

Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa

Claudia María Melgoza Villagómez¹

Claudia del Rosario León Sicaños¹

José Ángel López Valenzuela¹

Luis Alberto Hernández Espinal²

Sixto Velarde Félix³

José Antonio Garzón Tiznado^{1§}

¹Universidad Autónoma de Sinaloa-Doctorado en Biotecnología Programa Regional del Noroeste de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Av. Las Américas y Josefa Ortiz, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80030. ²Universidad Autónoma de Sinaloa-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. San Ángel núm. 3886, Fraccionamiento San Benito, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80260. ³Campo Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, Culiacán. Sinaloa, México. CP 80000.

§Autor para correspondencia: garzon24@hormail.com.

Resumen

El “permanente del tomate”, “manchado del tubérculo” o “zebra chip” en papa y “brotes cloróticos” del chile, son tres enfermedades descritas en México con signos coincidentes de aborto de flor, oscurecimiento de tejido vascular en la base del tallo y raíz de las plantas. Se ha mencionado la asociación entre estas enfermedades y la bacteria emergente *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLs) así como al psílido *Bactericera cockerelli* como su vector. Estas enfermedades, que en inicio se localizaban en tres estados de México se han diseminado a las principales regiones productoras de solanáceas, tanto en condiciones de campo como en invernadero. El objetivo del estudio fue conocer la presencia de CLs asociado a enfermedades que afectan los cultivos de tomate, para y chile en México. La bacteria se identificó por PCR del gen 16S de ADNr, clonación y secuenciación. La alineación de secuencias nucleotídicas se realizó con el método Clustal W y el árbol filogenético se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining a partir de distancias calculadas con el método de Tajima-Nei y un índice de Felsenstein de 1 000 réplicas, utilizando el software MEGA versión 5.05. En total se analizaron 167 muestras, de las cuales 86 resultaron positivas, provenientes de 14 estados de México. Se obtuvieron cinco secuencias nucleotídicas de Guanajuato, San Luis Potosí y Sinaloa correspondientes al tomate, papa y chile, adultos y huevecillos de *B. cockerelli*. El análisis de las secuencias mostró una identidad de 99.4% al compararse entre estas y hasta 99.8% con accesiones del GenBank descritas para CLs en EUA, Nueva Zelanda y Canadá.

Palabras clave: brotes cloróticos, permanente del tomate, zebra chip.

Recibido: marzo de 2018

Aceptado: mayo de 2018

Introducción

En México se presentan tres enfermedades que han originado cambios importantes en el programa de cultivos en la geografía del país. La enfermedad “permanente del tomate” (PT) fue descrita por primera vez en la región del Bajío en Guanajuato causando daños a la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) estimados en 45%, posteriormente, en el sur de los estados de Coahuila y Nuevo León se mencionó una nueva enfermedad en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) nombrada “Zebra chip” (ZC) causando daños de 90% (Munyanza *et al.*, 2009b) y en Chile una nueva enfermedad descrita como “brotes cloróticos” (BC) (Munyanza *et al.*, 2009c).

Los síntomas del PT se caracterizan por un enrollamiento de las hojas inferiores en forma de “taco”, estas hojas son quebradizas, los folíolos apicales se ven cloróticos con los márgenes de color morado, las flores son abortadas; sin embargo, se llega a presentar una sobre brotación de yemas que forman tallos delgados que florecen y llegan a producción de frutos pequeños. En general las plantas son achaparradas con hojas amarillas y el tejido vascular en la raíz presenta color café oscuro (Garzón-Tiznado *et al.*, 2009). En el caso de papa, los síntomas del ZC se caracterizan por brotes de color morado a clorótico, tallos axilares abultados y oscurecimiento radial del tubérculo, el cual pierde calidad de freído y su cocción es desuniforme, estas papas son de sabor un poco dulce, con lo que pierden su calidad comercial.

Finalmente, en Chile tipo “bell” los síntomas de BC son acortamiento de entrenudos y plantas pequeñas (Munyanza *et al.*, 2009c). Resultados de investigaciones iniciales sugerían que estas enfermedades eran causadas por un mismo patógeno, ya que al injertar plantas de tomate enfermas con PT en plantas de papa sanas mostraron síntomas de “punta morada”. Posteriormente se mencionó que los síntomas en tomate (Garzón-Tiznado *et al.*, 2009) y papa fueron reproducidos por el psílido *B. cockerelli*.

