

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



HOSPEDEROS Y VECTORES DE *Xylella fastidiosa* EN LA ZONA
VITIVINICOLA DE PARRAS

Tesis

Que presenta ISAAC IRVING CAMACHO AGUILAR
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA

Saltillo Coahuila

Diciembre 2017

HOSPEDEROS Y VECTORES DE *Xylella fastidiosa* EN LA ZONA
VITIVINICOLA DE PARRAS

Tesis

Elaborada por ISAAC IRVING CAMACHO AGUILAR como requisito parcial
para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con
la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Asesor principal



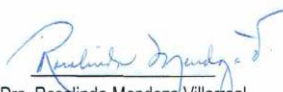
Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor



Dr. Oswaldo García Martínez
Asesor



M.C. Esmeralda González Gallegos
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Posgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza de no rendirme y permitir haber concluido mis estudios satisfactoriamente.

“A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro”

Un total y profundo agradecimiento a mi ALMA MATER por la atención, preparación y cobijo que me dio durante mi estancia en ella logrando mi formación profesional.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo.

Por brindarme su incondicional atención, asesoría, apoyo y creer en mí para la realización del proyecto y de esta tesis.

Al Dr. Alberto Flores Olivas.

A él por la asesoría y tiempo que me brindo para hacer esta tesis.

Al Dr. Oswaldo García Martínez.

A el por la asesoría y tiempo que me brindo para realizar esta tesis.

A la M.C. Esmeralda González Gallegos.

A ella por la asesoría, los consejos y tiempo que me brindo en la realización del proyecto y realización de esta tesis.

A todos mis maestros de la universidad.

Por transmitirme sus conocimientos, experiencias y orientarme por mí paso en la universidad logrando integrar un profesionista más al mundo laboral.

DEDICATORIAS

A DIOS:

Por estar siempre a mi lado, por cuidarme y llenarme de bendiciones

A MIS PADRES:

Isaac Camacho Ramírez y Concepción Aguilar De Paz por creer en mí por el gran cariño y apoyo incondicional y por los cuales he llegado a cumplir mis metas

A MIS HERMANOS:

Luis Eduardo y Arianna Monserrat por darme su cariño, por estar conmigo en las buenas y en las malas por llenarme de risas y momentos placenteros

A MI ESPOSA

Yazmin Alvizo por el amor apoyo y comprensión incondicional, mil gracias por todo el tiempo que has estado conmigo

A MIS AMIGOS:

Gracias por su amistad y por los tan innumerables buenos ratos que hemos pasado y a todos mis compañeros de la generación gracias por todo los bueno recuerdos que dejaron.

A LA FAMILIA ALVIZO MEDRANO

Gracias por su cariño y amistad, por todo el apoyo que me han brindado desde siempre

RESUMEN

HOSPEDEROS Y VECTORES DE *Xylella fastidiosa* EN LA ZONA VITIVINICOLA DE PARRAS

Tesis

Por

ISAAC IRVING CAMACHO AGUILAR

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

ASESOR

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO

Palabras clave: *Xylella fastidiosa*- -vectores- Enfermedad de Pierce-PCR-*Homalodisca vitripennis*.

Xylella fastidiosa es una bacteria patógena de plantas que ha adquirido notable importancia debido al inmenso rango de hospederos susceptibles que afecta, sin que actualmente existan medidas de control eficiente. Diversos países se han visto afectados por las enfermedades que provoca, por ejemplo: En Estados Unidos de América (EUA) por la enfermedad de Pierce en la vid, Brasil, por la clorosis variegada de los cítricos, Italia por el síndrome de decaimiento súbito del olivo: En México, la enfermedad de Pierce ha sido detectada en tres zonas vitivinícolas. Para crear medidas de control específicas y eficientes es necesario conocer los vectores y hospederos de la bacteria. La investigación se realizó en la zona circundante a los viñedos comerciales de Parras de la Fuente, Coahuila, donde se colectaron hojas de cultivos, plantas de ornato, árboles frutales y forestales, zacates y maleza adyacentes, con síntomas similares a la enfermedad de Pierce, al mismo tiempo se colectaron insectos mediante el uso de una red entomológica y colecta manual, con la finalidad de encontrar hospederos alternos y vectores de *Xylella fastidiosa*. El diagnóstico de *X. fastidiosa* en plantas e insectos se hizo mediante pruebas de PCR utilizando los primers específicos para *X. fastidiosa* RST31 y RST33, posteriormente se utilizaron pruebas de PCR con los primers específicos para *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ALM 1/ALM2 y XF2542-L/XF2542-R en muestras vegetales que

resultaron positivas para la bacteria. En total se analizaron 22 especies de plantas de diferentes familias taxonómicas de las cuales se confirmó la bacteria en plantas de vid comercial, vid silvestre, árboles de chabacano y fresno; la subespecie detectada en vid fue *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, mientras que en chabacano y fresno se detectó a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*. Entre los insectos colectados, se identificaron seis géneros y cuatro especies de cicadélidos mediante claves taxonómicas y extracción de genitalia y solo se detectó a *X. fastidiosa* en *Homalodisca vitripennis*.

ABSTRACT

**HOSTS AND VECTORS OF *Xylella fastidiosa* IN PARRAS VITIVINICOLA
ZONE**

Tesis

By

ISAAC IRVING CAMACHO AGUILAR.

