hembra deposita los huevecillos en hilera, o bien puede distribuirlos sobre la superficie de dos hojas durante el transcurso de un día (Cranshaw, 2007).

Becerra (1989) señaló que cada hembra depositaba entre 1 y 11 huevecillos por día, con una media de 2.6. Adicionalmente, Hodkinson (2009) reportó que algunas hembras produjeron más de 1,300 huevecillos durante toda su vida.

Estadíos ninfales. Presenta cinco estadíos con forma oval, aplanados dorso-ventralmente, con ojos bien definidos. Las antenas presentan sencilias placoides (estructuras circulares con función olfatoria), las cuales aumentan en número y son más notorias conforme el insecto alcanza los diferentes estadíos. El perímetro del cuerpo presenta estructuras cilíndricas que contienen filamentos cerosos, los cuales forman un halo alrededor del cuerpo (Marín *et. al.*, 1995).

Primer estadío. Las ninfas presentan una coloración anaranjada. (Figura 3) Las antenas presentan los segmentos basales cortos y gruesos y se van adelgazando hasta finalizar en un pequeño segmento con dos setas sensoras; ojos notorios tanto en vista dorsal como ventral con una tonalidad anaranjada. Tórax, con paquetes alares poco notables. La segmentación en las patas es poco visible. La división del cuerpo no está bien definida (Marín *et. al.*, 1995).

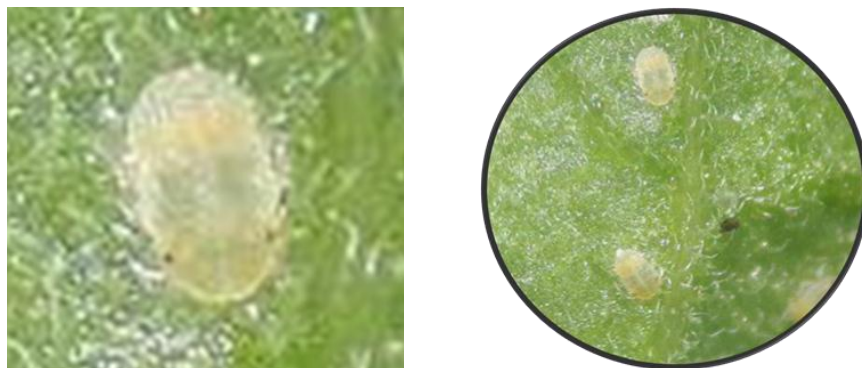


Figura 3. Primer estadío de *B. cockerelli*

Segundo estadío. A partir de este estadío, se aprecian claramente las divisiones entre cabeza, tórax y abdomen (Figura 4). La cabeza presenta un matiz amarillento, las antenas son gruesas en su base y se estrechan hacia su parte apical presentando en estas dos setas sensoras. Los ojos presentan un color anaranjado oscuro. El tórax es de color verde-amarillento y los paquetes alares se hacen visibles; la segmentación en las patas se hace notoria. Tanto el tórax como el

abdomen incrementan su tamaño y con esto las diferentes estructuras contenidas en ellos. El abdomen presenta una coloración amarilla, y se aprecia un par de espiráculos en cada uno de los cuatro primeros segmentos (Marín, *et. al.*, 1995).



Figura 4. Segundo estadio de *B. cockerelli*

Tercer estadio. En éste, la segmentación entre cabeza, tórax y abdomen es notoria (Figura 5). La cabeza es de color amarillo, las antenas presentan las mismas características que el estadio anterior. Los ojos presentan una coloración rojiza. El tórax, presenta un tono verde-amarillento y se observa con mucha facilidad los paquetes alares en mesotórax y metatórax. El abdomen es de color amarillo (Marín, *et. al.*, 1995).

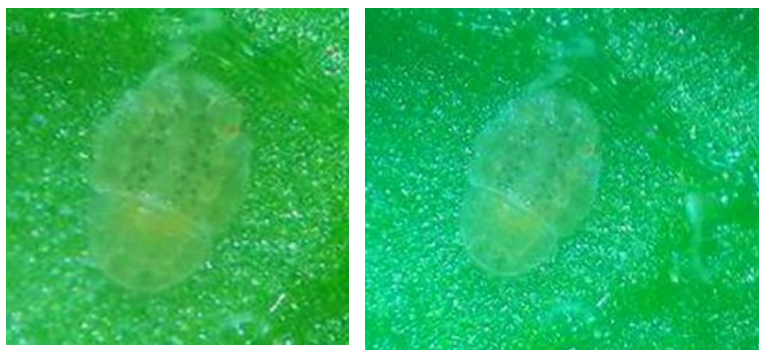


Figura 5. Tercer estadio de *B. cockerelli*

Cuarto estadio. La cabeza y antenas presentan las mismas características del estado anterior. El tórax es de color verde-amarillento, la segmentación de las patas está bien definida y se aprecia en la parte terminal de las tibias posteriores, los segmentos tarsales y un par de uñas (Figura 6); estas características se aprecian fácilmente en

ninfas aclaradas y montadas. Los paquetes alares están bien definidos. La coloración del abdomen es amarilla y cada uno de los cuatro primeros segmentos abdominales presenta un par de espiráculos. La separación entre el tórax y el abdomen es notoria (Marín, *et. al.*, 1995).



