

## ASOCIACIÓN DE HEMIPTERA: TRIOZIDAE CON LA ENFERMEDAD 'PERMANENTE DEL TOMATE' EN MÉXICO\*

### ASSOCIATION OF HEMIPTERA: TRIOZIDAE WITH THE DISEASE 'PERMANENTE DEL TOMATE' IN MEXICO

José Antonio Garzón-Tiznado<sup>3§</sup>, Oralia Guadalupe Cárdenas-Valenzuela<sup>3</sup>, Rafael Bujanos-Muñiz<sup>2</sup>, Antonio Marín-Jarillo<sup>2</sup>, Alicia Becerra-Flora<sup>6</sup>, Sixto Velarde-Felix<sup>1</sup>, Cuauhtémoc Reyes-Moreno<sup>3</sup>, Mario González-Chavira<sup>4</sup> y José Luis Martínez-Carrillo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología del Noroeste, Campo Experimental Valle de Culiacán, INIFAP, carretera Culiacán-El Dorado, km 16.5, Culiacán, Sinaloa, México. Tel. 01 667 8461013, (sixjas@hotmail.com). <sup>2</sup>Laboratorio de Taxonomía de Insectos, Campo Experimental del Bajío, INIFAP, carretera Celaya-San Miguel Allende, km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. Tel. 01 461 016115323, (bujanos@att.net.mx.), (antma@lycos.com). <sup>3</sup>Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma de Sinaloa. Tel. 01 667 7157641, (ocardenas@uas.uasnet.mx). <sup>4</sup>Unidad de Biotecnología del Bajío, Campo Experimental del Bajío, INIFAP, Celaya, Guanajuato, México. Tel. 01 461 6115323, (gonzalez.mario@inifap.gob.mx). <sup>5</sup>Programa Nacional de Protección Vegetal, Campo Experimental Valle del Yaqui, INIFAP, Ciudad Obregón, Sonora, México. Tel. 01 644 4143173, (jlmarca@hotmail.com). <sup>6</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Carretera a la Presa. Tel. 01 444 8342000, (abecerra@ipicyt.edu.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: garzon24@hotmail.com.

## RESUMEN

La enfermedad conocida como permanente del tomate causa grandes daños en regiones donde el tomate se siembra en el ciclo primavera-verano. La etiología de la enfermedad se ha relacionado con organismos tipo bacteria y su transmisión con el psílido *Bactericera* (= *Paratrioza*) *cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). El objetivo de esta investigación fue elucidar la asociación entre el psílido y la enfermedad. La obtención de la fuente de inóculo y los bioensayos de transmisión se realizaron en jaulas entomológicas bajo condiciones de invernadero. La transmisión planta de tomate a planta de tomate fue por injerto a partir de plantas que mostraban los síntomas característicos en campo. El tejido de plantas enfermas y del psílido fueron analizados por PCR, hibridación y secuenciación de productos de PCR clonados. Los resultados mostraron la reproducción de los síntomas de la enfermedad en las plantas de tomate injertadas y en las expuestas a *B. cockerelli*. Los bioensayos de transmisión del patógeno por el insecto fueron positivos, los períodos de adquisición fueron: 15 min, 2, 3 y 48 h para

ninfas y 30 min, 2, 3, 8 y 48 h para adultos, con períodos de transmisión de 15 min, 2 y 24 h para el caso de adultos y 24 h de incubación. El producto de PCR de *B. cockerelli* fue clonado y secuenciado parcialmente e ingresado al gene bank con el número de accesión DQ355020, esta secuencia presentó una similaridad de 99% con las accesiones DQ355018 y DQ355019 obtenidas de plantas de tomate con permanente del tomate, lo cual evidencia la asociación entre el insecto y la enfermedad.

**Palabra clave:** *Bactericera* (= *Paratrioza*) *cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae), enfermedad permanente del tomate, psílido.

## ABSTRACT

The disease known as 'permanent del tomate' produces the greatest damage in those regions where tomato

plantings are established in the spring-summer season. The etiology of this disease has been related to non-cultured type bacteria and its transmission with the psillid *Bactericera* (=Paratrioza) *cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). The objective of this research was to discern the association between the psillid and the disease. The obtention of inoculum and the bioassays for transmission were performed in entomological cages under greenhouse conditions. Transmission from tomato plant to tomato plant was performed through grafting from plants that showed the characteristic symptoms of the disease in the field. Tissue from diseased plants and from the psillid was analyzed by PCR, hybridization and sequenciation of cloned products. The reproduction of the disease symptoms was observed in tomato plants grafted and in plants exposed to *B. cockerelli*. Bioassays of transmission of this pathogen by the insect were positive, and the acquisition periods were: 15 min, 2, 3 and 48 h for nymphs and 30 min, 2, 3, 8 and 48 h for adults, with transmission periods of 15 min, 2 and 24 h for adults and 24 h of incubation. The product of PCR of *B. cockerelli* was cloned and partially sequenced and registered in the gene bank with the number DQ355020, this sequence presented 99% similarity with accessions DQ355018 and DQ355019 obtained from diseased tomato plants with permanente del tomate, which confirms the association between the insect and the disease.

**Key words:** *Bactericera* (=Paratrioza) *cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae), disease permanente del tomate, psillid.

## INTRODUCCIÓN

En la región de El Bajío, México, se reportó por primera vez la enfermedad denominada permanente del tomate (PT) (Garzón-Tiznado, 1984). Es la enfermedad más dañina en las siembras de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del ciclo primavera-verano.

La etiología de esta enfermedad no es muy clara, ya que observaciones al microscopio electrónico, describen la presencia de cuerpos pleomórficos en el floema de plantas enfermas; sin embargo, el análisis de alineamiento de secuencias de los productos amplificados del gen 16S rRNA, de estas plantas, presentó sólo 80% de similaridad con fitoplasmas, lo cual no es un elemento para indicar su relación con este tipo de patógenos (Ing. Ming Lee, com.

pers.); no obstante, con algunas bacterias no cultivables su similaridad fue mayor al 98%, de ahí que se haya decidido denominarlas temporalmente como “organismo tipo bacteria no cultivable”.

