



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLOS

PROGRAMA DE POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE INSECTOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LIMÓN MEXICANO [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] COMO PORTADORES DE *Candidatus Liberibacter asiaticus*

MIREYA PALOMA LÓPEZ SAN JUAN

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLOS, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Mireya Paloma López San Juan, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Cristian Nava Díaz, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Identificación de insectos asociados al cultivo de limón mexicano [Citrus aurantifolia (Christm)Swingle] como portadores de Candidatus Liberibacter asiaticus

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 10 de julio de 2018



Firma del
Alumno (a)

Dr. Cristian Nava Díaz

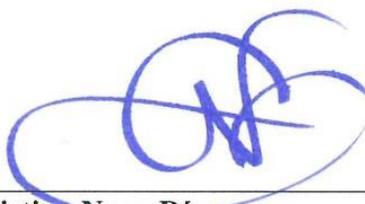
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Identificación de insectos asociados al cultivo de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] como portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus*** realizada por el alumna: **Mireya Paloma López San Juan** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Cristian Nava Díaz

ASESORA



Dra. Laura Delia Ortega Arenas

ASESOR



Dr. José Abel López Buenfil

Identificación de insectos asociados al cultivo de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] como portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Mireya Paloma López San Juan, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Diaphorina citri es el principal vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). Recientemente se han reportado otros insectos portando la bacteria en Asia y EUA. En el manejo integrado de las enfermedades, la identificación de vectores se considera un paso importante para determinar las fuentes de dispersión y control. En México, *D. citri* es el único insecto reportado oficialmente como vector de CLas. El presente trabajo tuvo como objetivo detectar molecularmente la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en insectos asociados al cultivo del limón mexicano en Michoacán, México. Se colectaron insectos asociados a huertas comerciales de limón mexicano ubicadas en el estado de Michoacán. Los insectos se identificaron a nivel género y especie con ayuda de claves taxonómicas y consultas a especialistas. La detección de CLas se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real. Se analizaron 930 insectos incluidos en las familias Cicadellidae, Thripidae, Pseudococcidae, Aphididae, Psylloidea e individuos de *D. citri*. El análisis molecular de las muestras de insectos arrojó resultados negativos a la presencia de la bacteria en estudio, excepto para los ejemplares de *D. citri*.

Palabras claves: Insectos portadores, Limón mexicano, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Transmisión.

Identification of insects associated with the cultivation of Mexican lemon [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] as carriers of *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Mireya Paloma López San Juan, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Diaphorina citri is the main vector of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). Recently, other insects have been reported carrying the bacteria in Asia and USA. Integrated management of diseases, the identification of vectors is considered an important step in determining the sources of dispersion and control. In Mexico, *D. citri* is the only insect reported officially as a vector of CLas. The objective of this work was to molecularly detect the presence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in insects associated with Mexican lemon culture in Michoacán, Mexico. Insects associated with commercial Mexican lemon sites located in Michoacán state were collected. Insects were identified at the genus and species level with taxonomic keys and specialists consultations. CLas detection was carried out using real-time PCR technique. 930 insects were analyzed and they are includes in the families Cicadellidae, Thripidae, Pseudococcidae, Aphididae, Psylloidea and individuals of *D. citri*. Molecular analysis of the insect samples showed negative results to the presence of CLas, except for *D. citri* specimens.

Keywords: Insects carriers, Mexican lemon, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Transmission.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el subsidio brindado durante la realización de mis estudios.

Al Dr. **Cristian Nava Díaz**, por aceptarme como parte de sus aconsejados, por su apoyo y dirección en este trabajo de investigación, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A la **Dra. Laura Delia Ortega Arenas** por sus consejos y por sembrar en mí el interés de lo desconocido en materia a los insectos vectores.

Al Dr. **José Abel López Buenfil** por su valiosa participación y asesoría durante el este trabajo de investigación.

Al M.C. **José Manuel Cambren Crisantos** por sus asesorías, consejos y participación activa en el presente trabajo.

Al **Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria** del SENASICA por brindarme la oportunidad de realizar parte de mi investigación es sus instalaciones, así también por el apoyo brindado por sus especialistas.

Al **Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Michoacán** por las facilidades brindadas durante la fase de campo de mi investigación.

A los ingenieros **Samuel Ambriz Morales** y **Cipriano Aguirre Espinosa** por su apoyo brindado durante la fase campo, por compartir con su servidora de sus experiencia y conocimientos en la protección fitosanitaria de la citricultura.

A **Gabriel Herrera** por sus consejos y aportes en esta investigación, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A **Marco Antonio Magallanes Tapia** por tu acompañamiento en la fase de campo y laboratorio, por tus consejos y acertadas asesorías, por compartir conmigo no solo tu experiencia si no también una linda amistad.

Y a todas aquellas personas que de alguna forma me brindaron su apoyo en esta investigación. A todos muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a las persona que no solo impulsaron mi sueño de obtener el grado en Maestra en Ciencias, sino también las metas que me he propuesto como profesionistas y persona al señor Victorino López Tirado y a la Sra. Eufrosina San Juan Arriaga. Gracias papás por sus consejos, tiempo y esfuerzo para hacer de mí una persona con ambiciones y objetivos. Este logro no solo es mío, todo esto se lo debo a ustedes. Los amo.

*Lo que no se inicia hoy nunca se termina mañana.
Johann Wolfgang von Goethe*

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
4. HIPÓTESIS.....	3
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
5.1. Insectos Vectores.....	3
5.1.1 Generalidades de insectos vectores.....	3
5.1.2 Aparato bucal en insectos vectores de bacterias.....	4
5.1.3 Endosimbiontes en insectos vectores.....	5
5.2. Insectos vectores de fitopatógenos limitados al floema.....	7
5.3. Vectores del género <i>Candidatus Liberibacter</i>	8
5.4. Insectos vectores y portadores de CLas.....	9
5.5. Mecanismo de transmisión de CLas.....	10
5.6. Métodos de diagnóstico de CLas.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Selección de sitios de estudio.....	12
6.2 Selección de las fechas de muestreo.....	14
6.3 Sistema de muestreo y colecta de insectos.....	15
6.4 Procesamiento de los insectos.....	16
6.4.1 Identificación del material entomológico.....	16
6.4.2 Extracción de ADN.....	16
6.4.3 Detección de CLas por qPCR.....	17
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
7.1 Insectos colectados.....	18
7.2 Géneros y especies identificadas.....	21

7.2.1	Familia Cicadellidae	21
7.2.1.1	Subfamilia Cicadellinae	23
7.2.1.2	Subfamilia Typhlocybinae	24
7.2.1.3	Subfamilia Deltocephalinae	24
7.2.2	Súper Familia Psylloidea	25
7.2.3	Familia Thripidae	25
7.2.4	Familia Aphididae	26
7.2.5	Familia Pseudococcidae	26
7.3	Detección de CLas	27
8	CONCLUSIONES	31
9.	LITERATURA CITADA	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de colecta ubicados en Buenavista, Michoacán. A) Sitio 1, alto nivel tecnológico y fuera de ARCO's (19.2155 N-102.6062 O); B) sitio 2, medio nivel tecnológico y fuera de ARCO's (19.2719 N -102.5629 O); C) sitio 3, bajo nivel tecnológico y fuera de ARCO's (19.1616 N -102.7285 O); D) sitio 4, alto nivel tecnológico y dentro de ARCO's (19.2201 N-102.6227 O); E) sitio 5, medio nivel tecnológico y dentro de ARCO's (19.2425 N -102.5863 O); F) sitio 6, bajo nivel tecnológico y dentro de ARCO's (19.1105 N -102.6831 O)	14
Figura 2. Insectos totales colectados en Buenavista, Michoacán, del 28 al 30 de Julio y del 10 al 13 de octubre del 2017.	19
Figura 3. Insectos colectados por sitio. Sitio 1) alto nivel tecnológico y fuera de ARCO's; Sitio 2) medio nivel tecnológico y fuera de ARCO's; Sitio 3) bajo nivel tecnológico y fuera de ARCO'; Sitio 4) alto nivel tecnológico y dentro de ARCO's; Sitio 5) medio nivel tecnológico y dentro de ARCO's; Sitio 6) bajo nivel tecnológico y dentro de ARCO's.	20
Figura 4. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Especies de la subfamilia Cicadellinae. A) <i>Cocrassana</i> sp.; B) <i>Scaphytopius</i> sp; C) <i>Alconeura</i> sp.; D) <i>Homalodisca ichthycephala</i> ; E) <i>Graphocephala redacta</i> ; F) <i>Agallia</i> sp.	21
Figura 5. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Especies de la subfamilia Typhlocybinae. A) y B) Especies (1 y 2) de <i>Emposca</i> no identificadas; C) <i>Typhlocybella maidica</i>	22
Figura 6. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Subfamilia Deltocephalinae. A) y B) Especies 1 y 2 del género <i>Balclutha</i> spp.; C) <i>Graminella sonora</i>	22
Figura 7. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Cicadélidos no identificados. A) Cicadellido no identificado 1 y B) Cicadellido no identificado 2.....	23
Figura 8. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Psílidos colectados en huertos de limón mexicano. A) <i>Freysuila dugesii</i> ; B) <i>D. citri</i>	25

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los tipos de transmisión.....	4
Cuadro 2. Endosimbiontes primarios y secundarios y su principal función en el insecto vector.....	6
Cuadro 3. Familias de insectos vectores de fitopatógenos limitados al floema.....	7
Cuadro 4. Insectos de las familias Triozidae, Liviidae, Psyllidae, reportados como vectores de especies de <i>Candidatus Liberibacter</i>	9
Cuadro 5. Criterios utilizados para la estratificación de tres niveles de desarrollo tecnológico bajo condiciones de riego en limón mexicano	13
Cuadro 6. Detección de CLas por qPCR en insectos asociados a huertos comerciales de limón mexicano colectados en Michoacán, México.	27

1. INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB) se considera la enfermedad bacteriana más destructiva de los cítricos a nivel mundial (Bové, 2006). En México, esta enfermedad se asocia a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) y se transmite por el psílido *Diaphorina citri* (Salcedo *et al.*, 2010). A nivel mundial, el manejo del HLB incluye la detección y erradicación oportuna de árboles positivos a CLAs, control del insecto vector con productos químicos, biológicos e insectos depredadores y al uso de plantas certificadas libres de este patógeno (Robles, 2012). Actualmente, en México el manejo de la enfermedad se lleva a cabo mediante vigilancia epidemiológica en huertos comerciales y zonas urbanas, y Áreas Regionales de Control (ARCO's). Este último implica realizar acciones enfocadas al control de *D. citri*, principalmente con aplicaciones químicas simultáneas en áreas citrícolas definidas en periodos cortos y de cobertura regional, en épocas biológicamente justificadas y bajo un esquema de rotación de grupos toxicológicos de insecticidas; además, el uso de control biológico en focos de infestación y áreas en donde la utilización de químicos represente un riesgo a la fauna y estándares de comercialización (Robles, 2016).

Hasta hace unos años, *D. citri* era la única especie de psílido reportada capaz de adquirir y transmitir a CLAs; sin embargo, se han reportado otros insectos asociados a esta bacteria, como es el caso de *Diaphorina communis* y *Cacopsylla citrisuga* en Asia y *Ferrisia virgata* en EUA (Cen *et al.*, 2012b; Donovan *et al.*, 2012; Pitino *et al.*, 2014). En limón mexicano, cuando existe una alta producción de brotes vegetativos y reproductivos mediados por condiciones favorables de humedad y temperatura, se observan otros insectos plaga como pulgones, ácaros, moscas blanca y chicharritas. Estos insectos, además de producir un daño directo en el rendimiento del cultivo, por su naturaleza de insectos chupadores llegan a ser transmisores de fitopatógenos (Hernández-

Fuentes *et al.*, 2014). Por lo antes mencionado la siguiente investigación tiene como objetivo detectar la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en insectos asociados a limón mexicano en Michoacán, México.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un número muy reducido de bacterias incluyendo a *Candidatus Liberibacter* spp., se transmiten a través de los insectos que se alimentan de tejidos vasculares, para colonizar los tubos cribosos del floema y xilema (Fletcher y Wayadande, 2002). Los cicadélidos y psílidos son los principales grupos de insectos involucrados en transmitir fitoplasmas y bacterias, cuando se alimentan introduciendo su aparato bucal dentro de los tejidos vasculares, que les permite ingerir la savia por periodos cortos o prolongados (horas o minutos), donde transmiten y/o adquieren a estos patógenos (Nielson y Knight, 2000; Hull, 2014).