Figura 6.Cuarto estadio de *B. cockerelli*

Quinto estadio. La segmentación entre cabeza, tórax y abdomen está definida. Tanto la cabeza como el abdomen presentan una coloración verde claro y el tórax una tonalidad un poco más oscura. En la cabeza, las antenas están seccionadas en dos partes por una hendidura marcada cerca de la parte media; la parte basal es gruesa y la parte apical filiforme presentando seis sencillas placoides visibles en ninfas aclaradas y montadas. Los ojos adquieren un color guinda. El tórax presenta los tres pares de patas con su segmentación bien definida y la parte terminal de las tibiae posteriores presentan las características anteriormente señaladas. Los paquetes alares están claramente diferenciados, sobresaliendo del resto del cuerpo. El abdomen es semicircular y presenta un par de espiráculos en cada uno de los cuatro primeros segmentos (Marín, *et. al.*, 1995).



Figura 7. Quinto estadio de *B. cockerelli*

Adulto. El psílido de la papa es un insecto con alas claras de 2 mm de longitud, se asemejan a una pequeña cigarra, los psílidos adultos cambian de color a medida que envejecen, los adultos tienen un segmento blanquecino en su abdomen (Figura 8). Al igual que las ninfas, los adultos prefieren las plántulas recién trasplantadas para la ovoposición (Liu y Trumble, 2006).] Las especies pertenecientes a la familia Triozidae han trifurcado la vena basal de las alas anteriores; *B. cockerelli* puede identificarse, por los tres espolones apicales en las tibias de las patas traseras; La ala anterior del insecto tiene características adicionales, la membrana es transparente sin coloración; Insecto macho mostrando los genitales, Insecto hembra mostrando los genitales en el extremo del abdomen (Abdullah, 2008; Nielsen, 2008).



Figura 8. Adulto de *B. cockerelli*

Temperatura y desarrollo.

El rango óptimo de temperatura es de 21-27°C (Capinera, 2001; Munyaneza, 2010), temperatura arriba de 32°C es perjudicial para *B. cockerelli* porque reduce la puesta de huevos y la eclosión, 27 °C es la temperatura óptima para el psílido (Cranshaw, 2001).

Daño Ocasionado por *Bactericera cockerelli*.

Los psílidos de la papa se alimentan de la savia de las plantas hospederas; como resultado de la alimentación, producen el amarillamiento de la papa por efecto de las toxinas (daño toxínifero o directo), el efecto patológico de la toxina es temporal. Las ninfas, además de ser toxíníferas, producen secreciones cerosas de color blanquecino, las cuales dan la apariencia de sal en las hojas, de donde deriva el nombre de “salerillo de la papa” (Garzón, 2002a; Garzón, 2002b). *B. cockerelli* fue reportado en México como vector de una enfermedad en tomate denominada permanente del tomate (Garzón, 1986) y de la punta morada en papa donde se ha determinado que el insecto puede transmitirlo en un tiempo de 15 minutos después de su adquisición (Garzón, 2002b); aunque la transmisión de fitoplasmas es considerado como un daño secundario, en papa, jitomate y presumiblemente en otros cultivos solanáceos, este tipo de daño es de mayor relevancia económica que el daño toxínifero. En la región del Bajío, los insectos vectores de virus y fitoplasmas han adquirido gran importancia durante los últimos tres años. El principal problema ha sido la presencia de la enfermedad conocida como punta morada-manchado del tubérculo de la papa, que causa grandes pérdidas al cultivo por la reducción del rendimiento y calidad de las papas; el incremento de este problema ha coincidido con el incremento poblacional de su vector, el psílido *B. cockerelli* (Bujanos, 2003). La presencia de poblaciones de psílidos durante la tuberización afecta significativamente la producción de tubérculos. Una vez que los tubérculos han formado las plantas toleran más el daño (Nava, 2002). Las pérdidas en producción son del orden del 20 al 50%. Cuando las plantas son atacadas durante las primeras etapas, los tubérculos brotan prematuramente en el almacén (Ferguson *et al.*, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del proyecto

El experimento se llevó a cabo en el invernadero de Parasitología, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Obtención de material biológico.