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

En la familia Psylloidea se han mencionado el menor número de especies vectores y dentro de estos, sólo dos géneros, *Cacopsylla* con varias especies y *Bactericera trigonica* (Font *et al.*, 1999). Los del primer género, se han reportado como transmisores de fitoplasmas asociados a enfermedades en árboles frutales, en donde se describen a *Cacopsylla pyri* L. y *C. pyricola* (Forster), transmisores del ‘Pear decline’ phytoplasma (Davies *et al.*, 1992), del grupo 16SrX-C (Kummert y Rufflard, 1997; Lee *et al.*, 1998); *C. melanoneura* (Forster) y *C. costales*; *Cacopsylla picta* transmisores del ‘Apple proliferation’ phytoplasma (Alma *et al.*, 1997; Frisinghelli *et al.*, 2000; Jarausch *et al.*, 2003), grupo 16SrX-A (Lee *et al.*, 1998), y *C. pruni* como transmisor del European ‘stone fruit yellow’ phytoplasma (Carraro *et al.*, 1998), grupo 16SrX-B (Lee *et al.*, 1998) y *Bactericera trigonica* como transmisor de un fitoplasma asociado al grupo del ‘Stolbur’ (Sr16XII) en el cultivo de zanahoria (Font *et al.*, 1999; Weintraub y Beanland, 2006).

Por otro lado, se han descrito dos especies de bacterias no cultivables restringidas al floema, que causan una enfermedad en cítricos descrita como “Huanglongbing”, pertenecientes a la subdivisión  $\alpha$ -Proteobacteria y previamente propuestas como “*Candidatus Liberobacter africanum*” y “*Candidatus*

*Liberobacter asiaticum*”, las cuales son transmitidas por los psílidos *Trioza erytrae* (Del Guercio) y *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hocquellect), respectivamente (Jagoueix *et al.*, 1996).

Sin embargo, en México se ha relacionado a *B. cockerelli* con dos enfermedades contagiosas, permanente del tomate (Garzón-Tiznado, 1984; Becerra-Flora, 1986) y punta morada de la papa (Salas-Marina, 2006) y recientemente, con la enfermedad de la papa denominada zebra chip, en donde la asociación con fitoplasmas no es muy clara (Munyanza *et al.*, 2007); no obstante, se ha mencionado una nueva especie del hunglongbing descrita como “*Candidatus liberibacter psyllauros*” (CLP) infectando tomate y papa y asociada a *B. cockerelli* como vector (Hansen *et al.*, 2008; Liefing *et al.*, 2008). En este artículo se presentan las primeras evidencias de *B. cockerelli* como vector de un organismo tipo bacteria, asociado a la enfermedad permanente del tomate en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Fuente de inóculo.** La fuente de inóculo se obtuvo en invernadero por medio de injerto. Para ello, púas de plantas de tomate que manifestaban los síntomas característicos del PT en campo, fueron injertadas en plantas sanas de tomate en invernadero. Las plantas injertadas se colocaron en cámara húmeda durante 5 días, posteriormente se colocaron en jaulas entomológicas, hasta la manifestación de síntomas.

**Colonia de insectos.** La colonia de *B. cockerelli* se estableció en plantas de chile ancho cv. Criollo San Luis (*Capsicum annuum* L.), ya que los ensayos previos de transmisión del PT por injertos de tomate enfermo-chile sano-tomate sano, fueron negativos. Las plantas de chile fueron sustituidas periódicamente por otras, ya que las altas poblaciones de ninfas causaron la marchites de éstas por su efecto toxínifero en plantas jóvenes. Antes de iniciar los bioensayos de transmisión, se analizó por PCR una muestra de 10 insectos de cada una de las plantas colonizadas.

**Ensayos de transmisión.** Se establecieron tres ensayos de transmisión del agente causal del PT, de planta de tomate a planta de tomate. El primero para determinar la capacidad como vector de *B. cockerelli* (Cuadro 1). En este caso, los insectos se expusieron 24 h para adquisición del patógeno de plantas de tomate enfermas y otras 24 para que efectuaran la inoculación del mismo en plantas sanas. Los siguientes bioensayos se efectuaron para conocer los periodos de adquisición (PDA) (Cuadro 2) y de inoculación (PDI) (Cuadro 3). En todos los casos, previo al bioensayo, se colocaron adultos en cajas petri para someterlos a un período de ayuno por 60 min. Como testigo los insectos fueron colocados directamente en plántulas de tomate sanas (Cuadro 1). Los bioensayos se realizaron en laboratorio y posteriormente, las plántulas se llevaron al invernadero durante 20-40 días hasta la manifestación visual de los síntomas. La confirmación de la transmisión se realizó por comparación del síndrome descrito por Garzón-Tiznado (1984), para injertos en serie, e hibridación tipo dot blot y por PCR, como se explica posteriormente.

**Cuadro 1. Ensayo de transmisión del agente causal de la enfermedad permanente del tomate por *Bactericera cockerelli* Sulc.**

Tratamiento	Adquisición (h)	Inoculación (h)	Adultos planta	Transmisión	(%)
Pruebas individuales	24:00	24	1	*9/48	18.75
Testigo	0:00	24	1	0/11	0.0
Pruebas masales	24:00	24	10	13/46	26.0
Testigo	0.0	24	10	0/11	0.0

\*Numerador= número de plantas con síntomas; denominador= número de plantas probadas.

**Cuadro 2. Ensayos sobre el período de adquisición de *Bactericera cockerelli* Sulc, en la transmisión del agente causal de la enfermedad permanente del tomate.**

Tiempo de adquisición	Ninfas	Adultos
0 min	0/6	0/6
15 min	4/6	0/6
30 min	0/6	2/6
1:00 h	0/6	0/6
2:00 h	2/6	2/6
3:00 h	2/6	1/6
8:00 h	0/6	1/6
24:00 h	0/6	0/6
48:00 h	1/6	1/6

\*Numerador= número de plantas con síntomas; denominador= número de plantas probadas.