En un principio, las enfermedades del PT y ZC fueron asociados a fitoplasmas; sin embargo, al analizar la secuencia de ADN de la región 16S-23S amplificada con los pares de iniciadores directo P1/Tint y P1/P7 y anidado R16mF2/r16r2 descritos para fitoplasmas (Gundersen y Lee, 1996), presentaron una identidad de 80 a 83% al compararse con secuencias descritas para fitoplasmas. Por el contrario, estas secuencias revelaron mayor asociación con una bacteria no cultivable transmitida por *B. cockerelli* (Garzón-Tiznado *et al.*, 2009) que posteriormente fue descrita con 100% de identidad con la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* en tomate (Munyanza *et al.*, 2009a) y en el cultivo de Chile (Munyanza *et al.*, 2009c) en el Valle de la Cruz de Elota, Sinaloa.

No obstante, que el PT se detectó a principios de los años 80's y posteriormente el manchado del tubérculo en papa (Almeyda *et al.*, 2008), signos característicos de estas enfermedades se han observado en plantaciones de tomate, Chile y papa, en las principales regiones productoras de México, por lo que se consideró importante obtener información sobre la presencia de estas enfermedades en México y su relación con la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Materiales y métodos

Inóculo de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Bajo condiciones de invernadero comercial y de campo abierto, se colectó tejido foliar de plantas de tomate que presentaron síntomas de “PT”, así como de papa con síntomas de “ZC” y de chile con “BC”, se colectaron además huevecillos, ninfas y adultos de *B. cockerelli* que colonizaban plantas de tomate con PT. Las muestras de plantas se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a -20 °C. Los adultos del psílido se recolectaron con succionador entomológico y los huevecillos y ninfas fueron removidos de los folíolos con pincel de “pelo de camello” y colocados en tubos de 1.5 mL en etanol al 75%, lavados con agua destilada estéril y almacenados a -20 °C.

Extracción de ADN. La extracción de ácidos nucleicos de plantas e insectos, huevecillos y ninfas de *B. cockerelli* se realizó con la metodología descrita por Doyle y Doyle (1990) modificada. Se maceraron 500 mg de tejido foliar en mortero con 2 mL de solución de extracción (Tris-HCl 100 mM pH7, CTAB 2%, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M y 0.2% de β -mercaptoetanol). En las extracciones de ADN de los estadios de *B. cockerelli* se maceraron 100 mg de muestra con 200 μ L de solución de extracción. Los extractos fueron incubados a 65 °C durante 30 min. Después se agregó acetato de amonio a una concentración final de 0.5 M y se incubó en hielo por 10 min, se adicionó un volumen de solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1 v/v/v) y se agitó en vórtex, se centrifugó a 13.4 x g por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se dejó precipitar el ADN por 1 h a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 13.4 x g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó en 500 μ L de etanol al 70%, se dejó secar y se suspendió en 50 μ L (muestras de plantas) y 20 μ L (muestras de estadios de *B. cockerelli*) de agua destilada estéril. El ADN extraído se almacenó a 4 °C.

Detección de CLs por PCR. Para la detección de CLs se empleó el par de iniciadores OA2/OI2c los cuales amplifican un fragmento de 1 168 pb del gen 16S de ADNr (Munyaneza *et al.*, 2009), en un volumen de reacción de 25 μ L que contenía 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de DNTPs, 0.25 μ M de cada oligonucleótido, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 50 ng de ADN. La reacción fue realizada en un termociclador C1000TM Thermal Cycler BIO-RAD, con pre desnaturalización de 2 min a 94 °C seguida de 35 ciclos a tres temperaturas: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min; con un período final de 10 min a 72 °C. Los amplicones se analizaron en geles de agarosa al 1.2% teñidos con gel red (BIOTIUM) y observados en luz UV.

Clonación del ADN y secuenciación. Los productos amplificados por PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando mini columnas comerciales (PureLinkTM) y clonados en el vector pCR 4-TOPO siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen). La extracción del ADN plasmídico se realizó con el método descrito por Birnboim y Doly (1979). Las bacterias transformadas se confirmaron por bioensayos de restricción con la enzima *Eco*RI siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen). La secuenciación fue realizada en el LANGEBIO, CINVESTAV-IPN-IRAPUATO en un secuenciador 3730 XL ADN (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las muestras fueron preparadas usando el kit de secuenciación BigDye Terminador v3.1 (Applied Biosystems). La identidad del ADN se realizó comparando las secuencias obtenidas en este estudio con las reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (Altschul *et al.*, 1990).