As a partial requirement to obtain the degree of

MASTER IN SCIENCES IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

ASSESSOR

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO

**Keywords: *Xylella fastidiosa*-vectors-cicadelids- Pierce's disease-
citrus variegated chlorosis- sudden olive decay syndrome**

Xylella fastidiosa is a pathogenic bacterium of plants, which in recent years has acquired considerable importance due to the immense range of susceptible hosts that affects, currently there are no efficient control measures. Many countries have been affected by the diseases caused, for example: In the United States by the disease of Pierce in the vine, Brazil, by the variegated chlorosis of citrus, Italy by the syndrome of sudden decay of the olive tree. In Mexico, Pierce's disease has been detected in three grape-producing regions. The bacterium has also been detected in other hosts such as: coffee, apricot, peach, ash, flower laurel, among others. To create specific and efficient control measures, it is necessary to know the vectors and hosts of the bacteria. The project was carried out in the area surrounding the vineyards of Parras de la Fuente, Coahuila, where crop leaves, ornamental plants, fruit and forest trees, grasses and adjacent weeds were collected, with and without symptoms similar to the disease of Pierce, and at the same time insects were collected through the use of an entomological network and manual collection, in order to find alternate hosts and *Xylella*

fastidiosa vectors. In total, 22 species of plants of different taxonomic families were collected. The diagnosis of *X. fastidiosa* in plants was made by PCR tests using specific primers for *fastidiosa* subspecies, using only the central venation of the leaves and part of the petiole. Of the insects collected, six genera and four species of leafhoppers were identified through taxonomic keys and extraction of genitalia; the diagnosis of *X. fastidiosa* in insects, was made by PCR tests with specific primers for annoying subspecies, in these tests a maceration of the whole body of the insect was used. *X. fastidiosa* was detected in *Homalodisca vitripennis*, in commercial and wild vine plants, apricot and ash trees; the subspecies found in vine corresponds to *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, while in apricot and ash an *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
HIPÓTESIS.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
Descripción de <i>Xylella fastidiosa</i>	2
Clasificación taxonómica	2
Síntomas de la quemadura o escaldadura de la hoja.....	3
Rango de hospederos	3
Subespecies reconocidas de <i>X. fastidiosa</i>	3
Distribución geográfica mundial.....	4
Distribución geográfica en México	5
Impacto económico de <i>Xylella fastidiosa</i>	5
Enfermedad de Pierce	5
Síntomas	7
Clorosis variegada de los cítricos	7
Síntomas	8
Crespera del café	9
Síntomas	9
Síndrome de decaimiento súbito del olivo	9
Síntomas	10
Propagación	10
Vectores en América	13
Vectores potenciales en Europa	14
Estrategias de control	15
Control físico.....	15
Control biológico.....	15
Control legal	16
Control químico	16
Control genético	17
Métodos de diagnóstico.....	17
Medios de cultivo	17
Pruebas por ELISA.....	17
Pruebas por PCR	18

MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Colecta de material vegetal	20
Colecta de insectos	21
Identificación de cicadélidos	21
Detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas e insectos por PCR	21
Extracción de ADN vegetal y de insectos	22
PCR para <i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i> en chabacano y fresno.....	23
Secuenciación de <i>Xylella fastidiosa</i> subespecie <i>multiplex</i>	23
Identificación molecular de <i>Homalodisca vitripennis</i>	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas mediante PCR	25
Detección de <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	29
Identificación de insectos y detección de <i>Xylella fastidiosa</i>	31
CONCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la distribución mundial de <i>X. fastidiosa</i>	5
Figura 2. Distribución nacional de la enfermedad de Pierce	5
Figura 3. Síntomas de la enfermedad de Pierce en vid.	8
Figura 4. Síntomas característicos de la CVC.....	10
Figura 5. Síntomas de la quemadura de la hoja de café (CLS).....	11
Figura 6. Escala de síntomas en los olivos en el sur de Italia asociados con <i>X. fastidiosa</i>	12
Figura 7. Principales vectores de la enfermedad de Pierce en México.....	15
Figura 8. Síntomas presentes en chabacano muestra 1,2 y 3.	26
Figura 9. Síntomas presentes en vid muestra 1.....	26
Figura 10. Síntomas presentes en la planta de vid silvestre analizada.	27
Figura 11. Síntomas presentes en los árboles de fresno analizados.	27
Figura 12. Resultados de las pruebas de PCR en plantas.....	28
Figura 13. Resultados de las pruebas de PCR en plantas de fresno y chabacano.	30

Cuadro 1. Distribución geográfica y hospederos importantes de las subespecies de <i>X. fastidiosa</i>	4
Cuadro 2. Primers utilizados en el protocolo PCR para la detección de <i>X. fastidiosa</i>	18
Cuadro 3. Primers para el Gen 16S rRNA utilizados en la PCR multiplex. .	19
Cuadro 4. Primers para la detección de <i>X. fastidiosa</i> en cítricos	19
Cuadro 5. Resultados de las pruebas de PCR en plantas para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i>	27
Cuadro 6. Resultados de la prueba de PCR multiprimers para la detección de <i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i> en plantas de fresno y chabacano.	30
Cuadro 7. Resultados de las pruebas PCR en insectos para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i>	33

INTRODUCCIÓN

Xylella fastidiosa es una bacteria fitopatógena que cuenta con un gran rango de hospederos, se estima que está presente en más de 300 plantas de diferentes familias taxonómicas (EFSA, 2016). Causa enfermedades en varios cultivos de importancia incluyendo: vid (*Vitis vinífera*), café (*Coffea arabica*), olivo (*Olea europea*), varias especies de cítricos, almendro (*Prunus dulcis*), laurel de flor (*Nerium oleander*), entre otros (Almeida y Purcell, 2003; Purcell *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001). Se ha encontrado de forma latente en hospederos asintomáticos tales como artemisa (*Artemisia douglasiana*) y zacate pata de gallo (*Echinochloa cruz-galli*), los cuales sirven como reservorio (Hopkins y Purcell, 2002). Como síntomas iniciales en vid, las hojas presentan escaldados y quemaduras, que pueden llegar a ocupar hasta la mitad de las hojas; la escaldadura comienza en los márgenes y avanzan de manera concéntrica hacia el punto de inserción del pecíolo (Winkler, 1976). Años después de la infección, las plantas producen sarmientos que crecen irregularmente y presentan manchas color café, maduran tardíamente y presentan entrenudos cortos (Goodwin y Purcell, 1992).