La asociación vector-fitopatógeno, es resultado de años de coevolución entre el patógeno, la planta huésped y el vector. Actualmente la importancia de esta relación va más allá de la transmisión y dispersión del patógeno; actualmente se reportan insectos que actúan como reservorio u hospederos primarios alternativos de los fitopatógenos (Nadarasah y Stavrinides, 2011; Fletcher y Wayadande, 2002). Ante esta situación y aunado a la importancia económica y epidémica que tiene el HLB en limón mexicano en México, surge la propuesta de estudiar la poblaciones insectiles con hábitos chupadores en los agroecosistemas citrícolas de limón mexicano del estado de Michoacán, que pudieran actuar como portadores y vectores potenciales de CLas.

3. OBJETIVOS

Determinar la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en posibles insectos portadores asociados a limón mexicano en Michoacán, México.

4. HIPÓTESIS

Candidatus Liberibacter asiaticus se encuentra asociado a insectos que se alimentan de limón mexicano y que pueden actuar como transmisores potenciales.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Insectos Vectores

5.1.1 Generalidades de insectos vectores

El conocer la forma en que se transmiten los fitopatógenos por sus insectos vectores, ha generado conocimiento valioso y fundamental para el control exitoso de las enfermedades en plantas. Dentro de los grupos de insectos vectores más estudiados se encuentran las especies del suborden Auchenorrhyncha (Wilson y Weintraub, 2007). Es prescindible que el insecto mantenga una relación biológica con el patógeno. Si esta es una relación forética, el insecto es solo transmisor o portador en caso de no transmitir la enfermedad, si existe una relación biológica entre el patógeno y el insecto entonces se cataloga como vector (Maramorosch, 1955).

En la actualidad existen tres clases de transmisión por vector; persistente, semipersistente y no persistente, las cuales están determinadas por un periodo de adquisición, donde el insecto se alimenta de la planta infectada y adquiere al patógeno; un periodo de latencia o incubación, donde el insecto no es capaz de transmitir el inóculo y un periodo de inoculación, el cual ocurre cuando el insecto se ha alimentado e infectado una planta sana (Maramorosch, 1955; Hogenhout *et al.*, 2008; Hull, 2014). Harris (1977), propuso los términos no circulativo y circulativo

aludiendo el recorrido del patógeno en el interior del insecto. El circulativo se presenta en los insectos de transmisión persistente donde el patógeno llega al tracto digestivo, hemolinfa y glándulas salivales, además puede llegar a darse la contaminación transovárica. Mientras que el no circulativo se lleva cabo en insectos de transmisión persistente y semipersistente a nivel de estilete y/o faringe (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los tipos de transmisión.

Tipo de transmisión	Particularidades
Persistente- circulativo	El periodo de adquisición se realiza de horas a días. Existe un periodo de latencia en donde el vector no puede transmitir al patógeno y posteriormente el periodo de inoculación, al igual que el de adquisición, ocurre cuando el insecto se ha alimentado por horas o días. En algunos casos el insecto permanece toda su vida virulífero.
Semipersistente-no circulativo	La retención del patógeno por el vector se presenta desde unas cuantas horas hasta uno o dos días, dependiendo de las actividades alimenticias del insecto. El patógeno se llega a perder en la muda.
No persistente- no circulativo	Los insectos vectores adquieren el patógeno durante tiempos muy breves a apenas cinco segundos. La probabilidad de inoculación se llega a dar en contactos de 15 a 60 segundos. El periodo de latencia no ocurre en este tipo de transmisión. Los insectos pierden el patógeno con la muda.

(Maramorosch, 1955; Harris 1977; Hogenhout *et al.*, 2008; Hull, 2014)

5.1.2 Aparato bucal en insectos vectores de bacterias

La interacción entre los fitopatógenos e insectos está determinada por diferentes factores, entre ellos el desarrollo y modificación de un aparato bucal que les permita alimentarse de los tejidos en donde se alojan los fitopatógenos. En la familia de Cicadélidos, principales vectores de

bacterias y fitoplasmas, difieren en sus conductas alimenticias. En Cicadellinae, el aparato bucal es capaz de llegar al xilema, mientras que en Deltocephalinae su alimentación se limita al floema por lo que la capacidad de transmitir fitopatógenos limitados al floema o al xilema lo condiciona el aparato bucal (Backus, 1985). Por ejemplo, en el caso de *Graphocephala atropunctata* durante su alimentación adquiere a *Xylella fastidiosa*, causante de la enfermedad de Pierce. La bacteria se introduce al insecto y se adhieren a la bomba cibarial y al revestimiento del esófago (intestino anterior del insecto), donde se multiplica y forma una biopelícula de "glicocálix" bacteriano, compuesto de polisacárido y proteína, dando una apariencia de matriz gelatinosa donde se encuentra embebida la bacteria (Purcell *et al.*, 1979).

El aparato bucal de los psílidos, principales vectores del género de "Liberibacter", es semejante al de los áfidos y cicadélidos. Presentan estiletes modificados para atravesar la cutícula, epidermis y mesófilo de las plantas y alimentarse del floema (Walling, 2008). En el caso de *D. citri* sus piezas bucales se conforman por un par de estiletes mandibulares ubicados externamente, que albergan un par de estiletes maxilares, como se observa en los pulgones (Garzo, 2012). En contraste con *D. citri* los estiletes de los áfidos tienen una longitud ligeramente menor, sin embargo poseen estructuras especializadas que les confiere la capacidad de transmisión de virus, estructuras ausentes en *D. citri*, no obstante, el psílido es capaz de adquirir y retener la bacteria en las glándulas salivales asegurando la transmisión de la bacteria (Garzo, 2012).

5.1.3 Endosimbiontes en insectos vectores

Los endosimbiontes, son organismos procariontes que están involucrados en procesos metabólicos que favorecen al insecto huésped en la síntesis y digestión de alimento y reciclaje de desechos nitrogenados (Subandiyah *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2013). Estos procariontes están involucrados en otras funciones metabólicas dentro del insecto (Cuadro 2).

Cuadro 2. Endosimbiontes primarios y secundarios y su principal función en el insecto vector.

Endosimbionte	Vector (s)	Función en el vector	Referencia
* <i>Carsonella ruddii</i>	<i>D. citri</i>	Síntesis de alimento, producción y conversión de energía, renovación de proteínas, síntesis de proteínas chaperonas.	Gill <i>et al.</i> , 2016
* <i>Portiera aleyrodidarum</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	Síntesis aminoácidos y carotenoides	Santos <i>et al.</i> , 2012
* <i>Buchnera aphidicola</i>	Áfidos	Síntesis de alimento y proteínas chaperonas	Van den Heuvel <i>et al.</i> , 1997
* <i>Tremblaya princeps</i>	<i>Planococcus citri</i>	Síntesis de alimento	López-Madrigal <i>et al.</i> , 2013
** <i>Regiella insecticola</i>	Áfidos	Protección contra hongos entomopatógenos	Vorburger <i>et al.</i> , 2010

*Endosimbiontes primarios, ** Endosimbiontes secundarios

La relación simbiótica entre endosimbiontes e insectos vectores, es otro de los principales factores que determina una exitosa y eficiente transmisión de fitopatógenos. Por su trasmisión, los endosimbiontes se clasifican en primarios (con una transmisión vertical de madre a hijos e indispensables para el insecto vector) y secundarios (pueden o no ser necesarios para la supervivencia del insecto, y cuya transmisión es horizontal) (Eleftherianos *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2013). Dentro del insecto, los endosimbiontes se encuentran en estructuras especializadas llamadas bacteriocitos (Buchner, 1965; Baumann *et al.*, 1995; Dixon, 1998). Se ha observado que algunos endosimbiontes limitan su espacio, por ejemplo *Carsonella ruddii* se aloja en bacteriocitos uninucleados, de forma tubular, sobre los ovarios de *D. citri*, mientras que *Proffittella armatura*, otro endosimbionte primario del mismo psílido, se encuentra en un sinsitio

citoplasmático dentro del bacterisoma del insecto (Ramsey *et al.*, 2015; Dan *et al.*, 2017). No se ha definido quien es responsable de regular esta conducta entre endosimbiontes e insectos, pero se sugiere que está controlado por la expresión génica quorum sensing, donde las bacterias inducen la regulación de la densidad poblacional por medio de la producción y liberación de moléculas químicas llamadas autoinductores que aumentan su concentración cuando detectan aumento en la densidad celular (Miller y Bassler, 2001).

Unas de las funciones más sobresalientes de los endosimbiontes en la interacción vector-fitopatógeno es la síntesis de células chaperonas. Estas proteínas le permiten al patógeno moverse del intestino anterior al intestino medio del insecto sin ser degradado por enzimas de su hospedante y además favorecer la transmisión persistente circulativa (Hull, 2014).

5.2. Insectos vectores de fitopatógenos limitados al floema

Virus, Mollicutes (fitoplasmas y espiroplamas) y algunas bacterias, son fitopatógenos que encuentran su alimento y un sitio para multiplicarse en los tubos cribosos ricos en azúcares del floema, por lo que se les considera fitopatógenos limitados a este tejido (Fletcher y Wayadande, 2002; Weintraub y Beanland, 2006; Whitfield *et al.*, 2015). Para estos microorganismos, la relación con insectos vectores garantiza su transmisión, dispersión y multiplicación a nuevos nichos ecológicos (Maramorosch, 1955). Los hemípteros picadores-chupadores son el principal grupo en donde se encuentran la mayoría de los insectos vectores sin embargo existe una estrecha relación y especificidad entre vector y fitopatógeno (Cuadro 3).

Cuadro 3. Familias de insectos vectores de fitopatógenos limitados al floema.

Insecto vector	Fitopatógeno	Referencia
Aphididae	Virus	
<i>Toxoptera citricida</i>	Citrus tristeza virus (CTV)	Herron <i>et al.</i> , 2006
<i>Myzus persicae</i>	Más de 40 virus	CABI, 2018
<i>Thripidae</i>	Virus	
<i>Frankliniella occidentalis</i> y	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	CABI, 2018

<i>Thrips tabaci</i>		
<i>Thrips palmi</i>	Capsicum chlorosis virus (CaCV)	Chen <i>et al.</i> , 2012
	Melon yellow spot virus	Jones, 2005
	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	CABI, 2018
Aleyrodidae	Virus	
<i>Bemisia tabaci</i>	Begomovirus	Cuellar y Morales, 2006
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	Ohnishi <i>et al.</i> , 2009
Coreidae	Bacteria	
<i>Anasa tristis</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Pair <i>et al.</i> , 2009
Psyllidae	Mollicutes	
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	Ca. Phytoplasma mali	Malagnini <i>et al.</i> , 2010
Liviidae/ Triozidae	Bacteria	
<i>Diaphorina citri</i>	Ca. Liberibacter sp.	
<i>Trioza erytreae</i>		
Cicadellidae	Mollicutes	
<i>Dalbulus maidis</i>	<i>Spiroplasma kunkelii</i>	Madden y Nault, 1983
<i>Paraphlepsius irroratus</i>	Ca. Phytoplasma pruni	García-Salazar <i>et al.</i> , 1991
<i>Circulifer tenellus</i>	<i>Spiroplasma citri</i>	Liu <i>et al.</i> , 1983

A diferencia de otros insectos, los hemípteros picadores-chupadores depositan la saliva directamente en la planta hospedera de la cual se alimenta, para después ser mezclada con la savia y succionada hacia la faringe y es en este proceso digestivo en donde el tipo de transmisión se define; por ejemplo, los virus requieren interacciones moleculares específicas entre su insecto huésped a través de proteínas para una transmisión persistente circulante, en caso de no lograr atravesar las barreras del intestino anterior su transmisión será no persistente o semipersistente (Dietzgen *et al.*, 2016).