Obtención de psílicos

Se colectaron adultos de *B. cockerelli* en cultivos de papa de la región con síntomas de Punta morada de la papa y/o zebra chip, en el estado de Nuevo León. Se estableció bajo condiciones controladas una colonia de *Bactericera cockerelli* en el invernadero de parasitología, a una temperatura de 23 ± 5 °C.

Obtención de minitubérculos

Los minitubérculos se obtuvieron de Agrícola la Agujita, ubicada en Toluca, edo. de México. Los cuales fueron colocados en macetas y llevados al invernadero de parasitología para su crecimiento y desarrollo.

Infestación de plantas de papa con *B. cockerelli*

Para inocular las plantas de papa con Calso y/o CaPa (*Candidatus Phytoplasma americanum*), se colocaron 5 adultos de *B. cockerelli* portadores de la bacteria durante 24 horas en plantas de papa dentro de bolsas de organza para su alimentación y oviposición, Pasadas las 24 horas, los adultos fueron retirados manualmente. Los huevecillos ovipositados en las plantas, fueron monitoreados hasta la presencia del primer estadio ninfal (N1) para su posterior retiro. Se retiraron 50 N1 las cuales fueron colocadas en una planta de papa sana.

Para tener nuestra segunda infestación en la cual fueron colocados 50 N1 de *B. cockerelli* portadores de la bacteria, utilizando pequeñas bolsas de organza. Se dejaron hasta completar su ciclo y los adultos fueron retirados manualmente y puestos en alcohol al 70% y guardados a - 20 °C para su posterior análisis.

Tercer infestación se colocaron 12 adultos de *B. cockerelli* portadores de la bacteria durante 24 horas y se continuo el mismo procedimiento que en las infestaciones anteriores.

Cuarta Infestación se colocaron en 3 plantas sanas, 100 N1 de *B. cockerelli* hasta completar su ciclo.

Se siguió este mismo proceso hasta concluir con 8 infestaciones.

Por cada fecha de infestación se conservaron muestras de insectos y material vegetal (tallo, hoja) a los que posteriormente se analizaron por PCR, con el objeto de determinar si eran portadores de la bacteria los cuales fueron puestos en alcohol y llevados al refrigerador a una temperatura de -20 °C para posteriormente realizar los análisis moleculares.

Extracción de ADN vegetal

Para confirmar la presencia o ausencia de CaLso en material vegetativo se realizó extracción de ADN, con el siguiente procedimiento de Doyle and Doyle (1990) con ligeras modificaciones.

1. Se pesaron 100 mg de tejido vegetal se colocó la muestra en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se trituró el tejido con el pistilo estéril en un mortero con hielo seco y se le agregó 1 ml de solución de extracción 2 ME, CTAB. (2% p/v CTAB, 100 mM, Tris-HCL, PH 8, EDTA 2.0Mm, 1.4m Nacl, 1% p/v polivinilpyrrolidona 40,000-) Precalentado a 65 °C. Se agregó 2 µl de 2% beta mercaptoetanol.
2. Se mezcló la solución en vortex y posteriormente se incubo a 65°C por 45 minutos.
3. Se agregaron 500 µl de cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 (frio), se agito por inversión. Se centrifugó a 12,000 gravedades (g) durante 15 min y se recuperó la fase acuosa a un tubo nuevo, se agregó nuevamente 500 µl de cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 (frio). Se agito por inversión. Se centrifugó a 12,000 gravedades (g) durante 15 min.

4. Se recuperó la fase acuosa y posteriormente se agregó volumen igual de isopropanol.
5. Se dejó reposar toda la noche. Colocando las muestras en un refrigerador a una temperatura de -20°C.
6. Posteriormente se sacaron las muestras del refrigerador y se centrifugaron a 12,000 gravedades (g) durante 10 min.
7. Se decantó y preparó una solución de lavado con etanol frío al 70 % con 500 µl por lavado (2 lavados). Se centrifugó a 12,000 gravedades (g) durante 15 min cada vez.
8. Posteriormente, se desechó la solución de lavado y se lavó la pastilla de ADN, Se removió en etanol por decantación y se colocaron los tubos invertidos, para secar la pastilla de ADN. Se resuspendió la pastilla de ADN en agua MILIQ agua inyectable o TE (30 A 100 µl) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

Extracción de ADN insectos

Para confirmar la presencia o ausencia de CaLso en insectos de *Bactericera cockerelli* de la colonia utilizada para el proyecto. Se realizó una extracción de ADN. (Doyle and Doyle, 1990).