En las zonas vitivinícolas de Parras de la Fuente, Coahuila, Valle de Guadalupe, Baja California Sur y Ezequiel Montes, Querétaro *Xylella fastidiosa* está presente en vid y es causante de la enfermedad de Pierce, el principal vector es la chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*); aunque actualmente la enfermedad está confinada en estas zonas productoras, el hecho de que se puede extender a zonas libres de *X. fastidiosa* la convierte en una amenaza potencial para la vitivinicultura en México, pues pondría en riesgo la producción de 28,940 ha que producen un promedio anual de 375,298 T de fruta, con valor de producción estimado de 7,093 millones de pesos y un rendimiento promedio por hectárea de 13.94 T (SIAP, 2014). En México, actualmente no existe información suficiente acerca de vectores potenciales y hospederos secundarios que actúen como reservorio y fuente de inóculo, por lo tanto no son tomados en cuenta en

programas de control y erradicación de la enfermedad, haciendo cualquier medida fitosanitaria ineficaz.

Una forma simple y eficiente de detectar a *X. fastidiosa* en posibles insectos vectores y en hospederos secundarios, es mediante la extracción de ADN y pruebas de PCR, utilizando primers específicos para *X. fastidiosa*. Las pruebas de PCR permiten detectar de manera oportuna a *X. fastidiosa* en plantas permitiendo el desarrollo de estrategias de control dirigidas a insectos y plantas donde se haya detectado a *X. fastidiosa*, lo que permitiría mejorar las medidas de control y contención de la enfermedad de Pierce

OBJETIVO GENERAL

Determinar los hospederos de *Xylella fastidiosa* en maleza y cultivos agrícolas adyacentes en la zona de viñedos de la región de Parras de la Fuente, Coahuila.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de *X. fastidiosa* en diferentes hospederos diferentes de vid.
2. Detectar la presencia de *X. fastidiosa* en insectos.
3. Identificar a nivel especie los insectos portadores de *X. fastidiosa*

HIPÓTESIS

Se confirmará la presencia de *X. fastidiosa* en cultivos agrícolas, maleza e insectos vectores cercanos a viñedos comerciales.

REVISION DE LITERATURA

Descripción de *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa es una bacteria gram-negativa, estrictamente aerobia, limitada al xilema, con un crecimiento óptimo de 26-28 °C , en forma de varilla alargada (bacilo), no flagelada, que no forma esporas, con medidas de 0.4 a 0.5 µm de diámetro y de 1 a 5 µm de longitud (Bradbury, 1991; Nyland *et al.*, 1973). Su movimiento en la planta es normalmente de arriba hacia abajo, pero también puede moverse hacia arriba. El movimiento ascendente de la bacteria es posible por la presencia de un pili largo de tipo IV (motilidad espasmódica), mientras que los pili de tipo I desempeñan el papel de formadores de biofilms y agregación de células (Li *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2005). En estadios avanzados de la infección, estos biofilms que bloquean la savia, están presentes tanto en la planta huésped como en el intestino anterior de los insectos vectores. *X. fastidiosa* fue descrita adecuadamente en 1987 en EUA como la causante de la enfermedad de Pierce de la vid (*Vitis vinífera*) observada en 1884 y como la causa de la enfermedad falsa del durazno (*Prunus persica*) que se observó en 1890 en EUA; además de ser causante de la clorosis variegada de los cítricos en Brasil observada en 1993. También, se encontró que la bacteria causa un sinnúmero de enfermedades llamadas "quemaduras de hoja" en durazno (*Prunus domestica*), arce (*Acer* sp.), nogal (*Carya illinoensis*), café (*Coffea arabica*), mora roja (*Morus rubra*), laurel de flor (*Nerium oleander*), álamo (*Platanus occidentalis*), encino (*Quercus* sp.) y olmo (*Ulmus americana*) (Janse y Obradovic, 2010).

Clasificación Taxonómica

Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Xanthomonadales
Familia: Xanthomonadaceae
Género: *Xylella*
Especie: *fastidiosa* Wells *et al.*, 1987

Síntomas de la Quemadura o Escaldadura de la Hoja

Los síntomas que presentan las plantas infectadas por *X. fastidiosa* generalmente se manifiestan primero en algunas hojas, luego en casi todo el follaje. El área afectada está delineada por un estrecho halo clorótico que se vuelve especialmente claro en otoño. Se presenta defoliación prematura y malformación en hojas nuevas. Los frutos crecen anormalmente, los tallos pueden mostrar decoloración interna y externa, en algunos casos ocurre una muerte regresiva y crecimiento anormal, terminando eventualmente en la muerte del hospedero (Janse y Obradovic, 2010).

Rango de Hospederos

X. fastidiosa tiene como hospederos a 359 plantas de 204 géneros de 75 diferentes familias botánicas, entre los que destacan especies frutales tales como higuera, cítricos, vid, almendro, cerezo y arándano; forestales como arce, acacia, eucalipto, roble y ginkgo; plantas ornamentales como laurel de flor, hibisco, mirto y plantas tipo herbáceas tales como avena, girasol, coles, grama, hiedra, raigrás, malva, ortiga, romero, etc. (EFSA, 2016).

Subespecies Reconocidas de *X. fastidiosa*

El género *Xylella* solo incluye a la especie *fastidiosa* y agrupa a cuatro subespecies actualmente reconocidas: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* y *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (Cuadro 1) (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Distribución geográfica y hospederos importantes de las subespecies de *X. fastidiosa*.

Subespecies	Distribución geográfica	Hospederos susceptibles de importancia
<i>fastidiosa</i>	Centro - Norte América, Taiwán	Vid, cítricos, café, almendro
<i>pauca</i>	Brasil, Paraguay, Argentina	Cítricos, café
<i>multiplex</i>	Estados Unidos, Brasil	Almendro, durazno, ciruelo, roble, mora azul, nogal
<i>sandyi</i>	Estados Unidos	Laurel de flor

Distribución Geográfica Mundial

X. fastidiosa se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial como se observa en la Figura 1 y causa diversas enfermedades en:

Asia: China, Taiwán India, Turquía.

Europa: Francia, Italia, Serbia y Monte Negro.