5.3. Vectores del género *Candidatus Liberibacter*

Dentro del género *Candidatus Liberibacter* se han descrito ocho especies, que tienen amplia distribución en el mundo (Morris *et al.*, 2017). Las especies de este género se caracterizan por no ser cultivables a excepción *Liberibacter crescente*, que se logró cultivar a partir de un

aislamiento del floema de plantas de papaya y se caracteriza por un genoma no reducido (Raddadi *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2017). Esta especie sirve como modelo para comprender el mecanismo de infección de CLas. (Leonard *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2016).

La transmisión de *Candidatus Liberibacter* se encuentra fuertemente asociada a la especie de psílidos. Los psílidos vectores de este género pertenecen a las familias Psyllidae, Triozidae y Liviidae, del suborden Sternorrhyncha, orden Hemiptera. Son insectos de tamaño pequeño (1-8 mm) y de hábitos polípagos, tienen fuertes patas traseras que le permiten saltar por lo que también se les conoce como “piojos saltadores” (Cuadro 4) (Brown y Hodkinson, 1988).

Cuadro 4. Insectos de las familias Triozidae, Liviidae, Psyllidae, reportados como vectores de especies de *Candidatus Liberibacter*.

Familia	Insecto vector	Especies de <i>Candidatus</i> .	Referencia
Triozidae	<i>Trioza erythrae</i>	<i>Ca. Liberibacter africanus</i>	Van Den Berg, 1990
Liviidae	<i>Diaphorina citri</i>	<i>Ca. Liberibacter americanus</i>	Teixeira <i>et al.</i> , 2005
		<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>	Capoor <i>et al.</i> , 1967
		<i>Ca. Liberibacter caribbeanus</i>	Keremane <i>et al.</i> , 2015
Psyllidae	<i>Bactericera cockerelli</i>	<i>Ca. Liberibacter solanacearum</i>	Wang <i>et al.</i> , 2017.
Triozidae	<i>Trioza apicalis</i>		
Psyllidae	<i>Bactericera cockerelli</i>	<i>Ca. Liberibacter psyllauros</i>	Hansen <i>et al.</i> , 2008
Psyllidae	<i>Cacopsylla pyri</i>	<i>Ca. Liberibacter europaeus</i>	Raddadi <i>et al.</i> , 2011
Psyllidae	<i>Acizzia solanicola</i>	<i>Ca. Liberibacter brunswickensis</i>	Morris <i>et al.</i> , 2017

5.4. Insectos vectores y portadores de CLas

La principal forma de dispersión de CLas es por medio de su vector *D. citri*. No obstante, se ha observado que *Trioza erythrae* es capaz de transmitir a CLas, así como *D. citri* puede transmitir a *Ca. Liberibacter africanus* (Capoor *et al.*, 1967; Lallemand *et al.*, 1986). CLas se ha detectado en *Diaphorina communis* y *Cacopsylla citrisuga* en Asia y *Ferrisia virgata* en EUA;

sin embargo, no existe estudios donde se demuestre su eficiencia como vectores de la bacteria por lo que se consideran insectos portadores de la bacteria (Cen *et al.*, 2012b; Donovan *et al.*, 2012; Pitino *et al.*, 2014).

5.5.Mecanismo de transmisión de CLas

CLas se trasmite por *D. citri* de manera persistente-circulativa. Los adultos de esta especie tienen un periodo de sondeo de 8 h en plantas infectadas con la bacteria, mientras que en plantas sanas es menor (Luo *et al.*, 2015). Este comportamiento puede atribuirse al cambio histológico que sufren las hojas debido a las infecciones ocasionadas por CLas, ya que provoca un engrosamiento de la cutícula foliar y una acumulación de almidón, lo que podría explicar la prolongada duración de búsqueda de sitios idóneos de alimentación (sondeo) (Cen *et al.*, 2012a; Luo *et al.*, 2015). La adquisición de la bacteria por el insecto ocurre entre 5 y 7 h después de alimentarse en plantas infectadas (Ammar *et al.*, 2016).

Cuando los adultos libres de la bacteria se alimentan de árboles positivos a CLas, requieren de 1 a 25 días para poder transmitirla a un árbol sano, mientras que los individuos provenientes de ninfas alimentadas en árboles positivos, son infectivos tan pronto emergen, debido a que la carga bacteriana en estados ninfales aumenta considerablemente en un periodo más corto que en adultos (Inoue *et al.*, 2009; Ammar *et al.*, 2011; Ammar *et al.*, 2016). Así mismo, la eficiencia de transmisión es mayor en adultos provenientes de ninfas infectivas que en insectos que fueron expuestos a CLas en estado adulto. Estos hechos sugieren que el intestino medio y glándulas salivales juegan un papel de barrera en la transmisión de la bacteria (Cen *et al.*, 2012a; Luo *et al.*, 2015; Ammar *et al.*, 2016).

El porcentaje de adquisición de CLas por adultos de *D. citri* alimentados en plantas positivas, varía entre regiones geográficas. En experimentos realizados con poblaciones de origen japonés, 88 % de los psílidos adquirieron a CLas después de 24 h de alimentación (Inoue *et al.*, 2009), mientras que en poblaciones de Florida, solo 35 % de psílidos adultos adquirieron la bacteria a las cinco semanas de exposición a plantas infectadas (Pelz-Stelinski *et al.*, 2010). Estas diferencias, con respecto a la eficiencia de adquisición de patógenos entre poblaciones de distintas áreas geográficas, se pueden vincular con la fisiología de la planta huésped, condiciones ambientales, aptitud parasítica del patógeno y su coevolución entre organismos (Pelz-Stelinski *et al.*, 2010).

5.6.Métodos de diagnóstico de CLas

Los métodos de diagnóstico más utilizados para CLas son la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) y la PCR en tiempo real (qPCR) (Teixeira *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). La baja concentración que presenta CLas en las plantas huésped y en su insecto vector hace que otras técnicas de diagnóstico sean poco eficientes, característica que le ha permitido a la qPCR ser la técnica más usada para la detección oportuna de CLas al ser más sensible y robusta que la PCR convencional (Li *et al.*, 2008). La qPCR se basa en el uso de iniciadores de PCR que amplifican las secuencias de ADN de los Liberibacters asociados con HLB (Li *et al.*, 2006). Mientras que La PCR convencional utiliza iniciadores específicos que amplifican las secuencias de los genes 16s rDNA e iniciadores basados en genes proteínicos (Teixeira *et al.*, 2005).

Sin embargo la PCR y la qPCR no son los únicos métodos de diagnóstico, la PCR digital es otra técnica disponible para su diagnóstico, método alternativo a la qPCR y que funciona mediante la partición de una muestra de ADN o ADNc en muchas reacciones de PCR individuales en paralelo, una sola molécula se puede amplificar un millón de veces o más (Hindson *et al.*, 2011). Otra técnica utilizada es el Indexaje biológico, no obstante es un método poco empleado que consiste en la detección de CLas a partir de injertar yemas de platas indicadoras en arboles sospechosos, en el caso de CLas es utilizada debido a que otros agentes causales afectan la expresión de la enfermedad como es el caso de CTV que interfiere en la expresión de síntomas del HLB (Roistacher, 1998).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Selección de sitios de estudio

La región pacífico de México, mantiene un escenario epidémico de alta intensidad al HLB debido a su ocurrencia (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). El SENASICA a través de los Comités de Sanidad Vegetal ejecuta programas de manejo contra el psílido asiático bajo la Campaña contra el HLB de los cítricos, donde unas de las principales acciones fitosanitarias es el establecimiento de las ARCO's que impactan las poblaciones de *D. citri* mediante su manejo en áreas de 1000 hectáreas con aplicaciones de insecticidas químicos y biológicos, que a su vez afectan otros insectos plaga y benéficos asociados a cítricos (Robles, 2012). Michoacán, área de interés en el presente trabajo, representa el principal estado productor de limón mexicano en el país, y es la región con mayor superficie atendida a través de las ARCO's (SENASICA, 2018). Con respecto al impacto de los insecticidas en las poblaciones insectiles asociadas a limón mexicano se realizó la selección de los sitios de monitoreo con base a tres niveles de tecnificación, el porcentaje de

incidencia de HLB y la operatividad de las ARCO's, para la toma de muestras de insectos asociados al cultivo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Criterios utilizados para la estratificación de tres niveles de desarrollo tecnológico bajo condiciones de riego en limón mexicano

Concepto	Bajo	Medio	Alto
	Costo/ha		
Labores culturales			
Deshierbe	600	1800	3876
Podas	600	600	2340
Cajete	375	375	>375
Protec. del tronco	240	240	>240
Control de plagas			
Insect. y acaricidas		1805	>1850
Fungicidas		3120	>3120
Aplicación		800	>800
Fertilizantes		2400	>4500.44
Aplicación		800	>800
SUBTOTAL(\$)	1815	11 940	>17 901.44

Fuente: INIFAP, 2015.

En Michoacán, las ARCO's se encuentran establecidas en 11 municipios ubicados en la región del valle de Apatzingán y región costera (SENASICA, 2018), basados en el nivel de incidencia y los primeros reportes de detección de la enfermedad en Tecaltepec y Buenavista, se seleccionó a este último municipio para la colecta de muestras, aunado a la facilidad y seguridad de entrada a los huertos (Figura 1).

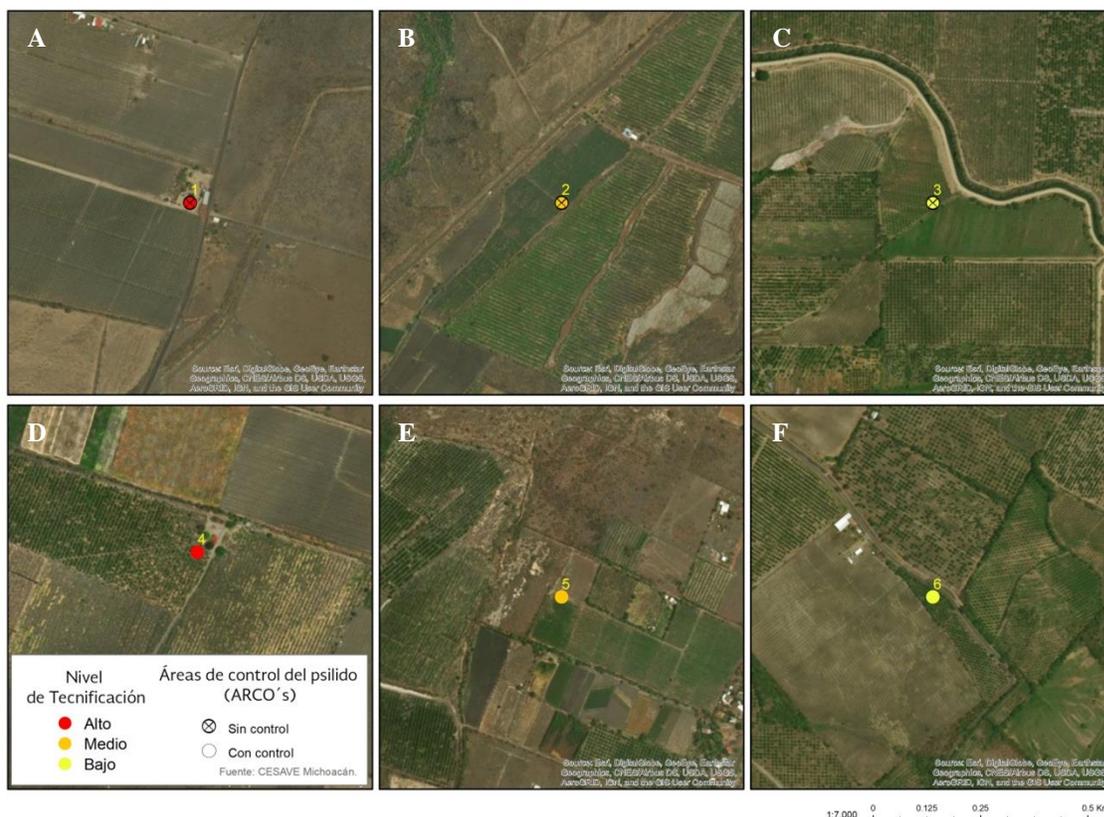


Figura 1. Sitios de colecta ubicados en Buenavista, Michoacán. **A)** Sitio 1, alto nivel tecnológico y fuera de ARCO's (19.2155 N-102.6062 O); **B)** sitio 2, medio nivel tecnológico y fuera de ARCO's (19.2719 N -102.5629 O); **C)** sitio 3, bajo nivel tecnológico y fuera de ARCO's (19.1616 N -102.7285 O); **D)** sitio 4, alto nivel tecnológico y dentro de ARCO's (19.2201 N-102.6227 O); **E)** sitio 5, medio nivel tecnológico y dentro de ARCO's (19.2425 N -102.5863 O); **F)** sitio 6, bajo nivel tecnológico y dentro de ARCO's (19.1105 N -102.6831 O)