Análisis filogenético. Las alineaciones de las secuencias nucleotídicas de CLs se realizaron con el método Clustal W y el árbol filogenético se construyó con el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) a partir de distancias calculadas con el modelo de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 1984) y un bootstrap de 1 000 réplicas (Felsenstein, 1985). Todos los análisis se realizaron con el programa MEGA versión 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

Resultados y discusión

Detección de CLs por PCR. En 167 muestras colectadas en 14 estados de la República Mexicana georreferenciados se amplificaron 86 muestras con un tamaño predicho para CLs de 1 168 pb. En muestras de tomate la detección de CLs fue de 62%, en papa 40.3%, 33% en el cultivo del chile, así como de 100% en adultos, huevecillos y ninfas de *B. cockerelli* colectados en plantas de tomate enfermas (Cuadro 1). En los tres cultivos, el síntoma común se caracterizó por aborto de flor y oscurecimiento color café en la base del tallo y raíz de la planta coincidiendo con los síntomas descritos previamente (Garzón-Tiznado *et al.*, 2009; Munyaneza *et al.*, 2009c).

Cuadro 1. Localización de muestras de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) analizadas por PCR, para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en México.

Estado	Coordenadas	CLs positivas				
		<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>C. annuum</i>	<i>B. cockerelli</i> *	<i>B. cockerelli</i> **
Aguascalientes	22°05'13.00" N 102°42'25.30" O	3/5	1/5	1/1	1/1	-
Baja California	30°25'54.81" N 115°52'55.81" O	1/10	-	-	-	-
Chihuahua	28°19'1.85" N 106°56'69.00" O	-	1/4	-	-	-
Coahuila	25°19'20.76" N 100°39'56.44" O	-	7/10	-	-	-
Estado de México	19°05'42.46" N 99°34'23.15" O	-	4/8	-	-	-
Guanajuato	20°39'48.17" N 100°45'43.62" O	8/8	-	1/5	4/4	1/1
Guanajuato	21°3'11.66" N 101°42'1.28" O	-	4/8	-	-	-
Jalisco	19°52'35.81" N 103°44'32.83" O	-	1/5	-	-	-
Jalisco	19°45'12.16" N 103°45'36.08" O	5/5	-	-	-	-
Michoacán	19°48'44.88" N 102°22'25.09" O	-	1/5	-	-	-
Michoacán	20°19'23.52" N 102°18'19.23" O	1/2	-	-	-	-
Nayarit	21°45'59.54" N 105°13'58.27" O	1/5	-	-	-	-
Nayarit	21°42'21.61" N 105°16'41.75" O	-	-	0/2	-	-
Nuevo León	24°34'24.14" N 100°16'34.27" O	-	4/7	-	-	-

Estado	Coordenadas	CLs positivas				
		<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>C. annuum</i>	<i>B. cockerelli</i> *	<i>B. cockerelli</i> **
San Luis Potosí	22°39'56.30" N 100°53'38.50" O	5/5	-	1/1	-	-
Sinaloa	23°57'11.73" N 106°52'18.99" O	6/6	-	5/5	3/3	3/3
Sinaloa	23°54'57.68" N 106°53'3.91" O	-	3/5	-	-	-
Sonora	27°21'40.59" N 110°14'30.93" O	-	2/2	-	-	-
Sonora	26°51'51.40" N 109°32'0.10" O	1/1	-	-	-	-
Zacatecas	23°1'28.37" N 100°39'56.44" O	5/11	1/13	0/10	1/1	-
Total		36/58 (62%)	29/72 (40.27%)	8/24 (33.33%)	9/9 (100%)	4/4 (100%)

*= adultos; **= huevecillos.

En el cultivo del tomate se detectó la mayor frecuencia del patógeno; los síntomas de hojas quebradizas, folíolos apicales cloróticos con los márgenes de color morado, además del oscurecimiento de raíz y aborto de flores, permitieron durante el desarrollo del cultivo la selección de plantas en donde se confirmó la presencia del patógeno (Figura 1).