África: Marruecos.

América del Norte: Estados Unidos (28 estados), Canadá y México.

Centroamérica: Costa Rica.

Sudamérica: Argentina, Brasil, Paraguay, Venezuela. (CABI, 2011)

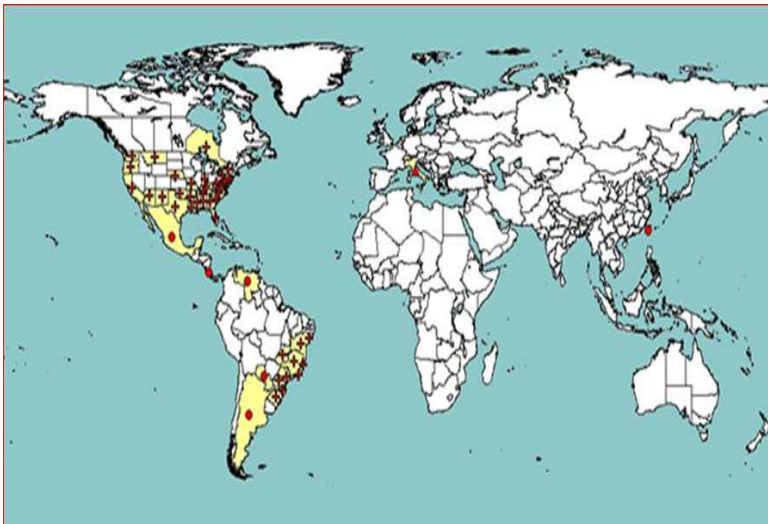


Figura 1. Mapa de la distribución mundial de *X. fastidiosa* (EPPO).

Distribución Geográfica en México

Según informes oficiales de SENASICA (2016) se han detectado brotes de la enfermedad de Pierce en los municipios de Ensenada, Baja California, Parras De La Fuente, Coahuila y en Ezequiel Montes, Querétaro (Figura 2).

Impacto Económico de *Xylella fastidiosa*

Enfermedad de Pierce

X. fastidiosa subsp. *fastidiosa* es endémica de California, Estados Unidos (Alston *et al.*, 2012). La enfermedad fue descrita por primera vez en 1892 al sur de California donde fue responsable de la destrucción de una extensa área de viñedos (Golino, 1993).



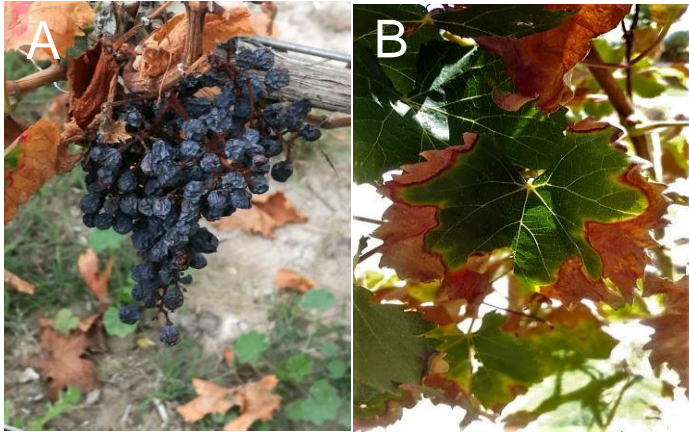
Figura 2. Distribución nacional de la enfermedad de Pierce causada por *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*

En el Valle Central de California, se observó la enfermedad en 1917 y de 1933 a 1940 una epidemia devastó muchos distritos. En 1997 se detectó en Temecula, California en EUA (Guevara, 2000).

En México, la enfermedad de Pierce se detectó en 1980 en viñedos de Baja California Norte y en 1995 se encontró afectando viñedos en el Valle de Guadalupe, Municipio de Ensenada, Baja California. Actualmente, se encuentra presente y confinada en plantaciones de vid en los Municipios de Ensenada, Baja California, Parras de la Fuente, Coahuila y en Ezequiel Montes, Querétaro (SAGARPA-SENASICA, 2016).

Síntomas

Los primeros síntomas son el secado repentino de los márgenes de las hojas, estas partes se vuelven marrones necróticas y los tejidos circundantes



adquieren una coloración amarillo-rojiza (Figura 3 B). Las hojas quemadas generalmente caen desde el extremo distal basal y no desde el pecíolo (Figura 3 C), dejando los pecíolos desnudos pegados a las ramas. La enfermedad de Pierce, puede confundirse con otros trastornos tales como toxicidad por sal, o por deficiencia de boro, cobre o fósforo. En etapas posteriores, se observa defoliación, brotes pequeños, momificación de los frutos (Figura 3 A), reducción y atrofia de crecimiento de la planta, baja producción y finalmente la muerte (Janse y Obradovick, 2010).

Clorosis Variegada de los Cítricos

La clorosis variegada de los cítricos (CVC) causada por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ha ocasionado pérdidas importantes en Brasil y en el distrito de Misiones, Argentina, actualmente representa un riesgo latente para la citricultura en Sudamérica (CABI, 2012). Se ha descrito como la enfermedad más destructiva de la naranja dulce. En Brasil, su rápida dispersión, ha hecho que se vean afectados 1.8 millones de árboles (EPPO/CABI, 2009).



Figura 3. Síntomas de la enfermedad de Pierce en vid. A) Frutos momificados. B) Hoja con quemadura en el margen. C) Defoliación con peciolo desnudos.

La rápida dispersión de esta enfermedad a través de los huertos y el gran daño que causa, tienen como resultado pérdidas económicas de aproximadamente 150 millones de dólares al año para los productores e industria de jugos en el Estado de São Paulo, que es la región citrícola más importante de Brasil (Amaro *et al.*, 1998). Los últimos estudios acerca de la diseminación de CVC en el estado de São Paulo, muestran que la proporción de plantas infectadas aumentó de 22 % en 1996 a 43 % en 2005 (Caruso *et al.*, 2007; Fundecitrus, 2009).