6.2 Selección de las fechas de muestreo

La fenología de los cítricos se encuentra regulada por las modificaciones climáticas de las estaciones; las condiciones térmicas tienen influencia directa sobre la duración de cada fase fenológica. En la mayoría de las regiones cítricas de México los regímenes de temperatura son relativamente constantes, por lo que la precipitación determina el crecimiento vegetativo y floración, factores que favorecen el incremento de las poblaciones de insectos asociados a las huertas cítricas (Ordúz-Rodríguez *et al.*, 2010; INIFAP, 2013). Por lo anterior, se realizaron las colectas en periodos de brotación de limón mexicano y periodos registrados con los picos poblacionales más altos de *D. citri* en Michoacán, reportados en el “Protocolo para establecer

áreas regionales de control del HLB y el psílido asiático de los cítricos”, así como fechas de aplicaciones químicas en las ARCO’s (Robles, 2012). La primera colecta se realizó del 28 a 30 de julio y la segunda del 10 a 13 de octubre de 2017.

6.3 Sistema de muestreo y colecta de insectos

Para la obtención del tamaño de muestra se utilizó el método gráfico Curva Especie-Área, que determina el área mínima de muestreo de una población (Greig, 1983). La colecta se dirigió hacia árboles positivos a CLAs ubicados en la periferia de los huertos (Mora *et al.* 2014). La primera colecta de los insectos se realizó con una red entomológica, mientras que la segunda con una máquina RYOBI “cycle” adaptada para succionar insectos y colectarlos en una red de captura interna; no obstante algunas especies se colectaron directamente con el apoyo de un succionador bucal. Los insectos colectados se colocaron en bolsas de polietileno y se trasladaron al laboratorio de Histopatología ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Los especímenes se separaron en grupos con base en sus características morfológicas con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los grupos de insectos seleccionados para su procesamiento mediante qPCR- fueron aquellos con reportes previos como vectores o portadores de patógenos. Cada grupo se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían etanol a 96 % y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta la extracción de ADN.

6.4 Procesamiento de los insectos

6.4.1 Identificación del material entomológico

La determinación de los insectos colectados se realizó por grupos taxonómicos, en el caso de los cicadélidos y se llevó a cabo con el apoyo de la M.C. Edith Blanco Rodríguez en el laboratorio de entomología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). Para su identificación se extrajo la genitalia del macho de acuerdo a la metodología del laboratorio de Entomología del CNRF, la cual se describe a continuación:

- Separar el abdomen de cuerpo y colocarlo en KOH al 40 %
- Incubar en baño maría a por 5 minutos 30°C con constante movimiento.
- Verificar que el abdomen de los especímenes estuvieran libres de tejido membranoso
- Lavar con agua destilada para eliminar el KOH restante.
- Depositar el abdomen dentro de siracusas con alcohol al 96%
- Extraer la genitalia
- Colocar aceite de clavo en un portaobjetos y colocar la genitalia extraída para hacer montajes permanentes con bálsamo de Canadá.

Las estructuras montadas se utilizaron para la identificación a nivel género y especie con base a las claves taxonómicas de Young (1968), Nielson (1968), Dwight y Mohr (1937), Linnavuori (1959) y la base de datos en línea “¹³I Interactive Keys and Taxonomic Databases”.

6.4.2 Extracción de ADN

El método de extracción de ADN total se realizó mediante CTAB al 2% (NaCl 5M, pH= 5.2) (Doyle y Doyle, 1987), con modificaciones, que se describe a continuación.

- Secar los insectos sobre papel absorbente y a temperatura ambiente.
- Introducir la muestra en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

- Agregó 500 μ L del buffer de lisis CTAB al 2 % previamente calentado o a temperatura ambiente.
- Macerar la muestra con ayuda de micropistilos e incubar en baño maría a 65°C por 15 min.
- Enfriar la muestra durante 5 a 10 minutos.
- Agregaron 500 μ L de cloroformo, agitar por inversión durante 10 segundos y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Rescatar el sobrenadante, aproximadamente 400 μ L, en tubos de 1.5 mL.
- Agregar 500 μ L de cloroformo, agitar por inversión durante 10 segundos y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Recuperar el sobrenadante, aproximadamente 300 μ L, en tubo de 1.5 mL.
- Agregar 150 μ L de isopropanol, agitar por inversión 10 veces e incubar a -20 °C durante 20 m.
- Centrifugar durante 30 m a 13,000 rpm a temperatura ambiente
- Retirar el exceso de isopropanol por decantación.
- Agregar 1,000 μ L de etanol (75 %), centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm.
- Retirar el etanol por decantación teniendo precaución de no dejar caer la pastilla de ADN y secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en 20 μ L de H₂O libre de nucleasas la pastilla de ADN.
- Determinar la concentración y pureza del ADN (En el presente estudio se utilizó el Nanodrop® 2000 ThermoScientific).

6.4.3 Detección de CLas por qPCR

El ADN obtenido de las muestras se utilizó para realizar la determinación específica siguiendo el “Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. Mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real” del DGSV-CNRF (2008). Cada

ensayo de qPCR incluyó controles positivos, negativos y endógenos. Se emplearon los oligonucleótidos HLBas (TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG) y HLBr (GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG) diseñados en el gen 16S rADN de CLa y los oligonucleótidos WG (GCT CTC AAA GAT CGG TTT GAC GG) y WGr (GCT GCC ACG AAC GTT ACC TTC) diseñados en el gen WG de *D. citri*. Además se utilizó la sonda HLBp (56 - FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/3BHQ - 1) y WGp (5 - TET/TTA CTG ACC ATC ACT CTG GAC GC/3BHQ - 2).). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µL, el cual consistió de 1X buffer, 3 mM MgCl₂, 240 mM de dNTPs una unidad de Taq platino, 2µM cada oligonucleótido HLBas/HLBr, y WGf/WGr y 1µLM de cada sonda HLBp y WGp y 2 µL de ADN, aforando con agua destilada libre de nucleasas. Los tubos se colocaron en un termociclador CFX96 de la marca Biorad con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización de 95 °C durante 20 segundos, seguido de 40 ciclos a dos temperaturas; 95 °C durante 1 segundo con los ópticos desconectados y a 58 °C durante 40 segundos con los ópticos conectados. Para la valoración de la qPCR el control negativo debe tener un Ct = 0.00 y el FAM Ct = 0.00, mientras que el positivo debe mostrar 0.00 < Ct < 32 y el interno 0.00 < Ct < 38.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Insectos colectados

Se capturaron un total de 1,812 insectos en los seis sitios de muestreo, 631 individuos en la primera colecta (28 al 30 de julio, 2017) y 1,061 durante la segunda colecta (10 al 13 de octubre, 2017), donde los mayores números de individuos colectados corresponden a *D. citri* seguidos por el trips *Scirtothrips citri* y especies de cicadélidos (Figura 2).

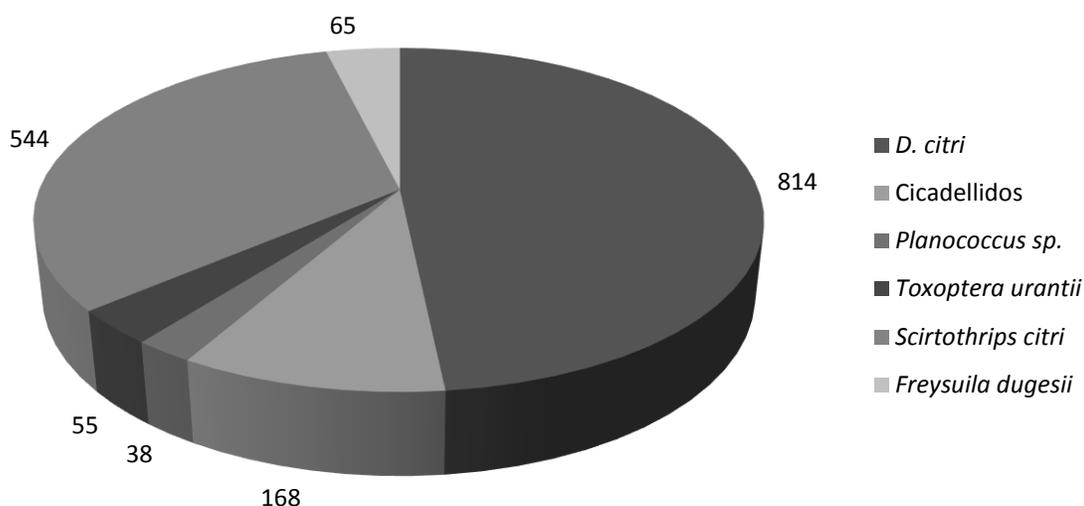


Figura 2. Insectos totales colectados en Buenavista, Michoacán, del 28 al 30 de Julio y del 10 al 13 de octubre del 2017.

La diversidad de insectos encontrados fue dependiente del nivel tecnológico de manejo del huerto. En los huertos con alto nivel tecnológico predominaron poblaciones de trips y escamas (estas últimas no fueron consideradas ni colectadas) por arriba de *D. citri*, en contraste con los huertos de bajo y mediano manejo, donde se colectó la mayor diversidad de especies de insectos plaga. En huertos con bajo manejo se encontró el mayor número de poblaciones de *D. citri*, insectos depredadores (crisopas y chinche asesina) y especies de cicadélidos (Figura 3).