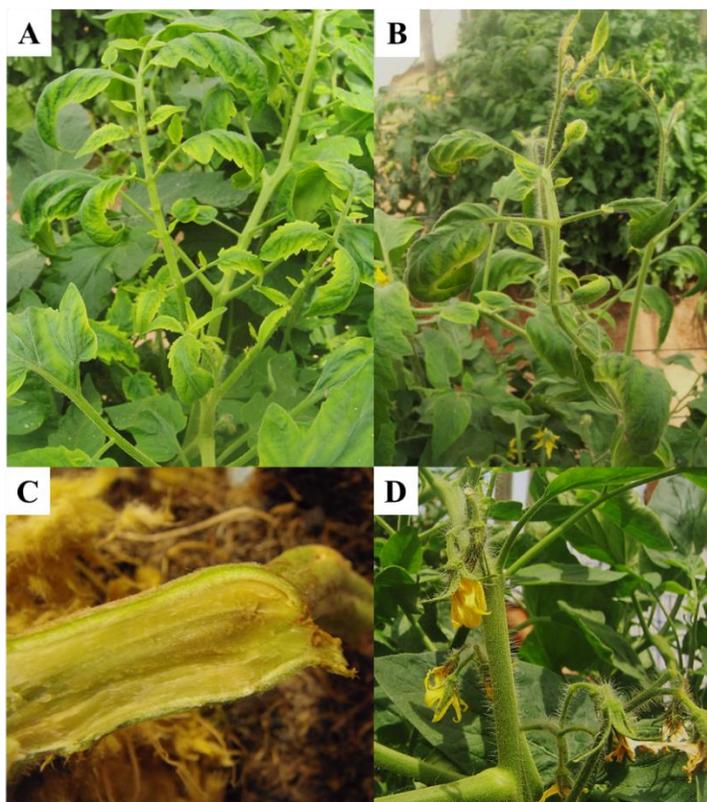


Figura 1. Síntomas asociados con CLs en plantas de tomate con PT. A) folíolos apicales cloróticos y epinastía; B) sobre brotación de yemas y folíolos cloróticos con márgenes de color morado; C) color café en tejido vascular de la raíz; D) aborto de flor.

En el cultivo de la papa con una frecuencia menor, el síndrome de punta morada ha sido descrito de naturaleza compleja y además puede ser inducido por otros patógenos diferentes a CLs (Garzón-Tiznado *et al.*, 2008); no obstante, la presencia del patógeno está asociada, además, al síntoma de necrosis del tallo y zebra chip, el cual se presenta a partir de la etapa intermedia del desarrollo del cultivo, lo que dificultó la detección del mismo en muestreos tempranos. En el cultivo del chile en muestreos realizados en los estados de Nayarit y Zacatecas, no se detectó la presencia de CLs, en coincidencia con la ausencia de síntomas de brotes cloróticos en las plantas muestreadas al azar en genotipos de tipo “ancho” o “serrano”; sin embargo, en los tipos “bell” o “habanero” de muestras colectadas en Guanajuato, Sinaloa y Aguascalientes, se observaron los síntomas descritos previamente y los resultados para la detección de CLs fueron positivos.

Lo anterior, hace suponer que los síntomas pueden ser una herramienta de primera mano para el apoyo de los técnicos en el campo, aunque la confirmación y certeza de la identidad de la bacteria solo puede realizarse en laboratorio. Además, se identificó a CLs en muestras de adultos, huevecillos y ninfas de *B. cockerelli* que hospedaban plantas de tomate con síntomas del PT y que fueron positivas para CLs (Figura 2A). La presencia de CLs se detectó en los estados productores de papa y tomate en México (Cuadro 1). En Sinaloa, Sonora, Nayarit y Jalisco con prevalencia de clima tropical y siembras en invierno, los daños causados por este patógeno aún no han sido tan críticos como en los otros estados, en donde predomina el clima templado y siembras en verano.

La enfermedad de permanente del tomate es una enfermedad descrita a principios de los años 80s en el estado de Guanajuato, a partir de ahí se ha observado su diseminación hacia otras regiones del país. Actualmente, las características morfológicas de esta enfermedad se han registrado en las principales regiones productoras de papa en México y en aquellas donde se combina simultáneamente con el cultivo de tomate. Características morfológicas similares también se han descrito en países como Estados Unidos de América (French-Monar *et al.*, 2010) y Nueva Zelanda (Liefing *et al.*, 2009).