Síntomas

Los síntomas de la CVC comienzan por una clorosis parecida a una deficiencia nutricional de zinc que suele ocurrir en las ramas terminales. Las hojas presentan lesiones gomosas y abultadas en el envés, mientras que en el haz hay presencia de clorosis. Cuando la enfermedad se extiende, las hojas nuevas son de menor tamaño y presentan una curvatura hacia arriba y se produce una marchitez en ramas; los frutos reducen su tamaño notablemente y su cascara se endurece (Figura 4). El árbol una vez infectado con el patógeno se vuelve improductivo al cabo de tres años y el crecimiento se reduce considerablemente. Los árboles jóvenes son más susceptibles, respecto a los árboles con edades mayores a diez años. Los

síntomas se manifiestan con mayor intensidad e incidencia en los climas cálidos (FAO, 2003; EPPO/CABI, 2009).

Crespera del café

X. fastidiosa se detectó por primera vez en plantas de café mediante pruebas ELISA y PCR en São José do Rio Preto, São Paulo en 1995 y se demostró que era el agente causal de la crespera de las hojas de café (coffee leaf scorch, por sus siglas en inglés CLS) (Lima *et al.*, 1998). La enfermedad se ha encontrado en todas las áreas productoras de café de Brasil (Matiello *et al.*, 1998). Su importancia económica no ha sido cuantificada en general, pero en São José Do Rio Preto, Estado de São Paulo, la enfermedad redujo la producción de café en un 30% en algunas plantaciones (Prato, 2000).

Síntomas

Los síntomas en las plantas de café incluyen entrenudos cortos, pérdida prematura de hojas viejas, hojas deformadas amarillas, quemadura apical y marginal de la hoja; reducción de tamaño y cantidad de fruta y retraso general del crecimiento (Figura 5) (Lima *et al.*, 1998; Paradela *et. al.*, 1995; Prato, 2000).

Síndrome de decaimiento súbito del olivo

Xylella fastidiosa ha sido recientemente identificada en Apulia Provincia de Lecce (suroriente de Italia) en árboles de olivo afectados por una enfermedad devastadora denotada como síndrome de decaimiento súbito del olivo (olive quick decline síndrome por sus siglas en inglés OQDS), que apareció repentinamente en 2010 (Loconsole *et. al.*, 2014). Un brote importante que se expandió desde el primer foco, inicialmente estimado en 8,000 ha, se extendió hasta 23,000 ha después de unos pocos meses. La situación empeoró a partir de marzo de 2015, con el surgimiento de un sinnúmero de pequeños brotes, principalmente en el centro y sur de la Provincia de Lecce, además de un pequeño brote a 30 km de la provincia vecina de Brindisi (Loconsole *et al.*, 2014).

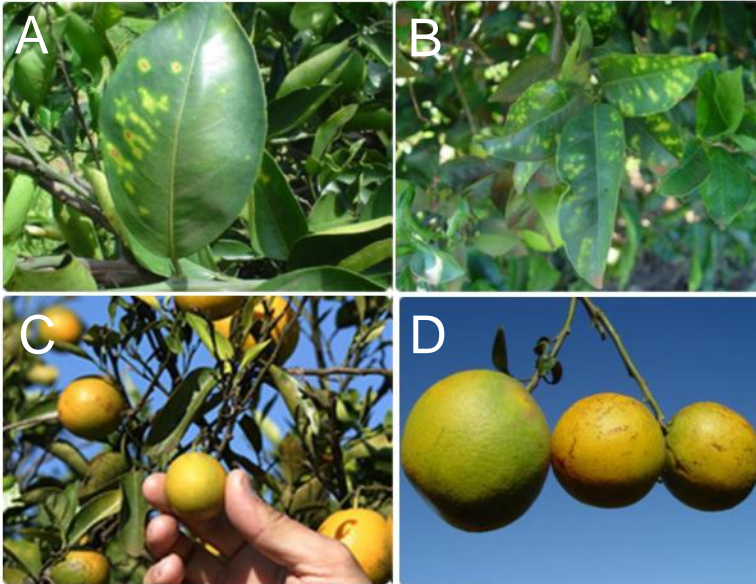


Figura 4. Síntomas característicos de la CVC. A) y B), hojas con clorosis parcial, C) y D), frutos pequeños con cáscara endurecida (FUNDECITRUS, 2009).

Síntomas

Los árboles infectados con el OQDS inicialmente muestran la desecación del dosel, seguida por el colapso del árbol. Los olivos centenarios parecen ser más gravemente afectados (Figura 6).

Propagación

La única manera de que *X. fastidiosa* se propague naturalmente, es mediante insectos vectores, principalmente chicharritas (cicadelidae) y salivazos (cercopidae). La transmisión es muy rápida debido a que no hay periodo de latencia para su transmisión. La bacteria no es trans-ovarial ni trans-estadial, se alimenta y se reproduce en la parte anterior del cuerpo de los insectos adultos, los cuales pueden permanecer infectivos a lo largo de toda su vida (Almeida *et al.*, 2005).



Figura 5. Síntomas de la quemadura de la hoja de café (CLS).

El proceso de dispersión de esta enfermedad inicia cuando las chicharritas se alimentan de una planta enferma para posteriormente alimentarse de una sana e infectarla. Debido a que estos cicadélidos poseen aparato bucal picador-chupador y se alimentan del fluido que corre a través del xilema, los adultos y ninfas pueden adquirir la bacteria después de alimentarse de tejidos suculentos en plantas enfermas, la savia con la bacteria es absorbida y retenida en el intestino para finalmente ser transportada al esófago del insecto donde se multiplica y forma una cápsula de protección (Gould y Lashomb, 2007).

Debido a la mala calidad nutricional de fluido del xilema, los insectos que se alimentan de él, ingieren grandes cantidades de savia bruta y producen grandes cantidades de secreciones líquidas. En general, no se consideran plaga, a menos que existan poblaciones muy altas.