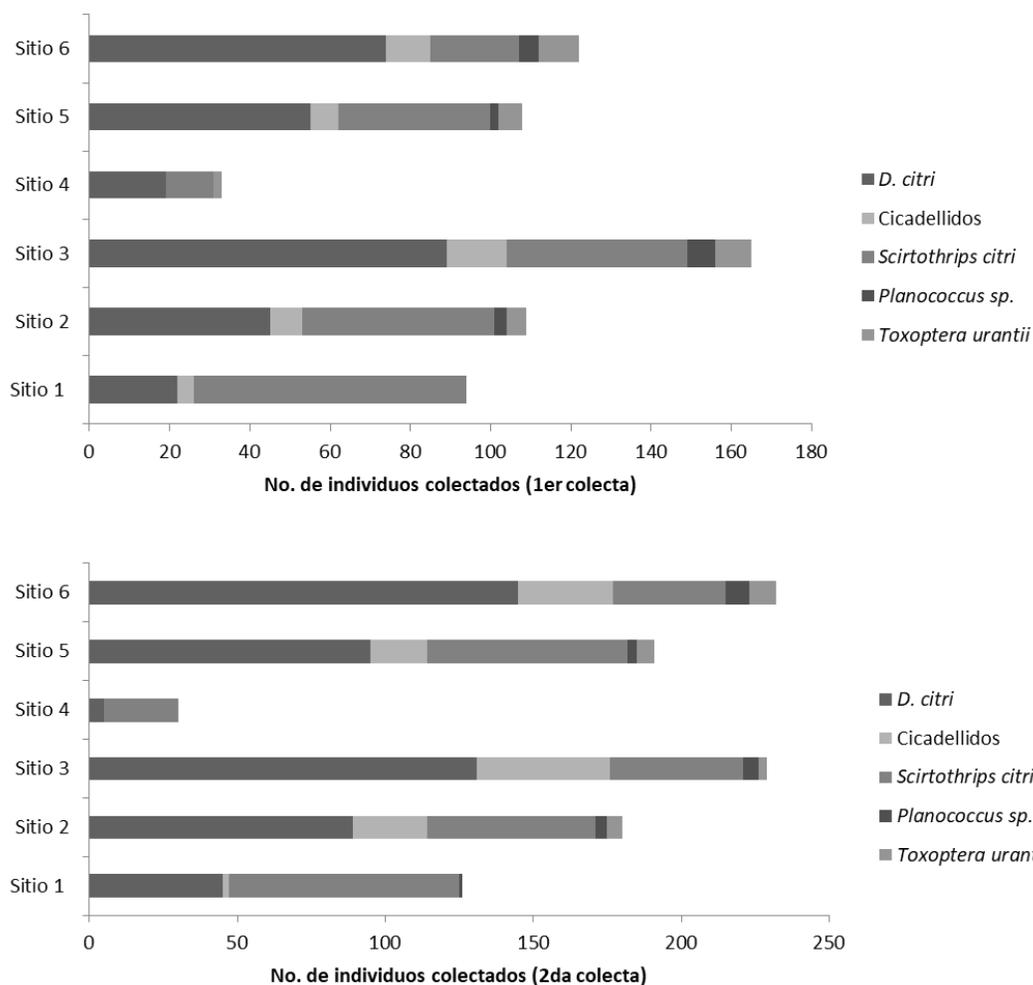


Figura 3. Insectos colectados por sitio. Sitio 1) alto nivel tecnológico y fuera de ARCO's; Sitio 2) medio nivel tecnológico y fuera de ARCO's; Sitio 3) bajo nivel tecnológico y fuera de ARCO'; Sitio 4) alto nivel tecnológico y dentro de ARCO's; Sitio 5) medio nivel tecnológico y dentro de ARCO's; Sitio 6) bajo nivel tecnológico y dentro de ARCO's.

La intensificación agrícola ha provocados cambios fundamentales en el funcionamiento de los ecosistemas agrícolas (Devine *et al.*, 2008). La diferencia en la diversidad de especies encontrada en el los sitios de muestreo coincide con estudios del efecto de los plaguicidas en la biodiversidad en predios agrícolas, (Berendse *et al.*, 2004; Geiger *et al.*, 2010). Sin embargo nuestros resultados de colecta pueden deberse también a los periodos de muestreo, ciclo de vida y ecología de los insectos.

7.2 Géneros y especies identificadas

7.2.1 Familia Cicadellidae

Se colectaron un total de 168 especímenes de la familia Cicadellidae. Entre ellos se identificaron 6 géneros de la subfamilia Cicadellinae (Figura 4), 3 de la subfamilia Deltocephalinae (Figura 5) y 2 en la subfamilia Typhlocybinae (Figura 6). No fue posible identificar a dos especímenes (Figura 7). La distribución de la familia Cicadellidae es cosmopolita, se cree que se les puede encontrar en cualquier lugar en donde existan plantas, se conocen aproximadamente 22 mil especies en 38 subfamilias (McKamey, 2002).

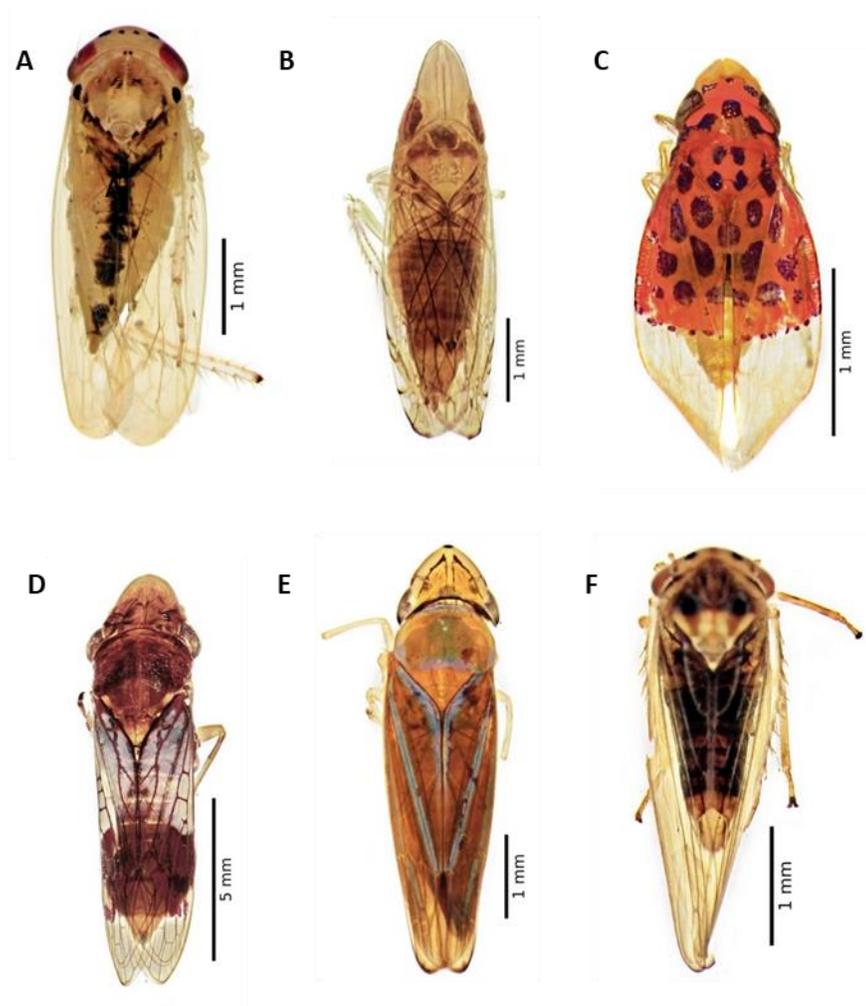


Figura 4. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Especies de la subfamilia Cicadellinae. **A)** *Cocrassana* sp.; **B)** *Scaphytopius* sp.; **C)** *Alconeura* sp.; **D)** *Homalodisca ichthyocephala*; **E)** *Graphocephala redacta*; **F)** *Agallia* sp.

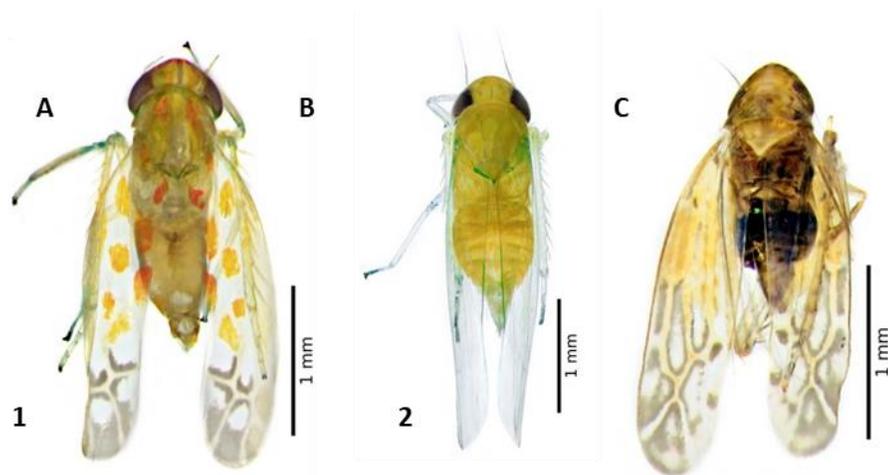


Figura 5. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Especies de la subfamilia Typhlocybinae. A) y B) Especies (1 y 2) de *Emposca* no identificadas; C) *Typhlocybella maidica*.

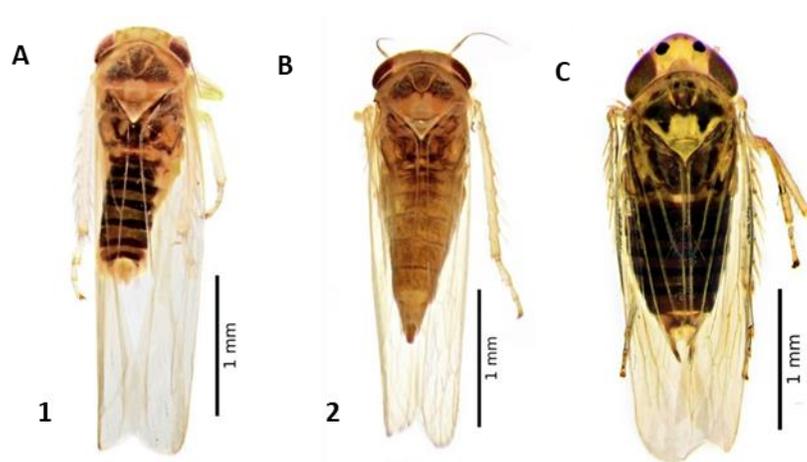


Figura 6. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Subfamilia Deltocephalinae. A) y B) Especies 1 y 2 del género *Balclutha* spp.; C) *Graminella sonora*.

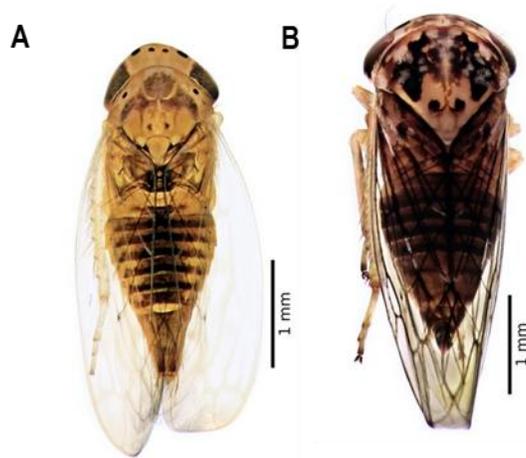


Figura 7. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Cicadélidos no identificados. A) Cicadellido no identificado 1 y B) Cicadellido no identificado 2

7.2.1.1 Subfamilia Cicadellinae

La subfamilia Cicadellinae es considerada una de las más grandes, está conformado por 8 tribus y se caracteriza por su complejidad de formas, su clypeus abultado y su musculatura en su aparato bucal que le permite extraer y digerir savia del xilema de las plantas (Nielson y Knight, 2000). En este estudio, se identificaron 6 géneros dentro de esta subfamilia: *Cocrassana*, *Scaphytopius*, *Alconeura*, *Agallia*, *Homalodisca* y *Graphocephala*, estas dos últimas fueron identificadas a nivel especie. La mayoría de los géneros colectados tienen especies reportadas como insectos vectores a excepción de *Crossana* y *Alconeura*. *A. albidula* y *A. sticticollis* han sido reportadas transmitiendo fitoplasmas en brócoli (Eckstein *et al.*, 2014); *S. acutus* y *S. irroratus* transmiten fitoplasmas en melocotón (Nielson, 1968; Ronsenberger y Jones, 1978).

Los géneros *Homalodisca* y *Graphocephala* están asociadas con las subespecies de *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *pauca* y *multiplex* (Hunter *et al.*, 2010). *Graphocephala redacta* y *Homalodisca ichthyocephala*, especies identificadas en este estudio, no se encuentran reportadas como insectos vectores.