Se utilizó 1 insecto de cada muestra guardada a -20°C, se colocó en una sanita estéril y se esperó a la evaporación del alcohol, posteriormente fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

1. Se agregó 300 µl de buffer de extracción y se macero con un pistilo, hasta la desintegración del insecto; se agregó 200 µl de buffer procurando lavar el pistilo, se agito 30 segundos en el vortex
2. Se agregó 500 µl de cloroformo alcohol isoamilico en relación 24:1 (frío). Se centrifugo a 12,000 gravedades (g) durante 15 minutos
3. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, posteriormente se agregó un volumen igual al recuperado de isopropanol frío y se invirtió varias veces.

4. Se colocaron las muestras a una temperatura de -20°C y se dejaron reposar toda la noche.
5. Posteriormente, se sacaron las muestras y se centrifugaron a 12,000 gravedades (g) por 10 minutos para que se formara la pastilla.
6. Se removió el isopropanol por decantación y se colocaron los tubos invertidos en una sanita, para secar la pastilla de ADN. Se resuspendió la pastilla de ADN en 50 μl de agua inyectable y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Con la finalidad de estimar la calidad y cantidad del ADN extraído en las muestras de papa e insectos, se preparó un gel de agarosa 1x y se realizó una separación de moléculas por electroforesis. Se realizó una comparación de las bandas visualizadas en el gel con un perfil de ADN cuantitativo. A continuación se presenta el procedimiento de preparación del gel para la electroforesis.

Se pesaron 0.5 gr de agarosa; posteriormente se midieron 50 ml de buffer de Tae 1x, se colocaron en un matraz y por medio de la agitación y calor se mezclaron.

Se dejó enfriar y se agregaron 3 μl de bromuro de etidio, se vació en la cámara para el enfriamiento y gelificación. Para posteriormente cargar las muestras colocando 8 μl de AND y 3 μl de buffer de carga, colocando en cada posillo un total de carga de 11 μl el cual fue conectado a la carga de poder dejándolo 45 minutos a 800 voltios y 500 rpm. Al término del programa el gel fue observado en el fotodocumentador para visualizar la calidad de ADN.

Posteriormente, se realizó una prueba de amplificación de CaLso por PCR a partir de una mezcla con los siguientes reactivos; 7.5 μl de Mytaqmix 2x, 1.5 μl de primer CL514R, 1.5 μl de primer CL514F, 3.5 μl de agua, 1 μl de ADN total de cada una de las muestras.

La amplificación por PCR para CaLso se llevó a cabo con los iniciadores OA2/Oi2c (5'-GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA-3') (5'- GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') y CL514F/CL514R (5'- 24 CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT-3') (5'- TATATCTATCGTTGCACCAG-3') que amplifican una región de 1160 y 669 pb. El

programa de amplificación fue un ciclo inicial de 95°C por 1 min, seguido de 42 ciclos de 95°C por 30s, 51°C por 30s y 72°C por 1min, con un ciclo adicional de 72°C por 10 min.

1. Se realizó una mezcla en la cual se añadió:
 - ✓ 600 µl de Mitaqmix 2x
 - ✓ 60 µl de Primer CL514R
 - ✓ 60 µl de Primer CL514F
 - ✓ 240 µl de agua

2. Después de obtener la mezcla se procedió a vaciar en los tubos 40 µl de la mezcla.

3. Se agregó 1 µl de ADNg a cada tubo más 5 µl de aceite mineral

4. Después de obtener nuestras muestras más nuestro control (+) y (-) se procedió a depositarlas dentro del termociclador con una duración de programa de 3:32 horas para la amplificación de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*"

5. Al término del programa se realizó electroforesis en la cual se cargaron las muestras en un gel para posteriormente observarlo en el fotodocumentador y visualizar la amplificación de nuestra reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de calidad de extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN implica romper o digerir las paredes celulares para liberar los constituyentes celulares. A esto le sigue la lisis de las membranas celulares para liberar el ADN para su posterior amplificación. El ADN extraído resultó adecuado para efectuar las amplificaciones por PCR. Después de la electroforesis, el gel se visualizó bajo un transiluminador UV y fue registrado utilizando el Sistema de Documentación de Gel. Las muestras de follaje de papa muestran buena calidad de ADN (figura 10).

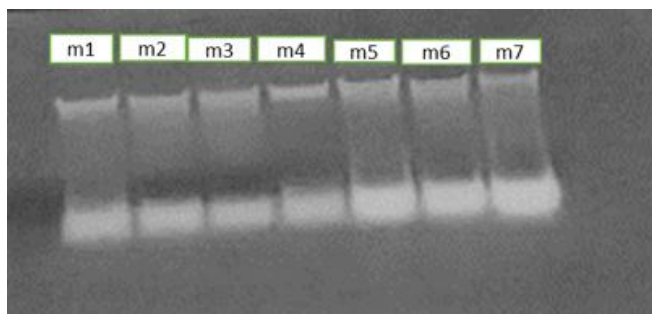


Figura 9. En la imagen se puede observar gel de agarosa resultado de electroforesis para visualizar la integridad del ADN en material vegetal de papa (1-7).