Dentro del suborden Cicadomorpha se incluyen tres familias que se alimentan del fluido del xilema; de las tres familias que se encuentran en este suborden (Cercopidae, Cicadidae, Cicadellidae), solamente los insectos de la familia Cicadellidae de la subfamilia Cicadellinae, se consideran como los verdaderos chupadores de fluido de xilema (Almeida *et al.*, 2005).

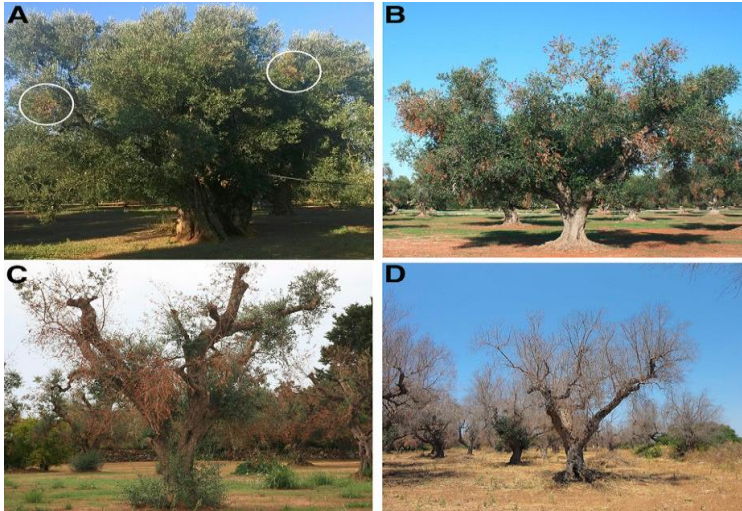


Figura 6. Escala de síntomas en los olivos en el sur de Italia asociados con *X. fastidiosa*. A), Los primeros síntomas se limitan a las ramas aisladas, probablemente debido a una infección independiente. B), Mayor número de ramas sintomáticas, lo que conduce a C), plantas muy sintomáticas con poda severa utilizada como una práctica cultural sin éxito para eliminar las infecciones. D), Árboles muertos (Almeida R., L. Nunney, 2015).

Los mecanismos específicos que conducen a la enfermedad siguen siendo poco conocidos, pero estudios recientes que abordan esta cuestión desde una perspectiva de planta huésped sugieren que el desarrollo de los síntomas, inicialmente consecuencia de las respuestas fisiológicas iniciados por respuestas de déficit de agua (Choi *et al.*, 2013).

Dado que hay miles de potenciales especies de insectos vectores en todo el mundo, el estudio del potencial y eficiencia de transmisión del patógeno es parte importante de la evaluación del riesgo de plagas dentro de una región geográfica particular.

Díaz (2003) menciona que en la costa de Ensenada, Baja California Norte principal zona productora de vinos en México, se han encontrado los siguientes vectores: chicharrita cabeza roja (*Carneocephala fulgida*), chicharrita verde (*Draeculacephala minerva*), chicharrita verde-azulada (*Graphocephala atropunctata*), además de *Homoladisca lacerta* y *Homoladisca vitripennis*.

Vectores en América

Los principales vectores de *X. fastidiosa* en América son los insectos conocidos como chicharritas o cicadélidos, de los cuales hay dos tribus de importancia las cuales son:

Familia: Cicadellidae, Subfamilia: Cicadellinae, Tribu: Cicadellini

Amphigonalia severini (DeLong)
Bucephalogonia xantophis (Berg)
Dilobopterus costalimai Young
Draeculacephala californica D. y F.
Draeculacephala crassicornis Van Duzee
Draeculacephala minerva Ball
Draeculacephala noveboracensis (Fitch)
Ferrariana trivittata (Signoret)
Graphocephala atropunctata (Signoret)
Graphocephala confluens (Uhler)
Graphocephala cythura (Baker)
Graphocephala hieroglyphica (Say)
Graphocephala versuta (Say)
Helochara delta Oman
Macugonalia leucomelas (Walker)
Paragonia confusa Oman
Paragonia furcata Oman
Paragonia tredecimpunctata Ball
Paragonia triundata Ball
Plesiommata corniculata Young
Parathona gratioa (Blanchard)
Sonesimia grossa (Signoret)
Xyphon flaviceps (Riley)
Xyphon fulgida Nottingham
Xyphon triguttana Nottingham

Familia: Cicadellidae, Subfamilia: Cicadellinae, Tribu: Proconiini

Acrogonia citrina Marucci y Cavichioli
Acrogonia virescens (Metcalf)
Cuerna costalis (F).
Cuerna occidentalis (Oman and Beamer)
Cuerna yuccae (Oman and Beamer)
Friscanus friscanus (Ball)
Homalodisca vitripennis (=coagulata) (Germar)
Homalodisca ignorata Melichar
Homalodisca insolita (Walker)
Homalodisca liturata Ball
Oncometopia facialis (Signoret)
Oncometopia nigricans (Walker)
Oncometopia orbona (F)
Aphrophora permutata (Uhler)
Philaenus leucophthalmus (L.)

Philaenus spumarius (L.)}

Vectores Potenciales en Europa

En Europa, se conocen cuatro tribus de la subfamilia Cicadellinae de la familia Cicadellidae y dos familias de la superfamilia Cercopoidea con potenciales insectos vectores las cuales son:

Familia: Cicadellidae, Subfamilia: Cicadellinae, Tribu: Cicadellini

Cicadella lasiocarpae Ossiannilsson

Cicadella viridis (L).