7.2.1.2 Subfamilia Typhlocybinae

Las especies de esta subfamilia se caracterizan por ser pequeñas y delicadas, comprende alrededor de 5 mil especies descritas. Su alimentación se basa preferentemente de las células del parénquima de las hojas de sus plantas hospederas (Backus, 1985). De la subfamilia Typhlocybinae se colectaron especímenes de los géneros *Empoasca* y *Typhlocybella*.

Los especímenes del genero *Empoasca* no se identificaron a nivel especie, pero se corroboró que no fueran *E. papayae* y *E. decipiens*, que son especies asociadas a la transmisión de fitoplasmas y rickettsias (Alhubaib *et al.*, 2009; Acosta *et al.*, 2017). Se identificó a *Typhlocybella maidica* que a pesar de que no cuenta con reportes como insecto vector, su estrategia de alimentación que consiste en la ruptura de las células de mesófilo, que sugiere pueda tratarse de un eficiente vector de virus o fitoplasmas en maíz, su planta hospedante (Brentassi *et al.*, 2010).

7.2.1.3 Subfamilia Deltocephalinae

La subfamilia Deltocephalinae es considerada la más grande de las subfamilias de los Ciadellidos, está conformada por 36 tribus y más de 6 200 especies distribuidas en todo el mundo. La mayoría de las especies se alimentan de floema, y se consideran como los principales vectores de fitoplasmas dentro de los cicadélidos (Zahniser y Dietrich, 2010). De los insectos colectados se identificaron los géneros *Balclutha* y *Graminiella* pertenecientes a esta subfamilia. En ambos géneros se reportan especies vectoras de fitoplasmas y virus. De los ejemplares de *Balclutha* colectadas no fue posible su determinación a nivel de especie. Sin embargo, se descartó que se tratara de *Balclutha mbila*, especie vectora de fitoplasmas en maíz (Storey, 1925). Por otro lado se identificó a *Graminiella sonora*, que ha sido reportada como especie responsable de la trasmisión del Virus mosaico del sorgo (SSMV) (Creamer y He, 1997).

De las especies no identificadas se cree que puedan pertenecer a la subfamilia Cixiellinae, por las características morfológicas distintivas del género.

7.2.2 Súper Familia Psylloidea

De los psílidos colectados, solo *D. citri* (Liviidae) fue encontrada en árboles de cítricos, no obstante se capturaron psílidos de árboles del género *Caesalopinia* que son utilizados como cerca entre los huertos de cítricos (Figura 8). El psílido fue identificado como *Freysuila dugesii* (Psylloidea), el cual no cuenta con reportes de insecto vector, en México se ha reportado causando daños en ornamentales en el estado de Sinaloa. (Lugo-García *et al.*, 2017).

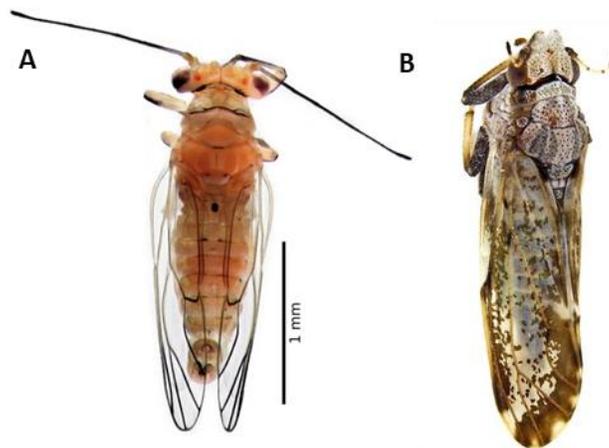


Figura 8. Insectos asociados a limón mexicano en Michoacán. Psílidos colectados en huertos de limón mexicano. A) *Freysuila dugesii*; B) *D. citri*

7.2.3 Familia Thripidae

Los trips en su mayoría son fitófagos y no siempre su presencia se relaciona con la aparición de daños (Navarro *et al.*, 2008). En los últimos dos años se registró en Michoacán un brote de *Scirtothrips citri* en limón mexicano (Miranda, 2017) especie encontrada en las colectas realizadas. *S. citri* no está reportada como especie vectora, sin embargo los daños reportados en los frutos de limón mexicano afectan su comercialización al grado que su importancia como

plaga está desplazando a *D. citri* en el interés de manejo por parte de productores (Nuestravisión, 2017).

7.2.4 Familia Aphididae

Los áfidos son plagas que atacan a una amplia diversidad de cultivos; en cítricos, su hábito alimenticio picador-chupador afecta severamente el desarrollo de los nuevos brotes, aunado a su capacidad en la transmisión de virus (Hull, 2014). En Michoacán las especies reportadas en limón mexicano son *Toxoptera urantii*, *Aphis spiraecola* (Godoy y Cortez, 2018). La especie colecta en esta investigación fue *T. aurantii*, unas de las principales plagas en cítricos por sus altas poblaciones y los daños que provoca (Hermoso, 1986).

7.2.5 Familia Pseudococcidae

Las cochinillas o piojos harinosos son insectos de la familia Pseudococcidae, Orden Hemiptera y de acuerdo con Ben-Dov (1989) se han descrito 61 especies en cítricos a nivel mundial. Los géneros más frecuentes son, *Planococcus citri*, *Dysmicoccus brevipes* y *Pseudococcus longispinus* los cuales se encuentran presentes en México (Ben-Dov, 1989; Villatoro-Moreno *et al.*, 2016; CABI, 2018). Los piojos harinosos colectados corresponden al género de *Planococcus*.

7.3 Detección de CLas

Se analizaron un total de 930 insectos; 168 cicadélidos, 544 *Scirtothrips citri*, 38 *Planococcus* sp., 55 *Toxoptera urantii*, 65 *F. dugessi*, 60 *D. citri*, de los cuales únicamente en *D. citri* se detectó a CLas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Detección de CLas por qPCR en insectos asociados a huertos comerciales de limón mexicano colectados en Michoacán, México.

Individuos analizados	PCR-RT			
	Colecta no. 1		Colecta no. 2	
	Analizados	+/-	Analizados	+/-
<i>Cocrassana</i> sp.	3	–	0	–
<i>Scaphytopius</i> sp.	8	–	12	–
<i>Alconeura</i> sp.	*	–	1	–
<i>Homalodisca ichthyocephala</i>	4	–	5	–
<i>Graphocephala redacta</i>	3	–	4	–
<i>Agallia</i> sp.	2	–	6	–
<i>Typhlocybella maidica</i>	7	–	18	–
<i>Empoasca</i> (1)	6	–	14	–
<i>Empoasca</i> (2)	8	–	17	–
<i>Balclutha</i> (1)	6	–	9	–
<i>Balclutha</i> (2)	4	–	13	–
<i>Graminella sonora</i>	3	–	7	–
<i>Cicadellido no identificado</i> (1)	*	–	4	–
<i>Cicadellido no identificado</i> (2)	2	–	5	–
<i>Scirtothrips citri</i>	233	–	311	–
<i>Freysuila dugessii</i>	28	–	37	–
<i>Toxoptera urantii</i>	32	–	23	–
<i>Planococcus</i> sp.	17	–	21	–
<i>Diaphorina citri</i>	30	+	30	+

*Especie no encontrada durante la colecta

En México, la bacteria causante de la enfermedad más importante de los cítricos está estrictamente asociada a *D. citri*. Observaciones similares de otras especies de *Ca. Liberibacter* asociadas psílidos han sido reportadas (Morris *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en áfidos coinciden con los de McClean y Oberholzer (1965) quienes descartan a los *Toxoptera citricida* y *Aphis gossypii* como vectores de *Ca. Liberibacter africanus* y encuentran al psílido *Trioza erythrae* como único vector de esta especie. Cen (2012) indicó que en China se han realizado múltiples estudios para detectar posibles vectores de CLas. En contraste, con los estudios realizados en Asia y África, investigadores de Florida (EUA) demostraron experimentalmente que *Ferrisia virgata* puede adquirir y retener a CLas de manera estable en su organismo, hasta el momento es el primer hemíptero reportado, no perteneciente a la súper familia Psyllidae, que puede adquirir la bacteria (Pitino *et al.*, 2014).

Se han reportado 13 especies de psílidos asociados a cítricos. De ellos *D. communis* y *Cacopsylla citrisuga* son capaces de adquirir y portar a CLas de manera natural (Halbert y Manjunath, 2004; Donovan *et al.*, 2011; Cen *et al.*, 2012b; Pitino *et al.*, 2014). La incertidumbre en esta relación tan estrecha y compleja entre CLas y *D. citri*, es descifrar los factores que le permiten al psílido tener la capacidad de transmitir a las especies de *Ca. Liberibacter* causantes del HLB.

Los fitopatógenos se han valido de hemípteros para lograr su dispersión y desarrollo a nuevas plantas. Las relaciones entre patógeno y vector son en la mayoría de los casos específicas (Weintraub y Beanland, 2006). Por ejemplo, los virus pueden ser transmitidos por trips, chicharritas, ácaros y moscas blancas; por el contrario, algunas especies de vectores de virus no son capaces de transmitir otro grupo de patógeno, como son los áfidos y moscas blancas (Hogenhout *et al.*, 2008). En los fitoplasmas, que son transmitidos por las familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae, se demostró que la proteína de la membrana

fitoplasmática y receptores del tracto digestivo del insecto vector les permite ser transmitidos por más de una especie de cicadélidos. Por ejemplo, los fitoplasmas del grupo 16SrI son transmitidos aproximadamente por 24 especies de chicharritas (Christensen *et al.*, 2005). Los espiroplasmas han desarrollado también mecanismos de especificidad con su insecto vector; en la mayoría de estos mollicutes sintetizan la proteína espirulina, cuya función es antígena (Bové *et al.*, 2003).

En la relación *D. citri* y CLas, de la misma forma que en virus y mollicutes, existen diversos factores que pudieran explicar porque la bacteria es capaz de colonizar y multiplicarse dentro del psílido y ser transmitido por este. La participación de otros procariontes, como son los endosimbiontes juegan un papel crucial en la transmisión de CLas por *D. citri*.

El sistema inmune del insecto se encarga de evitar que organismos extraños entren al cuerpo o suprimen el crecimiento y replicación de los patógenos una vez dentro del tejido del huésped, a través de mecanismos de defensa que actúan individualmente o en combinación (Eleftherianos *et al.*, 2013). Los endosimbiontes han desarrollado estrategias para suprimir los mecanismos del sistema inmune del insecto. Algunas teorías sugieren que estas estrategias fortalecieron aún más el sistema inmunológico, no obstante, en algunos insectos dichas estrategias favorecen la entrada y establecimiento de los fitopatógenos a su organismo sin que estos sean atacados (Eleftherianos *et al.*, 2013).

En *D. citri*, *Candidatus* Wolbachia sp. (CW) es capaz de suprimir el gen SC1 de CLas promotor de holina, causante del ciclo lítico de la bacteria, el cual se activa al contacto con la planta, no así en el psílido, lo que sugiere que las proteínas sintetizadas por CW trabajan como anticuerpos en *D. citri*, lo que explica porque la bacteria no mata al psílido. Sin embargo, esta

interacción afecta la longevidad *D. citri* negativamente (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2016; Jain *et al.*, 2017). *Candidatus Carsonella ruddii* (CCr), endosimbionte primario de *D. citri* además de sus funciones básicas, producción y conversión de energía, transporte y metabolismo de aminoácidos, es responsable de la síntesis de proteínas chaperonas, que como ya se mencionó son las responsables del movimiento de los fitopatógenos dentro del vector sin ser afectados por enzimas, aún no está demostrado que las proteínas chaperonas sintetizadas por CCr son las responsables del movimiento de CLas de la hemolinfa a las glándulas salivales después de formar una biopelícula en el instinto medio pero parece ser la explicación más viable (Van den Heuvel *et al.*, 1997; Pelz-Stelinski *et al.*, 2010; Ammar *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2016). CLas dentro del *D. citri* reduce las la síntesis de proteínas de CCr, CW, otros endosimbiontes y de su huésped, en estudios realizados a la hemolinfa de psílidos positivos a CLas, se encontró una sola proteína (Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano-SB2) encargada de activar el sistema inmune en contraste con psílidos sanos donde se detectaron más de una (Gill *et al.*, 2016).