**Cuadro 3. Ensayos sobre el período de inoculación por adultos de *Bactericera cockerelli* Sulc, y análisis molecular del ADN, en la transmisión del agente causal de la enfermedad permanente del tomate.**

Período	Transmisión ninfas	Transmisión (%)	Análisis molecular del ADN	
			Hibridación	PCR
0 min	0/5*	0	-	-
15 min	1/5	20	+	+
30 min	0/5	0	-	-
1 h	0/5	0	-	-
2 h	2/5	40	+	+
24 h	2/5	40	+	+

\*Numerador= número de plantas con síntomas; denominador= número de plantas probadas.

**Transmisión por injertos en serie.** A partir de plantas con síntomas del PT, en los ensayos de transmisión vía insectos, se obtuvieron “púas” para realizar la transmisión seriada del patógeno. Las púas se injertaron en plantas

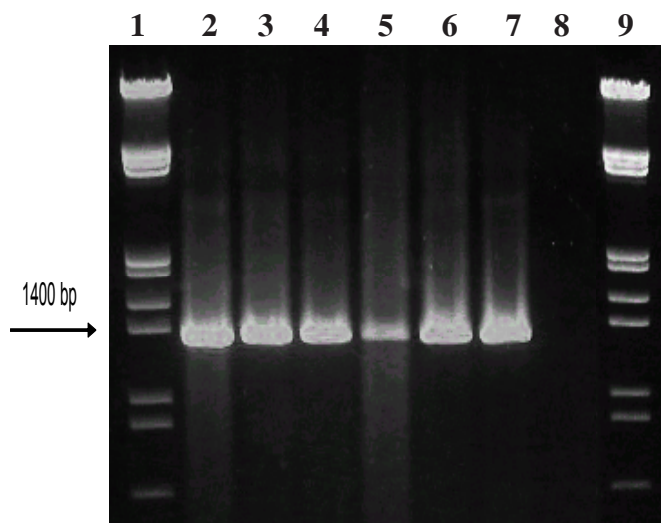
sanas de tomate en dos series sucesivas (Cuadro 4). En cada serie se emplearon cinco plantas sanas de tomate, las cuales fueron colocadas en invernadero para el registro de los síntomas característicos del PT.

**Cuadro 4. Pruebas de transmisión por injertos en serie del agente causal de la enfermedad permanente del tomate.**

Tratamiento	Transmisión	Aparición de síntomas	(%)
Serie I	*5/5	18 a 25 días	100
Serie II	5/5	18 a 25 días	100

\*Numerador= número de plantas con síntomas; denominador= número de plantas probadas.

**Análisis del ADN por PCR.** En el ensayo de transmisión descrito en el Cuadro 3 se analizó por PCR el ADN extraído de plantas de tomate que manifestaron los síntomas del PT y de aquellas que no los manifestaron. En otro experimento, se analizó tejido de una planta de tomate con síntomas del PT, colectada en el municipio de Comonfort, Guanajuato, así como de huevecillos, ninfas y adultos de *B. cockerelli* que colonizaban esta planta. Por otro lado, en Dolores Hidalgo, Guanajuato, fueron colectados adultos en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y otros en una especie silvestre conocida como “jarilla” (Figura 1). La extracción del ADN de tejido vegetal se realizó a partir de la metodología previamente descrita (Dellaporta *et al.*, 1983; Almeida-León, 2001) y la de insectos por el método de Doyle (Doyle y Doyle, 1990). Para el análisis por PCR se empleó el método “anidado” reportado por Gunderson y Lee (1996). Se utilizaron dos pares de iniciadores que amplifican la región correspondiente al gen 16S Rrna y el espacio intergénico 16S-23S.



**Figura 1. Gel de agarosa de productos de PCR anidado.** Carriles 1 y 9, marcadores de tamaño molecular (escalera de 1-Kb); carriles= 2, huevecillos de *B. cockerelli*; 3= ninfas; 4= adultos; 5= planta de tomate con síntomas de PT donde se colectaron los insectos; 6= adultos colectados en planta de chile; 7= adultos colectados en “jarilla”; 8= planta de tomate sana.

En la primera reacción se utilizó el par P1/P7 y para la segunda amplificación o “anidado” el par R16MF2/R16R2, con lo que se genera un fragmento predicho de 1.4 kb aproximadamente. En la mezcla de reacción se

empleó el amortiguador 1X, a base de Tris HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, desoxinucleótidos 0.1 mM (Datp, Dctp, Dgtp, Dttp), iniciadores 5 mM, *Taq* ADN polimeraza 0.6 U y 25 ng de ADN genómico. Se agregó agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 15 mL. Para la segunda reacción se sustituyó el ADN por un mL de la suspensión de la primera reacción de amplificación, el par de iniciadores empleado fue el R16MF2/R16R2, y se llevó a un volumen total de 25 mL con agua libre de nucleasas. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf programado para 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 1 min a 94 °C, alineamiento 2 min a 55 °C, polimerización 3 min a 72 °C, con un precalentamiento a 94 °C durante 1 min y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

**Análisis por hibridación tipo dot blot.** La hibridación tipo dot blot se utilizó en el análisis del ADN extraído del ensayo de PDI (Cuadro 3), para ello, un fragmento de ADN amplificado por PCR correspondiente al ADN de plantas de tomate enfermas colectadas en un invernadero comercial, en Celaya, Guanajuato, fue empleado como sonda en el análisis de hibridación. Este ADN fue aislado y purificado según las especificaciones del proveedor (QUANTUM PREP GEL SLICE, BIO-RAD®).