Graphocephala fennahi Young

Familia: Cicadellidae, Subfamilia: Cicadellinae, Tribu: Evacanthini

Evacanthus acuminatus (Fabricius)

Evacanthus interruptus (Linnaeus)

Evacanthus rostagnoi (Picco)

Familia: Cicadellidae, Subfamilia: Cicadellinae, Tribu:

Anoterostemmatini

Anoterostemma ivanoffi (Lethierry)

Familia: Cicadellidae, Subfamilia: Cicadellinae, Tribu: Errhomenini

Errhomenus brachypterus Fieber

Superfamilia: Cercopoidea, Familia: Aphrophoridae

Aphrophora alni (Fallen)

Aphrophora corticea (Germar)

Aphrophora major Uhler

Aphrophora pectoralis Matsumura

Aphrophora salicina (Goeze)

Aphrophora similis Lethierry

Aphrophora willemsi Lallemand

Lepyronia coleoptrata (Linnaeus)

Neophilaenus albipennis (Fabricius)

Neophilaenus campestris (Fallen)

Neophilaenus exclamationis (Thunberg)

Neophilaenus infumatus (Haupt)

Neophilaenus limpidus (Wagner)

Neophilaenus lineatus (Linnaeus)

Neophilaenus longiceps (Puton)

Neophilaenus minor (Kirschbaum)

Neophilaenus modestus (Haupt)

Neophilaenus pallidus (Haupt)

Paraphilaenus notatus (Mulsant y Rey)

Peuceptyelus coriaceus (Fallen)

Philaenus italosignus (Drosopoulos y Remane)

Philaenus lukasi (Drosopoulos y Asche)

Philaenus maghresignus Drosopoulos y Remane

Philaenus signatus Melichar

Philaenus spumarius (L).

Philaenus tarifa (Remane y Drosopoulos)
Philaenus tessellatus (Melichar)
Superfamilia: Cercopoidea, Familia: Cercopidae
Cercopis arcuata (Fieber)
Cercopis intermedia Kirschbaum
Cercopis sabaudiana Lallemand
Cercopis sanguinolenta (Scopoli)
Cercopis vulnerata Rossi
Haematoloma dorsata (Ahrens)

EFSA,

2013.

Estrategias de Control

Control físico

La planta infectada debe arrancarse desde la raíz, solo cuando se compruebe mediante pruebas de laboratorio que está infectada (DGSV–CNRF, 2011).



Figura 7. Principales vectores de la enfermedad de Pierce en México. A) *Carneoecephala fulgida*; B) *Draeculacephala minerva*; C) *Graphocephala atropunctata*; D) *Homalodisca vitripennis*. Fuente: A) y B) Clark, University of California, s/a; C) Peter y Bryant, s/a; D) Wild, s/a.

Control biológico

De manera natural existen cepas bacterianas de *X. fastidiosa* que son benéficas para la vid, bajo este hecho Hopkins (2005), realizó un estudio para evaluar cepas avirulentas de *X. fastidiosa* en el control de la enfermedad de Pierce, éstas se inocularon de manera directa en los entrenudos de plantas enfermas, las cepas Syc 86-1 y EB 92-1 resultaron efectivas en el control de la enfermedad al reducir el desarrollo de síntomas.

Por otra parte Tryapitsyn y Phillips (2000), reportan que *Gonatocerus trigottatus* (Hymenoptera: Mymaridae) es un parasitoide de huevecillos de *H. vitripennis*, que en condiciones naturales puede llegar a parasitar el 80% de estos

Control legal

X. fastidiosa actualmente se encuentra presente en México en el estado de Baja California, específicamente en la zona vitícola del Valle de Guadalupe, Parras en el Estado de Coahuila y en Ezequiel Montes, Querétaro. La regulación para esta bacteria está establecida en la NOM-006-FITO-1995, la cual indica que los sarmientos de vid (*Vitis vinífera*) y plántulas de chabacano (*Prunus americana*) provenientes de EUA deberán estar libres de *X. fastidiosa* y se debe dar un tratamiento adicional. Debido a que *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, representa una amenaza económica para México, se realizan actividades de vigilancia epidemiológica fitosanitaria, a través de áreas de exploración, rutas de trapeo (para insectos vectores) y parcelas centinela, en cuatro estados del país, para evitar su dispersión a regiones del mismo estado donde aún no se tiene registro de ella, los cuales son productores importantes de vid. En agosto del 2011, se detectaron plantas de vid con síntomas similares a la enfermedad de Pierce en el Municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, las cuales resultaron positivas a la enfermedad. Por lo anterior y de acuerdo a lo establecido en la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) No. 8, Determination of pest status in an area (IPPC, 2011) el estatus de *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en México es Presente: sólo en algunas áreas sembradas con cultivos hospedantes, sujeta a control oficial y de acuerdo con la NIMF No. 5 del glosario de términos fitosanitarios cumple con la definición de plaga cuarentenaria, ya que puede potencialmente causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes y se encuentra bajo control oficial en el país (IPPC, 2013)

Control químico

El antibiótico oxitetraciclina es considerado como control químico, se inyecta de manera directa al tronco, sarmientos o raíz de vides enfermas; sin embargo, sólo provee un control temporal (Gonzales, 2004; Gould y Lashomb, 2007).

Control genético

Se han desarrollado variedades resistentes a *X. fastidiosa* tales como: Blancdu Bois, Black Spanish o Le Noir, Champanel (McEachern *et al.*, 1997).

Métodos de Diagnóstico

Medios de cultivo

X. fastidiosa subsp. *fastidiosa*, ha sido localizada en el xilema de diversos árboles y se ha reportado que puede cultivarse en medios artificiales de crecimiento, dependiendo del tipo de raza o aislamiento, como PD3, PW, BCYE y CS-20 (Hopkins y Adlerz, 1988).

El medio usado con más frecuencia es el Periwinkle (PW), en este se observan colonias circulares con márgenes enteros, convexos, blanco opalescente, que alcanza 0.7-1.0 mm de diámetro después de incubarse durante dos a tres semanas. El aislamiento se puede realizar fijando la savia extraída de peciolo (después de la esterilización superficial) en los medios; otra técnica es colocar trozos de tejido vascular infectado en medio líquido PW, se agita y posteriormente se vacía en medio de agar. El aislamiento en insectos comienza por la esterilización superficial del cuerpo del insecto, disección de la cabeza que se homogeneiza en buffer PBS estéril, la suspensión se vacía sobre los medios. Las placas deben mantenerse boca abajo y deben sellarse con parafilm; los medios deben ser verificados hasta un mes después del aislamiento para poder observar el típico crecimiento colonial (Schaad *et al.*, 2001).