Clonación del ADN y secuenciación. Amplicones obtenidos del ADN extraído de adultos y huevecillos de *B. cockerelli*, así como de tomate, papa y chile clonados en el vector pCR 4-TOPO, se confirmaron por restricción parcial con la enzima *EcoRI*, la cual permitió la liberación de dos fragmentos de ADN que sumados corresponden aproximadamente al tamaño del amplicón, lo que indicó la presencia de un sitio *EcoRI* intermedio (Figura 2B; datos mostrados para psílicos de *B. cockerelli*), el cual fue confirmado por secuenciación. Las secuencias obtenidas en este estudio se registraron en GenBank con los números KF776420 y KF776421 para CLs de adultos y huevecillos de *B. cockerelli* respectivamente, KF776422 para CLs en tomate con síntomas de PT, KF776423 para CLs en papa con síntomas de ZC y KF776424 y para CLs en chile con síntomas de BC.

Análisis de las secuencias del gen 16S de CLs. Tanto en las secuencias reportadas en este estudio, como las registradas en el GenBank utilizadas en los análisis mostraron un sitio *EcoRI* de la posición 616 a 621 mismo que se observó en el patrón de restricción del plásmido recombinante con *EcoRI* (Figura 2B). Para ubicar la posición de las mutaciones y los sitios *EcoRI* se utilizó como referencia la secuencia del gen completo 16S de rRNA de 1507 pb del genoma de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (NC_014774).

Cuadro 2. Comparación del porcentaje de identidad entre secuencias de tomate (*S. lycopersicon* L.), papa (*S. tuberosum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y *Bactericera cockerelli* Sulc, reportadas en este estudio con secuencias descritas en el GenBank de especies de *Ca. Liberibacter* y *Ca. Phytoplasma*.

GenBank	Hospedero	% Identidad	Patógeno	Hospedero	GenBank (Otros estudios)
KF776422	<i>S. lycopersicum</i>	99.8	<i>Ca. Liberibacter</i>	<i>S. lycopersicum</i>	FJ829812, FJ829811,
KF776423	<i>S. tuberosum</i>		<i>solanacearum</i>	<i>S. tuberosum</i>	FJ498806, NC.014774,
KF776424	<i>C. annuum</i>			<i>C. annuum</i>	GQ468843, JF811596,
KF776421	<i>B. cockerelli</i>				JF811597, FJ939136,
	(Huevecillos)				FJ939137, FJ957897,
KF776420	<i>B. cockerelli</i>				EU834130, EU918197, FJ957896
		98.5	<i>Ca. Liberibacter</i>	<i>Trioza erytraeae</i>	L22533
			<i>africanus</i>	<i>Citrus</i> sp	EU921620
		98.4	<i>Ca. Liberibacter</i>	<i>Diaphorina citri</i>	GQ502291, JX430434
			<i>asiaticus</i>	<i>Citrus</i> sp	AB480089, DQ302750, DQ71900
		97.7	<i>Ca. Liberibacter</i>	<i>Diaphorina citri</i>	AY742824
			<i>americanus</i>		
		97.2	<i>Ca. Liberibacter</i>	<i>Cacopsylla pyri</i>	FN678792, JX244258
			<i>europaeus</i>		
		93.1	<i>Ca. Phytoplasma</i>	<i>S. lycopersicum</i>	JX311953, L33760, AY180955

La elevada identidad entre las secuencias correspondientes a huevecillos y adultos de *B. cockerelli*, de tejido enfermo de tomate, papa y chile en este estudio, nos permite confirmar a *B. cockerelli* como transmisor de CLs, previamente descrito como “bacteria no cultivable” (Garzón-Tiznado *et al.*, 2009), asociado a las enfermedades PT, ZC y BC, lo que evidencia la importancia epidemiológica de la relación entre estos organismos, y CLs colocando a éste patógeno como responsable de grandes pérdidas económicas registradas en cultivos como papa y tomate en México (Garzón-Tiznado *et al.*, 1992; Garzón-Tiznado *et al.*, 2009; Munyaneza *et al.*, 2009). Además, la identificación de CLs en huevecillos de *B. cockerelli* respalda la hipótesis de la transmisión vertical o transovárica de este patógeno.

Análisis filogenético. En la Figura 3, se observa la filogenia correspondiente a las secuencias de tomate, papa, chile, adultos y huevecillos de *B. cockerelli*, las secuencias analizadas en este estudio forman parte del grupo de secuencias de *Ca. Liberibacter*, especie *solanacearum* con 99% de reproducibilidad con base en el índice de Felsestein de 1000 réplicas y separado de otras especies de *Ca. Liberibacter* y *Ca. Phytoplasma*.