El ADN amplificado fue marcado con Fluoresceína-Dutp según las recomendaciones (GENE IMAGES RANDOM PRIME LABELLING MODULE, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®). La sonda se almacenó en alícuotas de 10 µL, a -12 °C para su uso en la hibridación molecular. Esta se desarrolló de acuerdo al método descrito por la empresa (GENE IMAGES CDP-STAR DETECTION MODULE, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®).

Para ello, una vez confirmada la presencia del ADN purificado en agarosa, se procedió a desnaturalizar y neutralizarlo para su transferencia a una membrana de Nylon, Hybond-N<sup>+</sup> (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®). El ADN se fijó a la membrana por exposición durante 5 min a luz UV, y se almacenó en refrigeración. Cada membrana fue prehibridada durante 30 min a 60 °C, en una solución SSC 5X, SDS 0.1% (p/v) + líquido de bloqueo 20X y Dextrán sulfato 5%, para de ahí hibridarse en 10 µL la sonda marcada a 60 °C durante

toda la noche y con agitación constante. Terminado el tiempo, se realizaron los lavados en solución SSC 1X/SDS 0.1% a 60 °C/15 min y un segundo lavado en solución de SSC 0.1X/SDS 0.1% bajo las condiciones anteriores. Cada membrana se lavó con Tween 20 (0.3%) y posteriormente se le adicionó el reactivo de detección y se dejó incubando por 5 min, para ser expuesta a una película de rayos X (Hyperfilm, Amersham), durante 15 min.

#### **Clonación y secuenciación del ADN de *B. cockerelli*.**

Un fragmento amplificado de 1.4 Kb a partir del ADN de ninfas de *B. cockerelli* (1194-2), fue clonado empleando el paquete TOPO TA Cloning (Invitrogen Life Technologies) siguiendo la reacción indicada en el protocolo del proveedor y secuenciado según el método 2',triphosphates 3'-dideoxynucleotide (ddNTPs) (Tanne *et al.*, 2001), utilizando el Secuenciador Automático de ADN LI-COR® (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA 68504) modelo 4200 Global Edition IR<sup>2</sup> System. La secuenciación vía PCR del vector PCR<sup>®</sup>4-TOPO® (Invitrogen™ Corp., Carlsbad, CA, USA 92008) con el inserto de interés se realizó mediante iniciadores universales marcados fluorescentemente IRD800 (heptamethine,  $\lambda$  795 nm) e IRD700 (pentamethine carbocyanine,  $\lambda$  685 nm), y los protocolos específicos para Thermo Sequenase® y SequiTherm EXCEL™ II. El proceso de electroforesis y captura de datos de la Secuencias de ADN fue a través del programa e-Seq™ versión 3.0.1 y Gene ImagIR™ Software para Windows y LI-COR® (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA 68504).

#### **Análisis del alineamiento de secuencias (clustal W).**

Las secuencias obtenidas a partir del ADN de *B. cockerelli* en esta investigación (1194-2), las obtenidas de plantas enfermas de tomate, depositadas en el gene bank con los números DQ355019 y DQ355018, así como las secuencias descritas para fitoplasmas: L33760 (tomato big bud mycoplasma-like organism, 16SrVI), AF222064 (tomato big bud phytoplasma-16SrVI), AF494529 (tomato big bud phytoplasma-16SrVI), DQ375328 (tomato little leaf phytoplasma) y DQ370434 (tomato yellows phytoplasma) (Figura 2), fueron alineadas base-a-base con el software *MultAlin* (Multiple Sequence Alignment, <http://www.jouy.inra.fr>) del programa Clustal W (Corpet, 1988). Con el método "Blast 2 sequences" se obtuvieron los porcentajes de identidad entre las secuencias (Tanne, 2001).

## **RESULTADOS**

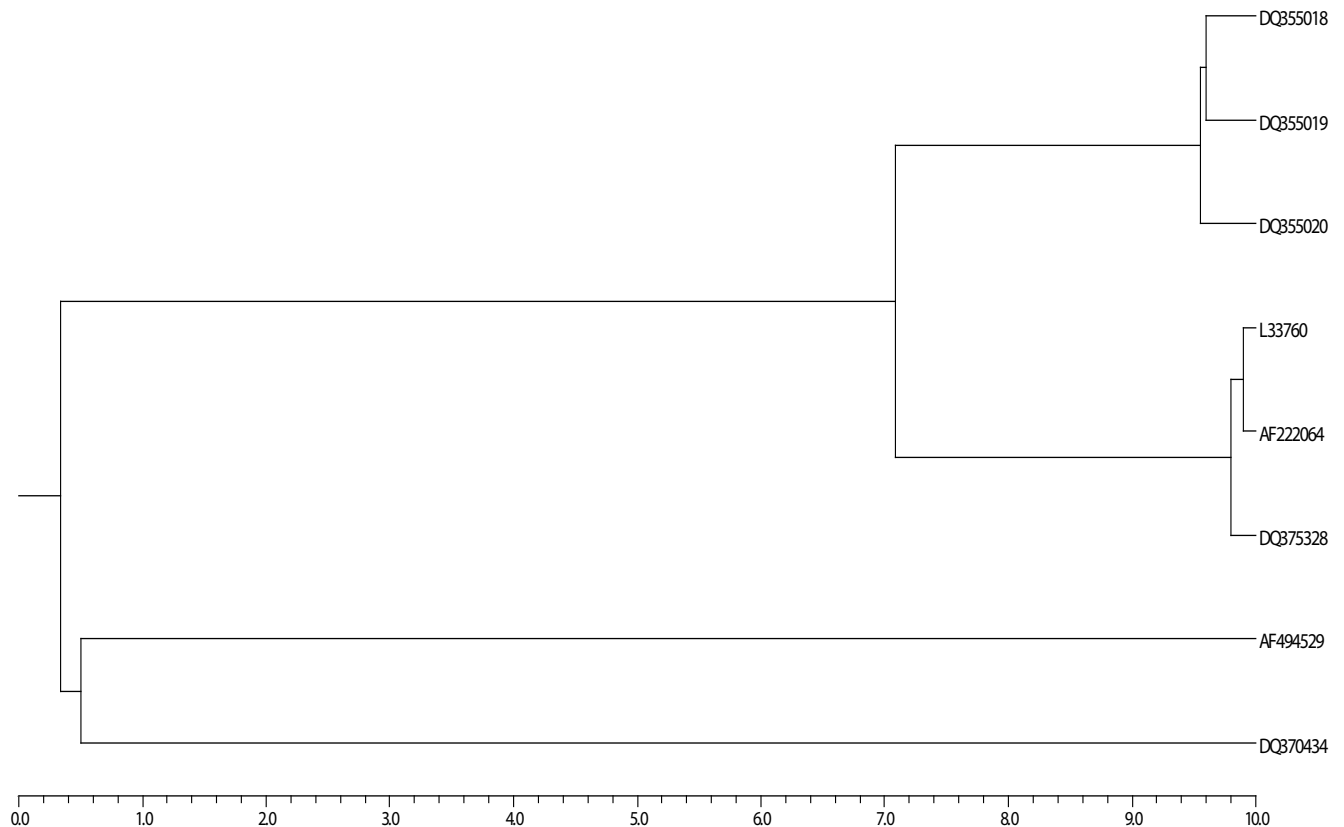
**Colonia de insectos.** El insecto *B. cockerelli* fue identificado de acuerdo a las características morfológicas descritas