Después de la electroforesis, el gel en donde se cargaron las muestras de los insectos se visualizó bajo un transiluminador UV y fueron registrados utilizando el Sistema de Documentación del gel. Se observó buena calidad de ADN (figura 11).

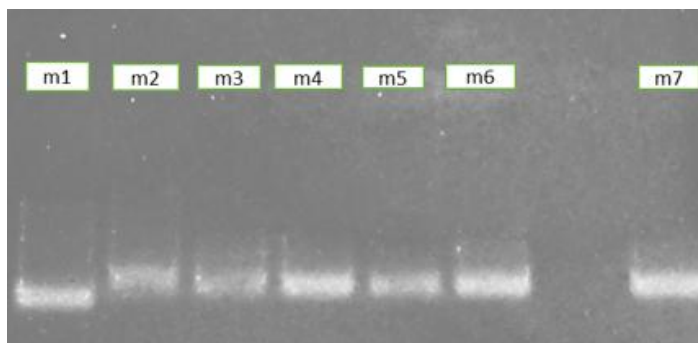


Figura 10. En la imagen se puede observar el gel de agarosa resultado de electroforesis para visualizar calidad de ADN en adultos de *B. cockerelli*.

Detección de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

En la Figuras 11, se observan los resultados obtenidos de las amplificaciones por PCR producto de las muestras vegetales e insectiles, obtenidas de las diferentes infestaciones, las cuales fueron llevadas a cabo en los meses Abril- Diciembre. En los carriles de (1-7) corresponde a insectos adultos de *B. cockerelli*, en tanto los carriles (1-6) corresponden a muestras de tejido vegetal de las plantas de papa. Cada una de las muestras indica una de las infestaciones, las cuales fueron realizadas cada que se completaba el ciclo del vector, tentativamente fueron llevadas a cabo en un promedio de un mes. En la imagen se observa que no hubo amplificación en ninguna de las infestaciones, de esta manera se demuestra la ausencia de la bacteria. El resultado de este análisis, fue a través del empleo del par de oligonucleótidos OA2/Oi2c específicos al gen 16S rRNA, correspondientes a la bacteria CaLso.

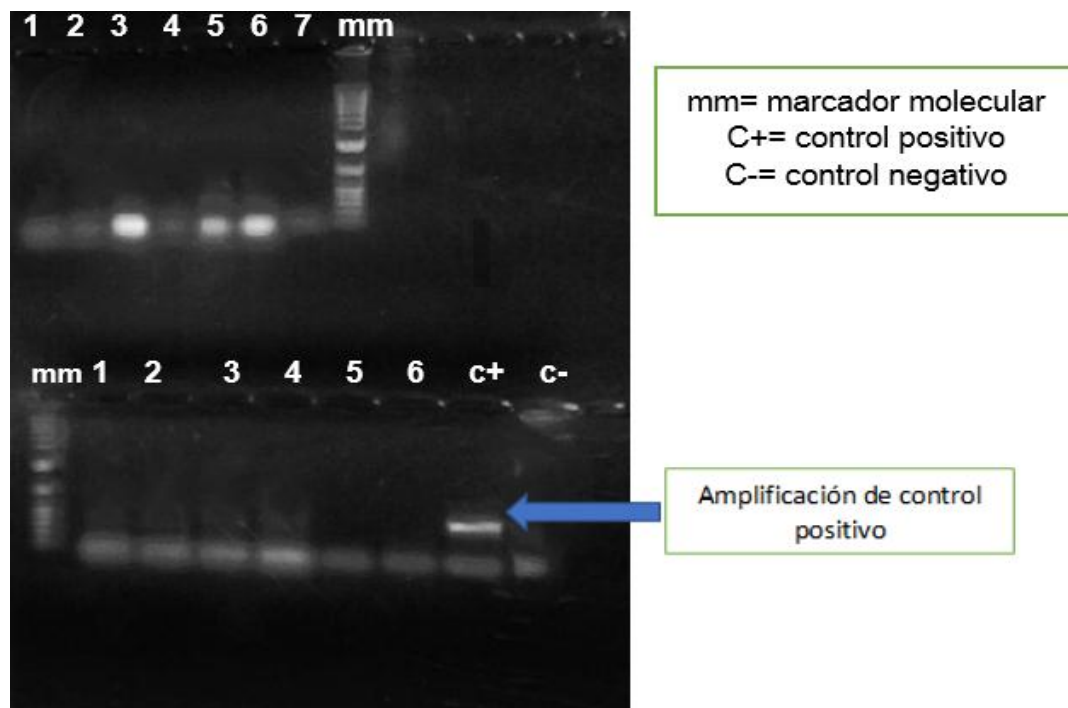


Figura 11. Se observa el gel de electroforesis en la cual no se detectó la presencia de CaLso en los insectos de *B. cockerelli*, utilizados en la inoculación de las plantas. Al igual que no se detectó CaLso en las muestras de tejido vegetal de papa.