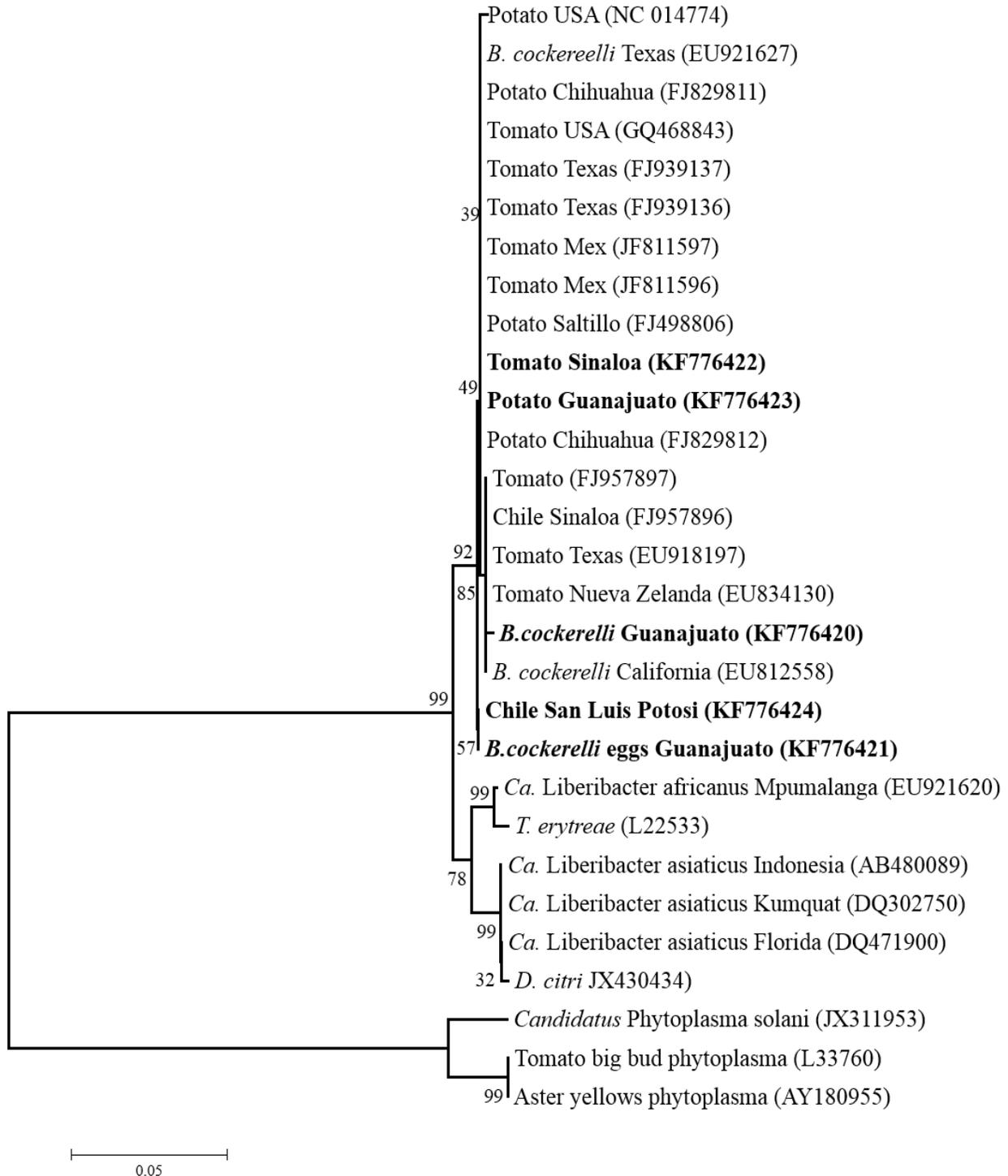


Figura 3. Filograma basado en la comparación de secuencias del gen 16S de especies de *Candidatus Liberibacter* y *Ca. Phytoplasma*. El árbol filogenético se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining a partir de distancias calculadas con el método de Tajima-Nei analizando un total de 992 posiciones. En negritas se identifican las secuencias de CLs obtenidas en este estudio.

Conclusiones

La presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* fue detectada en los 14 estados muestreados de la República Mexicana en muestras de ADN extraído de tejido de tomate, chile y papa, huevecillos, ninfas y adultos de *Bactericera cockerelli*.