previamente (Marín-Jarillo *et al.*, 1995) y las colonias en plantas de chile se desarrollaron en forma satisfactoria; sin embargo, antes del inicio de la floración las plantas se marchitaban y morían, tal vez por el efecto de las toxinas secretadas por las ninfas que se desarrollaban en éstas (Richards y Blood, 1933), por lo cual se sustituyeron en forma frecuente por nuevas plantas. Los ADN's extraídos de ninfas y adultos colectados de estas plantas fueron analizados por PCR y sólo se emplearon insectos de colonias que resultaron negativas.

**Ensayos de transmisión.** En el Cuadro 1 se describen los resultados de transmisión del PT, en donde nueve de 48 plantas manifestaron los síntomas de la enfermedad en el ensayo con un insecto por planta, lo que mostró 18.75% de plantas con síntomas. En el ensayo con 10 insectos por planta, 13 de 46 plantas manifestaron los síntomas de la enfermedad, con lo que se obtuvo 26% de plantas con síntomas. Para el caso de los testigos correspondientes, no se detectaron plantas con síntomas. En todos los casos, los síntomas característicos de la enfermedad se manifestaron entre 25 a 30 días posteriores a la transmisión.

**Transmisión por injertos en serie.** El 100% de las plantas injertadas en forma seriada, a partir de púas obtenidas de plantas de tomate empleadas en la transmisión por insectos, presentaron los síntomas característicos del PT entre los 18 a 25 días posteriores a la realización del injerto (Cuadro 4).

**Período de adquisición.** Se detectaron plantas con síntomas del PT, en los PDA por las ninfas a los 15 min, 2:00, 3:00 y 48:00 h, con cuatro, dos dos y una planta, respectivamente (Cuadro 2), no se detectó transmisión a partir de insectos que permanecieron durante 30 min, y 1:00, 8:00 y 24:00 h, mientras que para los adultos, los síntomas se detectaron en dos, dos, una, una y una planta a partir de los PDA de 30 min, 2:00, 3:00, 8:00 y 48 :00 h, respectivamente, siendo negativos los tiempos de 15 min, 1:00 y 24:00 h (Cuadro 2). La manifestación de síntomas en ambos casos se dio a los los 25 días después del inicio del bioensayo.



**Figura 2.** Árbol de distancias filogenéticas por el alineamiento entre secuencias parciales de las accesiones del gene bank: DQ355020 obtenidas a partir del ADN de *B. cockerelli* en esta investigación, DQ355019 y DQ355018, correspondientes a plantas de tomate con síntomas de PT y las accesiones de fitoplasmas, depositadas previamente con los números, L33760 (tomato big bug mycoplasma-like organism), AF222064 (tomato big bud phytoplasma), AF494529 (tomato big bud phytoplasma), DQ375328 (tomato little leaf phytoplasma) y DQ370434 (tomato yellows phytoplasma).

**Determinación del período de inoculación.** El período de inoculación del agente causal del PT se registró a partir de los 15 min de alimentación del insecto, en donde una de cinco plantas manifestó los síntomas del PT. No se observaron síntomas de los tratamientos entre 30 a 60 min; sin embargo, tratamientos con tiempos mayores de 2:00 y 24:00 h, presentaron dos plantas enfermas en cada caso. La presencia del OTB fue confirmada por el análisis del ADN de las plantas enfermas y sin síntomas, al registrarse la amplificación de un fragmento predicho de 1.4 kb en los tratamientos que presentaron plantas enfermas (Cuadro 3) y adultos del insecto (Figura 1) y por los resultados positivos de la hibridación molecular de esas mismas plantas. No se observaron señales de amplificación ni de hibridación del ADN en los controles negativos (0:0 min) y en plantas que no presentaron síntomas (Cuadro 3).

**Análisis de PCR-anidado de *B. cockerelli*.** Se observó la amplificación del fragmento predicho de 1.4 Kb en ADN extraído de huevecillos, ninfas, adultos y planta de tomate enferma de donde se colectaron los insectos, así como de adultos colectados en plantas de chile y jarilla; dicho fragmento no fue amplificado en ADN extraído de planta de tomate sin síntomas de PT (Figura 1).