Carril 1 al 7: Follaje de papa, carril 8: Marcador de peso molecular de 1 kb, carril 8 al 13: *B. cockerelli*, carril14: Testigo positivo, carril 15: Testigo negativo.

Uno de los factores para llegar a este resultado, pudo ser la cantidad de adultos colocados en las plantas, ya que en la primera infestación el 28 de Abril solo fueron colocados 10 especímenes en cada planta, siendo necesario tal vez un número mayor de hechos por planta y el periodo de incubación, siendo necesario dejar más de 24 horas a los adultos de *B. cokerelli* en las plantas para obtener mejores resultados.

Se utilizaron plantas de papa de la variedad ágata, la cual es susceptible a "*Candidatus Liberibacter solanacearum*", este pudo haber sido otro factor en los resultados, siendo que cambiando a otra variedad como hubiéramos tenido una mejor respuesta en la infestación.

CONCLUSIÓN.

- Del total de la muestras analizadas, ninguna amplificó para “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en tejido vegetal e insectos de *Bactericera cockerelli* respectivamente. Con lo cual se deduce que si se pudo obtener la colonia libre de la bacteria, pero por factores externos no controlados por nosotros, la colonia no se logró mantener y por lo tanto se dio por terminado el trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abad**, J.A.; Bandlia, M.; French-Monar, R.D.; Liefting, L.W., Clover, G.R.G. 2009. First Report of the Detection of "*Candidatus Liberibacter*" species in Zebra Chip Disease-Infected Potato Plant in the United States. *Plant Disease*. 93: 108.
- Alarcón**, R.N.M. 2007. Caracterización de DNA de clones de papa y fitoplasmas asociados en el valle de Toluca, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Chapingo, México. 71p.
- Alarcón**, R.N.M.; Lozoya, S.H.; Valadez, M.E. 2009. Caracterización de ADN de clones de papa e identificación de fitoplasmas asociados al síndrome de la punta morada. *Agrociencia*. 43: 357-70.
- Bujanos MR** (2003) Control químico de insectos vectores de virus y fitoplasmas en el cultivo de papa. Campo Experimental Bajío. Celaya, Guanajuato. 12 p. (Mimeografiado).
- Butler CD**, Trumble JT.2012. The potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (sulc) (Hemiptera:Triozidae): life history,relationship to plant diseases, and management strategies. *Terr Arthropod Rev* 5: 87-111
- CAB INTERNATIONAL**. 2015. “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”. En línea: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/109434>.
- Cadena**, H.M.A.Guzmán, P.R.; Díaz, V.M.; Zavala, Q.T.E.; Almeyda- León, I.H.; López, D.H.A.; Rivera, P.A.; Rubio, C.O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 248-258.
- Capinera JL**, 2001. Handbook of vegetable pests. Acedemic Press, San diego, CA.

Confederación nacional de productores de papa (CONPAPA). Monografía del sector papa. Disponible en línea <http://conpapa.org.mx/files/pages/0000000018/fichatecnica-2013.pdf>

CONPAPA. 2010. Comité Nacional Sistema Producto Papa (Confederación Nacional de Productores de Papa). In: <http://conpapa.org.mx>.

CONPAPA. 2013. Comité Nacional Sistema Producto Papa (Confederación Nacional de Productores de Papa). In: <http://conpapa.org.mx>.

Cranshaw, W. S, 2007. Diseases caused by insect toxin: psyllid yellows. In: Compendium of potato diseases (2nd Ed.) [ed. by Stevenson, W. R. \Loria, L. \Franc, G. D. \Weingartner, D. P.]. St Paul, Minnesota, USA: APS Press, 73-74.

Davis, M. J., S. N. Mondal, H. Chen, M. E. Rogers and R. H. Brlansky. 2008. Co-cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*' and '*Ca. L. americanus*' with actinobacteria from citrus with huanglongbing. Plant Dis. 92: 1547-1550.

Dr. Alberto Flores Olivas, Maestro Investigador de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Mayo-2018. (Comunicación Personal)

FAOSTAT. 2016. Food and Agricultural Organization of United Nations, Rome, Italy. In: <http://faostat.fao.org>.

Ferguson GE, Banks H, Frazer J (2001) Potato psyllid. A new pest in greenhouse tomatoes and pappers. <http://www.ipm.ucdavis.edu./rg0730081.1.html>.