La presencia de la bacteria se detectó con mayor frecuencia en plantas de tomate (62%), seguido por papa (40.27%) y en menor porcentaje en plantas de chile (33.33%).

Los análisis filogenéticos indican la relación entre las enfermedades de “permanente del tomate” (PT), “zebra chip” (ZC) en papa, y “brotes cloróticos” (BC) en chile con la bacteria no cultivable *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

La presencia de CLs en muestras de huevecillos de *B. cockerelli* sugiere que la transmisión de la bacteria es transovárica.

Literatura citada

- Almeyda, I. H.; Sánchez, J. A and Garzón-Tiznado J. A. 2008. Vectors causal of potato purple top in Coahuila and Nuevo León, México. *Agric. Téc. Méx.* 34(2):141-150.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-1523.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- French-Monar, R. D.; Patton III, A. F. and Douglas J. M. 2010. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on field tomatoes in the United States. *Plant Pathol.* 94(4):481.
- Garzón, J. A.; Becerra, F. A.; Marín, A.; Mejía, A. C. y Byerly, K. F. 1992. Manejo integrado de la enfermedad “permanente del tomate” (*Lycopersiconly copersicum* Karst ex FawllMill.), en el Bajío. *In: afidos como vectores de virus en México.* Urías, C.; Rodríguez, R. y Alejandre, T. (Ed.). Colegio de Postgraduados, Centro de Fitopatología. México. 116-129 pp.
- Garzón, J. A.; Bujanos, M. R.; Velarde, F. S.; Parga, V.; Avilés, M. C.; Almeida, I. H.; Sánchez, A.; Martínez, J. L. y Garzón, C. J. A. 2008. *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* Sulc, vector de fitoplasmas en México. Ediciones Parnaso, España. *In: detección, diagnóstico y manejo de la enfermedad punta morada de la papa.* 135 p.
- Garzón, J. A.; Cárdenas, O. G.; Bujanos, R.; Marín, A.; Becerra, A.; Velarde, S.; Reyes, C.; González, M. y Martínez, J. L. 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad “permanente del tomate” en México. *Agric. Téc. Méx.* 35(1):61-72.
- Gundersen, D. E. and Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterranean.* 35(3):144-151.

- Liefting, L. W.; Sutherland, P. W.; Ward, L. I.; Paice, K. L.; Weir, B. S. and Clover, R. G. 2009. A new "*Candidatus Liberibacter*" species associated whit diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 93(3):208-214.
- Liefting, L. W.; Weir, B. S.; Pennycook, S. R. and Clover, R. G. 2009. "*Candidatus Liberibacter solanacearum*", a *Liberibacter* associated with plants in the family *Solanaceae*. *Inter. J. Systematic Evol. Microbiol.* 59:2274-2276.
- Liefting, L. W.; Pérez, Z. C.; Clover, R. G. and Anderson, A. D. 2008. A new "*Candidatus Liberibacter*" species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92:1474-1480.
- Munyaneza, J. E.; Mustafa, T.; Fisher, T. W.; Sengoda, V. G. and Horton, D. R. 2016. Assessing the likelihood of transmission of *Candidatus Liberibacter solanacearum* to carrot by potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *PLoS One.* Doi: 10.1371/journal.pone.0161016.
- Munyaneza, J. E.; Sengoda, V.G.; Crosslin, J. M.; Garzón, J. A. and Cárdenas, O. G. 2009c. First report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in pepper plants in México. *Plant Dis.* Doi:10.1094/PDIS-93-10-1076B.
- Munyaneza, J. E.; Sengoda, V. G.; Crosslin, J. M.; De la Rosa, G. and Sánchez, A. 2009b. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" in potato tubers with zebra chip disease in Mexico. *Plant Dis.* Doi:10.1094/PDIS-93-5-0552A.
- Munyaneza, J. E.; Sengoda, V. G.; Crosslin, J. M.; Garzón, J. A. and Cárdenas, O. G. 2009a. First report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in tomato plants in México. *Plant Dis.* Doi:10.1094/PDIS-93-10-1076A.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Tajima, F. and Nei, M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1:269-285.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- Warrick, W. R.; Fisher, T. W. and Munyaneza, J. E. 2011. Haplotypes of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" suggest long-standing separation. *Eur. J. Plant Pathol.* 130:5-12.