**Análisis de alineamiento de secuencias.** En el árbol de distancias filogenéticas entre las secuencias parciales alineadas base-base (Figura 2) de las accesiones correspondientes al PT y *B. cockerelli* y las descritas previamente para fitoplasmas en tomate se observaron: en el primero, una similitud entre 98 - 99% entre las accesiones DQ355020, obtenida del ADN de *B. cockerelli*, DQ355019 y DQ355018, generadas a partir del ADN de plantas de

tomate con síntomas del PT (Cardenas-Valenzuela *et al.*, en proceso); en un segundo grupo, con una similitud de 80% al primero, correspondientes a las accesiones descritas para fitoplasmas, L33760 (tomato big bug mycoplasma-like organism), AF222064 (tomato big bud phytoplasma), DQ375328 (tomato little leaf phytoplasma) con una similitud 99% entre ellas, y un tercer grupo muy distante correspondiente a las accesiones AF494529 (tomato big bud phytoplasma) y DQ370434.

## DISCUSIÓN

La planta de chile (*Capsicum annuum* L.), fue un buen hospedante para el desarrollo de *B. cockerelli*; sin embargo, fue necesario utilizar plantas entre la primera y la segunda flor, ya que las jóvenes en estado de seis hojas, morían después de 20 días de estar colonizadas por ninfas del insecto, lo mismo sucedió con plantas jóvenes de tomate; esta situación puede estar relacionada con el efecto toxínifero de las ninfas, las cuales se ha reportado que llegan a causar la muerte de plantas de papa o tomate (Richards y Blood, 1933).

La fuente de inóculo del PT, se estableció en invernadero por medio de injerto y posteriormente, después del primer ensayo de transmisión con *B. cockerelli* (Cuadro 1), el agente infeccioso fue transmitido en dos series de injerto (Cuadro 4), esto indica que la enfermedad puede establecerse sin necesidad del vector, por lo que deducimos que existe un agente causal del PT, al que temporalmente denominamos “organismo tipo bacteria” (OTB), por la alta identidad entre este agente y las secuencias alineadas con bacterias (98%) y por la baja similitud detectada en alineamientos con fitoplasmas (82%) (Cardenas-Valenzuela *et al.*, en proceso). Los resultados posteriores de transmisión del OTB descritos en los Cuadros 2 y 3, fueron consistentes con el Cuadro 1, al permitir la reproducibilidad de los síntomas del PT en plantas de tomate.

Este tipo de experimentos, tal y como lo describen algunos autores (Lefol *et al.*, 1993; Vega *et al.*, 1993; Vega *et al.*, 1994), son básicos en el proceso de búsqueda del vector de un agente infeccioso. Para esto, inicialmente se emplearon ninfas en 3° y 4° estadio de desarrollo por ser fáciles de manejar y para mejorar la eficiencia en la transmisión del OTB de acuerdo a resultados previos

en este estudio (Cuadro 2); no obstante, se utilizaron adultos para reducir la confusión o “enmascaramiento” de los síntomas de amarillamiento inducidos por las ninfas (Richards y Blood, 1933), con los inducidos por este OTB (Garzón, 1984).

Con los resultados de transmisión por injerto y por el uso de adultos de *B. cockerelli*, descritos en los Cuadros 1, 2, 3 y 4, se presentan los primeros indicios de que la enfermedad permanente del tomate en México, es causada por un agente infeccioso asociado al insecto *B. cockerelli* y elimina la posibilidad de que estos síntomas hayan sido inducidos por la toxina que produce éste insecto. Evidencia adicional se observó con el análisis molecular realizado a partir del ADN extraído del insecto y de tejido de plantas de tomate enfermas, ya que ambos fueron positivos por hibridación tipo dot blot con el uso de un fragmento amplificado de ADN, extraído de plantas de tomate con síntomas del PT, y confirmado posteriormente con la amplificación tipo PCR anidado de este agente en las plantas de tomate con síntomas; en todos los casos el control fue negativo. En lo que respecta al tipo de transmisión, los resultados indicaron que la relación *B. cockerelli*/ PT, tiende a ser persistente, ya que el patógeno logró transmitirse después de 24 h de incubación en el insecto, con PDA entre los 15 a 30 min y PDI entre los 15 a 30 min para ninfas y adultos, respectivamente (Cuadros 2 y 3). Además, se observó que a medida que el período de adquisición fue mayor, se registró un ligero incremento en la eficiencia de transmisión.

Algunos de los resultados anteriores difieren parcialmente con lo mencionado en la literatura, como en el caso de los fitoplasmas en su vector las chicharritas, ya que el ciclo completo “adquisición-incubación-transmisión” de estos ha sido reportado desde unos pocos hasta 80 días (Moya-Raygoza y Nault, 1998; Murrall *et al.*, 1996), tiempo mayor que el requerido por *B. cockerelli*, para transmitir el OTB, cuyo período de latencia en nuestro estudio fue de sólo 24 h y de minutos en adquisición y transmisión; sin embargo, el período de adquisición que va de minutos hasta varias horas en chicharritas (Purcell, 1982), fue similar a lo obtenido en este bioensayo. Asimismo se establece que *B. cockerelli* logró adquirir y transmitir el OTB a partir de plantas de tomate y la transmisión fue directa a tomate, a diferencia de los fitoplasmas transmitidos por chicharritas los cuales tienen que ser adquiridos a partir de especies silvestres antes de ser transmitidos al cultivo (Bosco *et al.*, 1997).



En lo que se refiere a la edad fisiológica de los insectos como vectores, no obstante que se ha mencionado que ésta no influye en su capacidad para transmitir el fitoplasma (Chiyykowski y Sinha, 1998), estudios recientes describen que ninfas recién eclosionadas de *Euscelidius variegatus* fueron menos eficaces en adquirir al CY (amarillamiento del crisantemo) que ninfas del quinto estadio (Palermo *et al.*, 2001), y en ciertos casos las ninfas son más eficientes para adquirir al fitoplasma que los adultos (Nagaich *et al.*, 1974; Murrall, 1996). Este último reporte coincide con los observados en este estudio, en donde las ninfas de *B. cockerelli* requirieron de menor tiempo (15 min) que los adultos (30 min) para adquirir al agente causal del PT y en general el número de plantas que resultaron positivas en el bioensayo fue mayor con el uso de ninfas, con nueve plantas infectadas y siete con adultos (Cuadro 2).