Solamente los psílidos son capaces de transmitir a CLas a pesar de que otros insectos como cicadélidos, trips y piojoso harinosos tienen una ingesta del floema (Hernández-Fuentes *et al.*, 2014). Es posible que carezcan de la capacidad de retener a CLas en las glándulas salivales como lo hacen *D. citri* y *E. erytrae* o que CLas sea incapaz de multiplicarse debida a la respuesta inmunológica de los insectos (Capoor *et al.*, 1967; Lallemand *et al.*, 1986).

En las colectas realizadas se encontró a *D. citri* alimentándose de plantas de cítricos y a *F. dugesii* cerca de los árboles de limón mexicano, pero este último no se le encontró ni posando ni alimentándose del cítrico. Existen reportes de que en la región muestreada está presente *B. cockerelli* vector de dos de especies de *Ca. Liberibacter* e insecto plaga de un número

considerable de especies cultivables y que pudiera ser candidato a insecto portador de CLas lo que se sugiere estudios a futuros de la relación que pueda tener este psílido con CLas (Álvarez-Hernández et al., 2009).

8 CONCLUSIONES

Se analizaron 930 insectos mediante qPCR de los 1 812 capturados. 168 individuos de la familia Cicadellidae, 544 de Thripidae (*Scirtothrips citri*), 38 de Pseudococcidae (*Planococcus* sp.), 55 de Aphididae (*Toxoptera urantii*), 125 de la súper familia Psylloidea (*F. dugessi* y *D. citri*). No se detectó la presencia de CLas en las muestras examinadas, excepto en ejemplares de *Diaphorina citri*.

9. LITERATURA CITADA

- Acosta, K. I., Zamora, L., Piñol, B., Quiñones, M. L., Ramos, P. L., Leyva-López, N. E. y Arocha, Y. 2017. *Empoasca papayae* Oman, 1937 (Hemiptera: Cicadellidae) the simultaneous vector of phytoplasmas and rickettsia associated with “Bunchy Top Symptom” in Cuba. *Anales de Biología* 39:35-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.39.03>
- Alhubaib, K., Arocha, Y., Wilson, M. y Jones, P. 2009. Molecular identification, potential vector and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. *Crop Protection* 28:13–18 doi.org/10.1016/j.cropro.2008.08.007
- Álvarez-Hernández, J. C., Cortez-Madrigal, H., García-Ruiz, I., Ceja-Torres, L. F. y Pérez-Domínguez, J. F. 2008. Incidencia de plagas en injertos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) sobre parientes silvestres. *Revista Colombiana de Entomología*. 35(2): 150-155
- Ammar, E.D., Shatters, R.G. y Hall, DG. 2011. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ Hybridization. *Journal of Phytopathology* 159:11-12 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01836.x>
- Ammar, E. D., Ramos, J. E., Hall, D.G., Dawson, W.O. y Shatters, R. G. 2016. Acquisition, replication and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following various acquisition periods on Huanglongbing-Infected citrus by nymphs and adults of the Asian Citrus Psyllid. *PLoS ONE* 11(7): 1-18. doi:10.1371/journal.pone.0159594
- Backus, E. 1985. Anatomical and sensory mechanism of planthopper and leafhopper feeding behavior. Pp 163-194. En: Nault, L. y Rodriguez, J. (eds.). *The Leafhoppers and Planthoppers*. John Wiley y Sons, New York.
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C.Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A. y Clark, M. A. 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol* 49: 55-94. Disponible en Línea: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.mi.49.100195.000415>

- Ben-Dov, Y. 1989. The scale insects (Homoptera: Coccoidea) of citrus in Israel: diversity and pest status. Eds. Goren, R., Mendel, K. Citriculture. Proc. 6th Int. Citrus Congr, Tel Aviv, 1988. Margraf Publ, Weikersheim, 1075-1082.
- Berendse, F., Chamberlain, D., Kleijin, D. y Schekkerman, H. 2004. Declining biodiversity in agricultural landscapes and the effectiveness of agri-environment schemes. *Ambio* 33(8) : 499-502
- Bové, J.M., Renaudin, J., Saillard, C., Foissac, X. y Garnier, M. 2003. *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. *Annual Review of Phytopathology* 41: 482-500
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88 (1):7-37.
- Brentassi, M. E., Catalano, M. I., Paradell, S. y Remes, Lenicov, A. M. M. 2010 Caracterización de *Typhlocybella maidica* (Hemiptera: Cicadellidae) y descripción del daño producido en plantas de maíz y gramíneas asociadas en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*.69: 57–64.
- Brown, R.G. and Hodkinson, I.D. 1988. Taxonomy and ecology of the jumping plant-lice of Panama (Homoptera: Psylloidea). *Entomonograph* 9: 1-304.
- Buchner, P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience, New York, USA. 909p.
- CABI. 2018. Crop Protection Compendium. Global Module. CAB International. UK. Consultado en línea: <http://www.cabi.org>
- Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM. 1967. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citris in India. *J. agrie, Sci* 37: 572-576.
- Cen, Y. J., Yang, C. L., Holford, P., Beattie, G. A. C., Spooner-Hart, R. N., Liang, G. W. y Deng, X.L. 2012a. Feeding behavior of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 143(1):13-22. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01222.x>

- Cen, Y. J., Zhang, L. N., Xia, Y. L., Guo, J. y Deng, X. L. 2012b. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter Asiaticus*’ in *Cacopsylla* (Psylla) *citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist 95: 304–311.
- Chen, T. C., Chang, C. A., Kang, Y. C., Yeh, S. D., Huang, C. H. y Chen, C. C. 2012. Identification of Capsicum chlorosis virus chlorotic spots and stripes on calla Lily. J. Taiwan Agric, 61:64-74.
- Creamer, R., He, X., y Styer, W. E. 1997. Transmission of sorghum stunt mosaic rhabdovirus by the leafhopper vector, *Graminella sonora* (Homoptera: Cicadellidae). Plant Dis. 81:63-65.
- Christensen, N.M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M. y Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. TRENDS in Plant Science 10: 526-535.
- Cuellar, M. E. y Morales, F. J. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L. Revista Colombiana de Entomología. 32(1):1-9
- Dan, H., Ikeda, N., Fujikami, M. y Nakabachi, A. 2017. Behavior of bacteriome symbionts during transovarial transmission and development of the Asian citrus psyllid. PLoS ONE 12(12): e0189779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189779>
- Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E. y Furlong, M. J. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. 25(1): 74-100
- DGSV-CNRF. (Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). 2008. Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. DGSV. 17p.
- Dietzgen, R. G., Mann, K. S. y Johnson, K. N. 2016. Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. Viruses 8 (11): 303
- Dixon, A. F. G. 1998. Aphid Ecology: An optimization approach. Chapman & Hall, London. P.

- Donovan, N. J., Beattie, G. A., Chambers G. A., Holford. P., Englezou, A., Hardy S. y Dorjee, P. 2012. First report of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in *Diaphorina communis*. Australasian Plant Disease. Notes.7:1-4.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 11: 11-15
- Dwight, M. D. y Mohr, C. O. 1937. The Genus Graminella (Homoptera-Cicadellidae). The American Midland Naturalist. 18(4): 630
- Eckstein, B., Barbosa, J.C., Kreycki, P. F. y Zanol K. M. R. 2014. Identification of potential leafhoppers vectors of phytoplasmas (16SrIII group) associated with broccoli stunt disease in Brazil. Australasian Plant Pathology. Doi. 10.1007/s13313-014-0293-8
- Eleftherianos I, Atri J, Accetta J, Castillo JC. 2013. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system. Frontiers in Physiology 4:46 doi: 10.3389/fphys.2013.00046
- Fletcher, J. y A. Wayadande. 2002. Fastidious vascular-colonizing bacteria. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2002-1218-02
- García-Salazar, C., Whalon, M. E. y Rahardja, U. 1991. Temperature-dependent pathogenicity of the X-disease micoplasma-like organism to its vector, *Paraphlepsius irroratus* (Homoptera: Cicadellidae). Environmental Entomology 20: 179-184.
- Gastélum-Luque, R., Godoy-Angulo, T.P., López-Meza, M., Yañez-Juárez, M. G. y Cruz-Ortega, J. E. año pendiente. Plagas potenciales de hortalizas y cítricos. (En comunicación con el uator).
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B., Ceryngier, P., Liira, J., Tscharrntke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Part, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, C., Palmer, C. 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. Basic and Applied Ecology. 11: 97-105.
- Gill TA, Chu C, Pelz-Stelinski KS. 2016. Amino Acids 49(2): 389-406. doi 10.1007/s00726-016-2373-2

- Godoy, C. C. A. y Cortez, M. H. 2018. Potencial de *Aclepias curassavica* L. (Apocynaceae) en el control biológico de plagas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9: 303-315
- Greig, S. P. 1983. *Quantitative plant ecology*. 3er Edition. University of California Press. Berkeley, CA. 347 p.
- Halbert, S. y Manjunath K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*,87(3):330-353.[https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0330:ACPSPA\] 2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0330:ACPSPA] 2.0.CO;2)
- Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R. y 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). *Appl Environ Microbiol*. 74: 5862–5865 doi: 10.1128/AEM.01268-08
- Harris, K.F. 1977. An ingestion-egestion hypothesis of non-circulative virus transmission. In: K.F. Harris, and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 166-208. Academic Press, New York.
- Hernández-Fuentes, L.M., Urías-López, M.A., Gómez-Jaimes, R., López-Arroyo, J.I., Velásquez-Monreal, J.J., y Orozco-Santos, M., 2014. El Huanglongbing y su vector *Diaphorina citri* en limón persa en Nayarit: recomendaciones para su manejo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico 3. ISBN: 978-607-37-0283-6.
- Hermoso, A., Fuertes, C. y Serra, J. 1986. Proporciones relativas a gráficas de vuelo de pulgones (Homoptera, Aphidinea) en los cítricos españoles. *Inv. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 1(3), 393-408.
- Herron, C. M., Mirkov, T. E., Da Graca, J. V. y Lee, R. F. 2006. Citrus tristeza virus transmission by the *Toxoptera citricida* vector: in vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. *J. Virol Methods*. 134(1-2):205-11

- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., Wittmann, D. K., Erndt, N. G., Cauley, T. H., Koehler, R. T., So, A. P., Dube, S., Rose, K. A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D. P., Hodges, S. P., Romine, S., Milanovich, F. P., White, H. E., Regan, J. F., Karlin-Neumann, G. A., Hindson, C. M., Saxonov, S. y Colston, B. W. 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*. 83(22): 8604–8610.
- Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E. y Redinbaugh, M. G. 2008. Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- Hull, R., 2014. *Matthew's Plant Virology*. Academic Press, USA p. 1056.
- Hunter, W. B., Shelby, K. S., Purcell, A. H. y Hunnicutt, L. E. 2010. Protein identities-*Graphocephala atropunctata* expressed sequence tags: expanding leafhopper vector biology. *Biological Sciences* 14: 89-98.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2013. Memorias del simposio internacional sobre HLB en cítricos ácidos, Tecoman, Colima. 311p.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2015. Agenda Técnica Agrícola Michoacán. 2º Edición, 242 pp. Consultado en línea en: file:///C:/Users/user/Downloads/16_Michoacan_2015_SIN.pdf
- Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T. y Ashihara, W. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology* 155: 29–36. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00317.x>
- Jain, M., Fleites, L.A. y Gabriel, D.W. 2017. A small Wolbachia protein directly represses phagolytic cycle genes in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” within psyllids. *mSphere* <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00171-17>