Flores, o. A., m. G. Gallegos, and m. O. García. Memorias del simposio punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. 2004, Saltillo, Coahuila, México.

Gao, L. F., Yang, X.B., Jifon, J. 2009. Potato psyllid-zc Research 2008 and 2009. Vegetable Laboratory, Texas AgriLIFE Research. 58p.

- Garnier, M.,** Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P.R., Le Roux, H.F., Bove, J.M., 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of 'Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis'. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 6, 2119-2125.
- Garzón, T. J. A.** 2002. Asociación de *Paratrioza cockerelli* Sulc. Con enfermedades en papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicum* Mil. Ex. Fawnl) en México. In: Memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México. pp: 79–87.
- Garzón, T.J.A.;** Garzón, C.J.A.; Velarde, F.S.; Marín, J.A.; Cárdenas, V.O.G. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al "Permanente del Tomate" por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. en México. In: Memorias del Congreso Nacional de Entomología. 672-675pp.
- Gharalari, A. H.,** Nansen, C., Lawson, D. S., Gilley, J., Munyaneza, J. E., Vaughn, K. 2009. Knockdown mortality, repellency, and residual effects of insecticides for control of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal Economic Entomology* 102: 1032-1038.
- Hansen, A.K.;** Trumble, J.T.; Stouthamer, R.; Paine, T.D. 2008. A New Huanglongbing Species, Candidatus Liberibacter psyllaourous, found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Department of Entomology, University of California, Riverside, California. *Applied. Environmental Microbiology*. 74: 5862-5865.
- HAWKES, J. G.** 1990. *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources.* Belhaven Press. London, UK. 259 p.
- Hawkes, J. G.** 1994. Origins of Cultivated Potatoes and Species Relationships, pp. 3-42. In: *Potato Genetics.* BRADSHAWJ. E.; MACKAY.;G. R (Eds.). CAB International, Wallingford.

- Herrera, M.S.L.; Mora, M.M.E.; García, V.R.; Gomora, R.J.; Rogel, M.G.** 2013. Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa de plantas de rosal. *Terra Latinoamericana*. 31 (3): 193-199.
- Hooker WJE.** 1998. Compendium of potatoe diseases. The American Phytopathological Society: St. Paul, Minn.
- Leyva-López NE, Ochoa-Sánchez JC, Leal-Klevezas DS y MartínezSoriano JP.** 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian journal of Microbiology*, 48:1062-1068.
- Lee, I.-M.; Bottner, K.D.; Munyaneza, J.E.; Secor, G.A.; Gudmestad, N.C.** 2004. Clover proliferation group (16SrVI), subgroup a (16SrVI-A) phytoplasma is probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease*. 88: 429.
- Lee, I.-M.; Bottner, K.D.; Secor, G.A.; Rivera-Varas, V.** 2006. "*Candidatus* phytoplasma americanum", a phytoplasma associated with potato purple top disease complex. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*. 56: 1593-1597.
- Liefting, L.W.; Pérez-Egusquiza, Z.C. and Clover, G.R.** 2008. A New 'Candidatus Liberibacter' Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92(10):1474.
- Liefting, I. w., sutherland, p. w., ward, l. i., paice, k. l., weir, b. s., clover, g. r. g.** a new "Candidatus Liberibacter" species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 2009a, 93:208- 214.
- 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. *Entomol. Exp. Appl.* 118: 177-183.
- Liu, D., and J. T. Trumble.** 2006. Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 97: 1078-1085.

- Martínez**, S.J.P.; Leyva, L.N.E.; Aviña, P.K.; Ochoa, S.J.C. 2007. La punta morada de la papa en México. *Claridades Agropecuarias*. Pp. 27-33.
- Marín**, j. A, Bujanos. 1995. “ciclo biológico y morfología del salerillo *paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae) vector de la enfermedad permanente del jitomate en el Bajío”. *Catie, Manejo Integrado de Plagas, Revista Técnica* No. 38, 25-32 p
- Miles**, G. P., Buchman, J. L., Munyaneza J. E. 2009. Impact of zebra chip disease on the mineral content of potato tubers. *American Journal Potato of Research* 86: 481–489.
- Moran**, N.A., Telang, A., 1998. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience* 48, 295-304
- Munyaneza**, j. E., crosslin, j. M., upton, J. E. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology*. 2007, 100: 656–663
- Munyaneza**, J.E ; Buchman, J.L, upton,; J.E.; goalsby,; J.A, Crosslin,; J.M.; Bester, G.; Miles, G.P. and Sengoda, V.G. 2008. Impact of Different Potato Psyllid Populations on Zebra Chip Disease Incidence, Severity, and Potato Yield. *Subtropical Plant Science* 60:27-37.
- Munyaneza**, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzón, T. J. A., Cárdenas, V. O. G. 2009. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in pepper plants in México. *Plant Disease* 93: 1076.
- Munyaneza**, j. E., fisher, t. W., sengoda, v. G., garczynski, s. F., nissinen, a., and lemmetty, a. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrots in Europe. *Plant Dis.* 2010, 94:639.
- 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 Potato of Research* 88: 435-440.

- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., Tamborindeguy, C., 2011.** Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Curr Microbiol* 62, 1510-1520.
- Nachapa, p., shapiro, a., tamborindeguy, C.** Effect of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on fitness of its vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) on tomato. *Phytopathology*. 2012, 102, 41-46.
- Nava CU (2002)** Muestreo, monitoreo y umbrales económicos del psílido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Pág. 55-77. En: Avilés CM, Gálvez RJB, Garzón TJA (eds.), Memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc., como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa. 25 y 26 de julio del 2002. 100 p.
- Navarrete, d. A., shakya, r., holden, j. And crosslin, j. M.** Lc-ms analysis of Phenolic Compounds in Tubers Showing Zebra Chip Symptoms. *Am. J. Pot Res.* 2009, 86:88–95
- Nielsen, M.C.** 2008. Main characteristics to distinguish *Bactericera cockerelli* from other psyllids in New Zealand. *Plant & Food Research*.
- OIRSA**, <https://www.oirsa.org/contenido/ManualBactericeraCockerelli/version2013.pdf>
- Rubio, C.O.A.; Almeyda-León, I.H.; Ireta, M.J.; Sánchez, S.J.A.; Fernández, S.R.; Borbón, S.J.T.; Díaz, H.C.; Garzón, T.J.A.; Rocha, R.R.; Cadena, H.M.A.** 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc. en las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura Técnica en México*. 32: 201-211.
- Rubio-covarrubias., o. Á., almeyda-león, i. H., cadena-hinojosa, m, a. And lobato-sánchez, r.** Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en lotes comerciales de papa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2011, 2(1), 17-28.

- Salas, M. M. A.** 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de fitoplasma de la punta morada de la papa. Tesis de Maestría. UAAAN. Saltillo, Coahuila. México. 49p.
- Sánchez, r. s., lópez, d. h. a., mora, h. m. e., almeyda, l. h. i., zavaleta, m. h. a. Espinosa, V. D.** 2010. Salicylic acid protects potato plants from phytoplasma-associated stress and improves tuber photosynthate assimilation. American Journal Potato of Research. DOI 10.1007/s12230-010-9175-y
- Secor, g.a,** Association of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. Plant Disease. 2009, 93: 574–583.
- SECHLER, a.; e. L. Schuenzel; p. Cooke; s. Donnua; n. Thaveechai; e. Postnikova; a. L. Stone; w. L. Schneider; v. D. Damsteegt; n. W. Schaad,** 2009. “Cultivation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* and *Ca. L. americanus* associated with huanglongbing”. Phytopathology 99: 480-486
- Severin, H.H.P.** 1940. Potato naturally infected with California Aster Yellow. Phytopathology. 30: 1049-1051.
- SIAP,** (Servicio de información agrícola y pesquera) 2016. Disponible en línea <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option>
- SPOONER, D. M.; VAN DEN BERG, R. G.; RODRIGUEZ, A.; BAMBERG, J.; HIJMANS, R. H.; LARA-CABRERA, S. I.** 2004. Wild potatoes (*Solanum* section Petota) of North and Central America. Syst. Bot. Monographs 68:1-209.
- Spooner, D. M.; Mclean, K.; Ramsay, G.; Waugh, R.; Bryan, G. J.** 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 126: 14694-14696.
- TERESANI, g.; e. Hernández; e. Bertolini; f. Silverio; c. Marroquín; j. Molina; a. Hermoso de mendoza; m. Cambra.,** 2015. “Search for potential vectors of

Candidatus *Liberibacter solanacearum*: population dynamics in host crops".
Spanish Journal of Agricultural Research. 13 (1): e 10.002

Thao, M.L., Moran, N.A., Abbot, P., Brennan, E.B., Burckhardt, D.H., Baumann, P., 2000. Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Appl Environ Microbiol* 66, 2898- 2905.

Villa-Vázquez, J. L.; Rodríguez, A. 2010. Hallazgo de papas silvestres [*Solanum cardiophyllum* Lindl., *S. Ehrenbergii* (Bitter) Rydb. y *S. stoloniferum* Schldl.] cultivadas en Jalisco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(1): 85 - 88.

Wallis, R.L. 1948. Time of planting potatoes as a factor in prevention of potato psyllid attack. *Journal of Economic Entomology* 41 (1): 4-5