No obstante que pocos agentes fitopatógenos u otros procariotes simbióticos pueden ser transmitidos en forma transovárica por su vector, se consideraba que los fitoplasmas no se podían transmitir de esta manera; sin embargo, algunas investigaciones han reportado este tipo de transmisión para *Hishimonoides sellatiformis*, vector del fitoplasma mulberry dwarf (grupo 16SrI) (Kawakita *et al.*, 2000), y en *Schaphoideus titanus*, transmisor del aster yellow (grupo 16SrI), los cuales se han detectado en huevecillo y ninfas mediante PCR (Alma *et al.*, 1997), lo que sugiere la posible transmisión transovarial de estos patógenos. Estudios recientes han asociado a *B. cockerelli* con síntomas de amarillamiento de hojas en papa y de “zebra chip” (síntomas de manchado del tubérculo) en papa (Munyanesa *et al.*, 2007) y más específicamente, otros asocian a “*Candidatus Liberibacter psyllaourous*” (CLP) con zebra chip en papa, tomate y *B. cockerelli* (Liefing *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2008), coincidiendo con nuestros resultados, estos últimos investigadores, mencionaron que por medio de PCR, lograron detectar a CLP, en huevecillos y ninfas de *B. cockerelli* colonizando plantas de papa y tomate.

Coincidentemente con estos autores, en este estudio, se amplificó un fragmento de 1.4 Kb en el ADN correspondiente a huevecillos de este insecto, hospedando plantas de tomate con síntomas del PT, así como en ninfas y adultos, correspondientes a esta colonia de insectos (Figura 2), lo que representa un indicio más de que *B. cockerelli* puede estar transmitiendo un agente infeccioso en forma transovárica en tomate. No obstante, se ha mencionado que los fitoplasmas en el caso de las chicharritas puede penetrar

intracelularmente a través del epitelio celular del intestino, pasar al intestino medio, de ahí al hemocele e infectar otros tejidos como tubos de Malpighi (Lherminier *et al.*, 1990) y sólo si llegan a los órganos reproductivos (Kawakita *et al.*, 2000), pueden pasar de ahí a los huevecillos. Por lo anterior, la confirmación transovárica se obtendrá cuando se realicen los ensayos biológicos de transmisibilidad a plantas de tomate (Vega *et al.*, 1994).

En lo que respecta a la relación filogenética establecida por el análisis de las secuencias parciales de las accesiones DQ355020, DQ355019 y DQ355018, correspondientes al ADN de ninfas de *B. cockerelli* y plantas de tomate con síntomas del PT, respectivamente, el análisis reveló una identidad de 98 a 99% entre ellas, con lo cual se evidencia la elevada relación genética entre las tres secuencias asociadas a la enfermedad del PT y por otro lado, una relación filogenética muy lejana con fitoplasmas, en el sentido de que el agente causal del PT está más relacionado con un OTB que con un fitoplasma. Por otro lado, en publicaciones recientes, se ha descrito a CLP asociado a *B. cockerelli* (Hansen *et al.*, 2008; Liefing *et al.*, 2008), lo que coincide con nuestros resultados. Sin embargo, aún y cuando existen similitudes en varios aspectos relacionados con la transmisión, como es la detección del agente infeccioso en huevecillos y ninfas de *B. cockerelli* del CLP y OTB (nuestro estudio), así como en el tiempo de expresión de síntomas que va de 3 a 4 semanas, es posible que los síntomas no coincidan exactamente, ya que los descritos para el CLP son un amarillamiento en tomate, mientras que para el OTB asociado al PT son de aborto de flor, hojas quebradizas, de un color verde intenso, aunque finalmente la planta llega a amarillarse y morir.

Los resultados aquí descritos representan la evidencia molecular y biológica de que *B. cockerelli* está asociada a la transmisión del agente causal del PT; dicha transmisión parece ocurrir de manera persistente y se presentan los primeros indicios de que su forma de transmisión es transovárica.

## CONCLUSIONES

El agente causal de la enfermedad PT, se logró transmitir por injerto.

El psílido *B. cockerelli* participa como transmisor del agente causal de la enfermedad permanente del tomate.

La transmisión del agente causal de la enfermedad permanente del tomate, se logró de planta de tomate a otra de tomate.

La adquisición y transmisión del patógeno por *B. cockerelli*, indican que la relación es persistente y posiblemente transovárica.

Se reporta por primera vez a *B. cockerelli* como vector de un organismo tipo bacteria en plantas de tomate.