- Jones, D. R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*. 113: 119-157.
- Keremane, M.L., Ramadugu, C., Castaneda, A., Diaz, J. E. P., Chen, E. A., Duan, Y. P., Halbert, S. E. y Lee, R. F. 2015. Report of *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, a new citrus- and psyllid- associated *Liberibacter* from Colombia, South America In American Phytopathological Society Annual Meeting. Consultado en http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abO253.htm
- Lai, K.K., Davis-Richardson, A.G., Dias, R. y Triplett, E.W. 2016. Identification of the Genes Required for the Culture of *Liberibacter crescens*, the Closest Cultured Relative of the *Liberibacter* Plant Pathogens. *Front Microbiol*. 20:7:547. doi: 10.3389/fmicb.2016.00547
- Lallemand, J., Fos, A. y Bové, J. M. 1986. Transmission by the Asian vector *Diaphorina citri* of the bacterium associated at the African form of the greening disease. *Fruits* 41(5): 341-343.
- Leonard, M. T., Fagen, J. R., Davis- Richardson, A. G., Davis, M. J. y Triplett, E. W. 2012 Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT- 1. *Stand Genomic Sci* 7: 271–283.
- Li, W., Hartung, S., & Levy, L., (2006), “Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing”, *J.Microbiol. Methods*. 66(1):104 – 105
- Li, W., Li, D., Twieg, E., Hartung, S., & Levy, L., (2008), “Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR”, *Plant Disease*. 6 (92):854-861
- Linnavuori, R. 1959. Revision of the Neotropical Deltocephalinae and some related subfamilies (Homoptera). *Societas Zoologica Botanica Fennica "Vanamo"*. 20(1): 1-370
- Liu, H-Y., Gumpf, D. J., Oldfield, G. N. y Calavan, E. C. 1983. The relationship of *Spiroplasma citri* and *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* 73:585–590.

- López-Madrigal, S., Balmand, S., Latorre, A., Heddi, A., Moya, A. y Gil, R. 2013. How Does *Tremblaya princeps* Get Essential Proteins from Its Nested Partner *Moranella endobia* in the Mealybug *Planococcus citri*. PLoS ONE 8(10): e77307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077307>
- Lugo-García, G. A., Ortega-Arenas, L. D., López-Mora, J. F. y Sánchez-Soto, B.H. 2017. Descripción del psílido del palo colorado *Freysuila dugesii* Aleman, (hemiptera: psylloidea) y sus plantas hospedantes en el norte de Sinaloa, México. Entomología Agrícola. 4: 409-413
- Luo, X., Yen, A. L., Powell, K. S., Wu, F., Wang, Y., Zeng, X., Yang, Y. y Cen, Y. 2015 Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of ‘*Candidatus Liberibacter Asiaticus*’, on huanglongbing-infected citrus reticulate leaves of several maturity stages. Florida Entomologist, 98(1):186-192 <https://doi.org/10.1653/024.098.0132>
- Madden, L.V. y Nault, L.R. 1983. Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Balbulus* species. Phytopathology 73: 1608-1614.
- Malagnini, V., Pedrazzoli, F., Gualandri, V., Forno, F., Zasso, R., Pozzebon, A. y Ioriatti, C. 2010. A study of the effects of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ on the psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae). Journal of Invertebrate Pathology 103: 65-67
- Maramorosch, K. 1955. Multiplication of Plant Viruses in Insect Vectors. Advances in Virus Research, 3(C), 221–249. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60637-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60637-5)
- McClellan, A. P. D. y Oberholzer, P. C. J. 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. S. Afr. J. Agric. Sci. 8: 297-298
- McKamey, S. H. 2002. Leafhoppers of the world database: progress report. In 11th International Auchenorrhyncha Congress, p. 85.
- Miller, M. B. y Bassler, B. L. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology. 55:165-99. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165

- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez J., Acevedo-Sánchez, G., Dominguez-Monge, S. Gutiérrez-Espinoza A., y Loeza-Kuk E. 2014. Situación Actual y Perspectivas del Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol 32 (2):108-119 p.
- Morris, J., Shiller, J., Mann, R., Smith, G., Yen, A. y Rodoni, B. 2017. Novel '*Candidatus Liberibacter*' species identified in the Australian eggplant psyllid, *Acizzia solanicola*. *Microbial Biotechnology*. 10(4): 833–844.doi 10.1111/1751-7915.12707
- Nadarasah, G. y Stavrinides, J. 2011. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS Microbiol.* 35(3):555-75.
- Navarro, C. Pastor, M.T., Ferragut, F. y García, F.M. 2008. Trips (Thysanoptera) asociados a parcelas de cítricos en la Comunidad Valenciana: abundancia, evolución estacional y distribución espacial. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 23: 52-64
- Nielson, M. W. 1968. The Leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (Homoptera, Cicadellidae) taxonomy, biology, and virus transmission. United States Department of Agriculture. 385 pp.
- Nielson, M. W. y Knight, W. J. 2000. Distributional patterns and possible origins of leafhoppers (Homoptera, Cicadellidae). *Revta Bras. Zool.* 17 (1): 81-156.
- Nuestravisión. 2017. Limoneros de Apatzingán afectados por el TRIPS. Aspecto del fruto los descarta de mercados nacionales. En línea: <http://www.nuestravision.com.mx>
- Ohnishi, J., Kitamura, T., Terami, F. y Honda K. 2009. A selective barrier in the midgut epithelial cell membrane of the nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to Tomato yellow leaf curl virus uptake. *Journal of General Plant Pathology*. 75: 131-139
- Orduz-Rodríguez, J. O., Monroy H. J. y Fischer, G. 2010. Comportamiento fenológico de la mandarina "Arrayana" en el piedemonte del Meta, Colombia *Agronomía Colombiana*. 28:(1) 63-70

- Pair, S. D., Bruton, B. D., Mitchell, F., Fletcher, J., Wayadande, A. y Melcher, U. 2009. Overwintering squash bugs harbor and transmit the causal agent of Cucurbit Yellow Vine Disease. *J. Econ. Entomol* 97:74–78.
- Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T.A. y Rogers, M. E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 103(5):1531-1541 doi: <http://dx.doi.org/10.1603/EC10123>
- Pitino, M., Hoffman, M. T., Zhou, L., Hall, D. G., Stocks. I. C. y Duan, Y. 2014. The Phloem-Sap Feeding Mealybug (*Ferrisia virgata*) Carries ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Populations That Do Not Cause Disease in Host Plants. *PLoS One*. Jan 20;9(1):e85503.
- Purcell, A.H., Finlay, A.H., and McClean, D. L. 1979. Pierce’s disease bacterium: Mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science* 206: 839-841
- Raddadi, N., Gonella, E., Camerota, C., Pizzinat, A., Tedeschi, R., Crotti, E., Mandrioli, M., Bianco, P.A., Daffonchio, D. y Alma, A. 2011. *Candidatus Liberibacter europaeus* sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environ Microbiol*. 13: 414-426 doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02347.x.
- Ramírez-Sánchez, A.K., Ortega-Arenas, L. D., Velázquez-Monreal, J. J. y Valdez- Carrasco, J.M. 2016. Supervivencia y Reproducción de *Diaphorina citri* en Plantas de Naranja y Lima Mexicana Sanas e Infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Southwestern Entomologists* 41(3): 801-812 <https://doi.org/10.3958/059.041.0322>
- Ramsey, J. S., Johnson, R. S., Hoki, J. S., Kruse, A., Mahoney, J., Hilf, M. E., Hunter, W. B., Hall, D. G., Schroeder, F. C., MacCoss, M. J. y Cilia, M. 2015. Metabolic interplay between the Asian Citrus Psyllid and its Profftella symbiont: An Achilles ’Heel of the citrus Greening Insect Vector. *PLoS ONE* 10(11): e0140826.doi:10.1371/journal.pone.0140826

- Robles, G. P. L. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). Consultado en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=93>
- Robles, G. P. L. 2016. Manual operativo de la campaña contra el Huanglongbing de los cítricos. Consultado en: https://www.gob.mx/cms/uploads/achment/file/262579/Manual_Operativo_contra_Huanglongbing_de_los_c_tricos.pdf
- Roistacher, C.N. 1998. Indexing for viruses in citrus. 301-319 pp citado en: Hadidi, A., R.K. Khetarpal and H. Koganezawa, eds. Plant Virus Disease Control. St Paul: APS Press.
- Ronsenberger, D.A. y Jones, A. L. 1978. Leafhopper vectors of the peach X-disease pathogen and its seasonal transmission from chokecherry. *Phytopathology* 68: 782-790
- Salcedo, D., Hinojosa, R., Mora-Aguilera, G., Covarrubias, I., De Paolis, F., Cíntora, C. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. México: IICA, SAGARPA, SENASICA. 120 p.
- Santos, G. D., Farnier, P.A., Beitia, F., Zchori, F. E., Vavre, F., Mouton, L., Moya, A., Latorre, A. and Silva F.J. 2012. Complete genome sequence of "*Candidatus* Portiera aleyrodidarum" BT-QVLC, an obligate symbiont that supplies amino acids and carotenoids to *Bemisia tabaci*. *Journal of Bacteriology*. 23:6652-5 doi: 10.1128/JB.01793-12
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2018. Programa de trabajo de la campaña contra el Huanglongbing de los cítricos del incentivo de prevención de plagas fitosanitarias reglamentadas del programa de sanidad e inocuidad agroalimentaria 2017 del estado de Michoacán de Ocampo. Consultado en línea en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/231689/MICHOAC_N.pdf
- Storey, H. H. 1925. The transmission of streak disease of maize by the leafhopper *Balclutha mbila* Naudé. *Ann. Appi. Biol.*, 12: 422–339.
- Su, Q., Zhou, X. y Zhang, Y. 2013. Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative Integrative Biology* 6:3, e23804 doi: 10.4161/cib.23804.

- Subandiyah, S., Nikoh, N., Tsuyumu, S., Somowiyarjo, S. y Fukatsu, T. 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*. 17(7):983–9 <https://doi.org/10.2108/zsj.17.983>
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., de Costa, P. I., Ayres, A. J. y Bové J. 2005. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 5: 1857-1862
- Van Den Berg, M. A. 1990. The citrus psylla, *Trioza erytrae* (Del Guercio) (hemiptera: Triozidae): A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 30: 171-194 [doi.org/10.1016/0167-8809\(90\)90104-L](https://doi.org/10.1016/0167-8809(90)90104-L)
- Van Den Heuvel, J. F., Bruyere, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., Van Den Wilk, F. y Richards, K. 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* 71: 7258–7265.
- Villatoro-Moreno, H., Cisneros, J., Gómez, J., Infante, F., Castillo, A., 2016. Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) associated with rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) in Chiapas, Mexico., 89(4), 289-296. <http://www.bioone.org/loi/kent> doi: 10.2317/0022-8567-89.4.289
- Vorburger, C., Gehrler, L. y Rodríguez, P. 2010. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biol Lett.* 23; 6(1): 109-111 doi: 10.1098/rsbl.2009.0642
- Wang, J., Haapalainen, M., Schott, T., Thompson, S. M., Smith, G. R., Nissinen, A. y Pirhonen, M. 2017. Genomic sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotype C and its comparison with haplotype A and B genomes. *PLoS One* 12(2): e0171531. doi 10.1371/journal.pone.0171531
- Weintraub, P. G. y Beanland A. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology.* 51: 91-111 doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039

- Wilson, M. R. y Weintraub, P. G. 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 177–178.
- Whitfield, A. E., Falk, B. W. y Rotenberg, D. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 480: 278-289 doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026
- Young, D. A. 1968. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1. Proconiini. *Bulletin of the United States National Museum*. 261:1-287
- Zahniser, J. N. y Dietrich, C. H. 2010. Phylogeny of the leafhopper subfamily Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae) based on molecular and morphological data with a revised family- group classification. *Systematic Entomology* Vol 35. doi 10.1111/j.1365-3113.2010.00522.x