## LITERATURA CITADA

- Almeida-León, I. H.; Rocha-Peña, M. A.; Piña-Razo, J. and Martínez-Soriano, J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Rev. Mex. de Fitopatol.* 19:1-9.
- Alma, A.; Bosco, D.; Danielli, A.; Bertaccini, A. and Vibio, M. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol. Biol.* 6:115-121.
- Becerra-Flora, A. 1986. Biología de *Paratrioza cockerelli* (Sulc) y su relación con la enfermedad permanente del tomate en el Bajío. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro, México. Facultad de Química. 55 p.
- Bosco, D.; Minucci, C.; Boccardo, G. and Conti, M., 1997. Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomol. Exp. Appl.* 83:219-224.
- Carraro, L.; Osler, R.; Loi, N.; Ermacora, P. and Refati, E., 1999. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *J. Plant Pathol.* 80:233-239.
- Chiykowski, L. N. and Sinha, R. C. 1998. Some factors affecting the transmission of eastern peach X-mycoplasmalike organism by the leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. *Can. J. Plant Pathol.* 10:85-92.
- Davies, D. L.; Guise, C. M.; Clark, M. F. and Adams, A. N. 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol.* 41:195-203.
- Dellaporta, S. L.; Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Font, I.; Abad, P.; Albinana, M.; Espino, A. I. y Dally, E. L. 1999. Amarillos y enrojecimientos en zanahoria: una enfermedad a diagnóstico. *Bol. San. Veg. Plagas* 25:405-415.
- Frisinghelli, C.; Delaiti, L.; Grando, M. S.; Forti D. and Vendimian, M. E. 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *J. Phytopathol.* 148:425-431.
- Garzon-Tiznado, J. A., 1984. Enfermedad del "Permanente" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Guanajuato XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, S. L. P. 1984. Resúmenes, Soc. Mex. Fitopatología 138 p.
- Garzón-Tiznado, J. A.; Garzón-Ceballos, J. A.; Velarde-Felix, S.; Marin-Jarillo, A. y Cardenas-Valenzuela, O. G. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al "permanente del tomate" por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc en México. *Entomología Mexicana* 4:672-675.
- Gundersen, D. E. and Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Medditerr* 35:144-151.
- Hansen, A. K.; Trumble, J. T.; Stouthamer, T. and 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. *Appl. Environ. Microbiol* 74(18):5862-5865.
- Harris, K. F. 1980. Aphids, leafhoppers and planthoppers. Pags, 1-13 *In: Vectors of plant pathogens.* Harris, K. F. and Maramorosch, K. (editors). 1980. Nueva York, Academic Press. 467 p.
- Jensen, D. D.; Griggs, W. H.; Gonzales, C. Q. and Scheneider, H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathol.* 54:1346-1351.
- Jarausch, B.; Schwind, N.; Jarausch, W.; Kresal, G.; Dickler, E. and Seemüller E. 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Dis.* 87:101.

- Jagoueix, S.; Bové, J. M. and Garnier M. 1996. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10:43-50.
- Kaloostian, G. H. and Jones, L. S. 1968. Pear leaf curl virus transmitted by pear psylla. *Plant Dis. Rep.* 52:924-925.
- Kaloostian, G. H. 1980. Psyllids. Pags. 87-91 *In: Vectors of plant pathogens.* Harris, K. F. and Maramorosch, K. (editors). 1980. New York, Academic Press. 467 p.
- Kawakita, H.; Saiki, T.; Wei, W.; Mitsuhashi, W. and Watanabe, K. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasms in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatifformis*. *Phytopathology* 90:909-914.
- Kummert, J. and Rufflard, G. 1997. A preliminary report on the detection of phytoplasms by PCR. *Biochemica* 1:22.
- Lee, I. M.; Gundersen-Rindal, D. E. and Bertaccini, A. 1998. Phytoplasm: Ecology and genomic diversity. *Phytopathol.* 88:1359-1366.
- Lefol, C.; Caudwell, A.; Lherminier. J. and Larue, J. 1993. Attachment of the flavescence dorée pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Ann. Appl. Biol.* 123:611-622.
- Lherminier, J.; Prensier, G.; Boudon-Padieu, E. and Caudwell, A. 1990. Immunolabeling of grapevine flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: light and electron microscopy study. *J. Histochem & Cytochem.* 38:79-86.
- Liefting L. W.; Perez-Egusquiza, Z.C.; Clover, G. R. G. and Anderson, J. A. D. 2008. A New 'Candidatus Liberibacter' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92 (10):1474..
- Marín-Jarillo, A., Garzón-Tiznado, J. A.; Becerra-Flora, A.; Mejia-Avila, C.; Bujanos-Muñiz, R. y Byerly-Murphuy, K. F. 1995. Ciclo biológico y morfología del "salerillo" *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Homoptera-Psillidae), vector de la enfermedad permanente del jitomate en el Bajío. CATIE, Turrialba, Costa Rica. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 38:25-32.
- Moya-Raygoza, G. and Nault, L. R. 1998. Transmission biology of mayze bushy stunt phytoplasm by the corn leafhopper (Homoptera-*Vicadellidae*). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91:668-676.
- Munyanza, J. E.; Crosslin, J. M. and Upton, J. E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip", a new potato disease in southwestern United State and Mexico. *J. Econ. Entomol.* 100 (3) 656-663.
- Murrall, D. J.; Nault, L. R.; Hoy, C. W.; Madden, L. V. and Miller, S. A. 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasm by the aster leafhopper (Homoptera: *Cicadellidae*). *J. Econ. Entomol.* 89:1223-1232.
- Nagaich, B. B.; Puri, B. K.; Sinha, R. C.; Dhingra, M. K. and Bhardwaj V. P. 1974. Mycoplasma like organisms in plants affected with purple top-roll, marginal flavescence and witches broom diseases of potatoes. *Phytopathol. Z.* 81:273-379.
- Palermo, S.; Arzone, A. and Bosco, D. 2001. Vector-pathogen-host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers *Macrosteles quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 99:347-354.
- Pilkington, L.; Gurr, G. M.; Fletcher, M. Y.; Nikandrow, A. and Elliott, E. 2004. Vector status of three leafhopper species for Australian Lucerne yellows phytoplasm. *Aust. J. Entomol.* 43:366-373.
- Purcell, A. H. 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20:397-417.
- Richards, B. L. and Blood, H. L. 1933. Psyllid yellows of the potato. *J. Agr. Res.* 46:189-216.
- Salas-Marina, 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. 49 p.
- Tanne, E.; Boudon-Padieu, E.; Clair, D.; Davidovich, M.; Melamed, S. and Klein M. 2001. Detection of phytoplasm by polimerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Phytopathol.* 91:741-746.

Vega, F. E.; Davis, R. E.; Dally, E. L.; Barbosa, P. and Purcell, A. H. 1994. Use of a biotinylated DNA probe for detection of the aster yellows mycoplasmlike organism in *Dalbulus maidis* and *Macrosteles fascifrons* (Homoptera : *Cicadellidae*). Fla. Entomol. 77:330-334.

Vega, F. E.; Davis, R. E.; Barbosa, P.; Dally, E. L. and Purcell, A. H. 1993. Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. Phytopathol. 83:621-624.

Weintraub, G. P. and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasms. Annu. Rev. Entomol. 51:91-111.