Pruebas por ELISA

La técnica ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas') es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo. La aparición de

colorantes permite medir mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra (Navarrete, 2015).

Hernández y Ochoa (1997) señalan que la prueba serológica ELISA, es una de las más difundidas y utilizadas para diagnosticar *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en tejidos de plantas, es de utilidad en vid, durazno, ciruelo, cítricos y plantas ornamentales (Ortega, 1986; Garnsey y Cambra, 1991; Jiménez, 1985; Hopkins y Adlerz, 1988; Hopkins y Mollenhauer, 1973; Hopkins *et al.*, 1991; Hartman *et al.*, 1992).

Pruebas por PCR

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), emplea “primers” diseñados para la detección de *X. fastidiosa* por lo que es considerada la más efectiva en comparación a otras técnicas de inmunodetección, como ELISA, debido a que la PCR es un método más rápido, eficiente y sensitivo. Para detectar *X. fastidiosa* mediante pruebas de PCR se han usado tres juegos de primers específicos: para las cepas aisladas de vid, se pueden usar los primers RST (Minesavage *et al.*, 1994); de igual forma, pueden usarse los primers XF (Cuadro 2) (Firrao y Bazzi, 1994). Una prueba de PCR *multiplex* fue desarrollada por Rodríguez *et al.* (2003) para la detección de todas las subespecies de *X. fastidiosa*, tanto en tejido vegetal como en insectos, usando primers contra los genes de *X. fastidiosa* rRNA girasa b y 16S (Cuadro 3). Otra técnica PCR *multiplex* fue desarrollada por Hernández-Martínez (2006) con los primers ALM1 y ALM2 producen un fragmento de 521 pb de cepas aisladas de plantas de almendro que pertenecen a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*. La técnica PCR en tiempo real fue desarrollada por Oliveira *et al.* (2002) usando primers para identificar cepas aisladas de cítricos (Cuadro 4).

Cuadro 2. Primers utilizados en el protocolo PCR para la detección de *X. fastidiosa*.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
RST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCTGA	Minesavage <i>et al.</i> , 1994
RST33	CACCATTTCGTATCCCGGTG	Minesavage <i>et al.</i> , 1994

XF1-F	CAGCACATTGGTAGTAATAC	Firrao y Bazzi, 1994
XF6-R	ACTAGGTATTAACCAATTGC	Firrao y Bazzi, 1994

Cuadro 3. Primers para el Gen 16S rRNA utilizados en la PCR multiplex.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
UP2RS	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC
FXYgyr499	CAGTTAGGGGTGTCAGCG
RXYgyr907	CTCAATGTAATTACCCAAGGT
S-S-X.fas-0067-a-S-19	CGGCAGCACATTGGTAGTA
S-S-X.fas-0838-a-S-21	GCAAATTGGCACTCAGTATCG
S-S-X.fas-0838-a-A-21	CGATACTGAGTGCCAATT TGC
S-S-X.fas-1439-a-A-19	CTCCTCGCGGTTAAGCTA C

Cuadro 4. Primers para la detección de *X. fastidiosa* en cítricos

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
CVC-1	AGATGAAAACAATCATGC AAA	424-404
CCSM-1	GCGCATGCCAAGTCC ATATTT	306-286

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" y la colecta de material vegetal e insectos se efectuó en diferentes predios del municipio de Parras de la Fuente, Coahuila, durante el periodo enero- junio del 2016.

Colecta de Material Vegetal

La colecta de material vegetal se realizó en cultivos, zacates anuales y malezas adyacentes a viñedos de la región de Parras de la Fuente Coahuila durante la fase vegetativa de los cultivos en 2016, tomando en primera instancia hojas de plantas que presentaban síntomas parecidos a la enfermedad de Pierce de la vid y hojas asintomáticas donde se observó a los posibles vectores. En base a lo anterior, se colectaron muestras de 22 especies de plantas diferentes las cuales fueron: vid silvestre (*Vitis* sp.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), rosal (*Rosa* sp.), peral (*Pyrus communis*), durazno (*Prunus domestica*), persimonia (*Diospyros kaki*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), palma china (*Yucca filifera*), nogal (*Carya illinoensis*), vid (*Vitis vinifera*), trueno (*Ligustrum japonicum*), olivo (*Olea europea*), azucena (*Lilium candidum*), zacate Johnson (*Sorghum alepense*), chabacano (*Prunus armeniaca*), mandarina (*Citrus reticulata*), buganvilia (*Bougainvillea* sp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus carica*) y fresno (*Fraxinus* sp.). Entre las especies de colectadas, se consideraron hojas de diferentes plantas de fresno, chabacano y vid en distintos puntos, los cuales se mencionan a continuación: vid 1: colectada en un viñedo comercial, vid 2: colectada en el área circundante a un viñedo comercial chabacano 1, chabacano 2, chabacano 3: colectados en un huerto circundante a un viñedo

comercial; fresno 1: colectado en el área circundante a un viñedo comercial, fresno 2, fresno 3 y fresno 4 colectados en un huerto circundante a un viñedo comercial (huerto donde se colectaron los chabacanos). Todas las muestras se colocaron individualmente en bolsas plásticas, se marcaron con el nombre común de la planta, la fecha de colecta, la geo referencia y se mantuvieron en refrigeración en hieleras con gel refrigerante. Fueron transportadas al laboratorio de Fitopatología de la universidad, donde se conservaron a 4-5 °C en un refrigerador hasta que se realizaron las pruebas de PCR.

Colecta de Insectos

La colecta de insectos se hizo en los mismos predios al tiempo en que se colectó el material vegetal. Se utilizó una red entomológica de golpeo, efectuando 500 redasos a lo largo de la maleza, mientras que en los arbustos, árboles frutales, forestales perennes y caducifolios, la colecta fue manual. Los insectos se depositaron en frascos con alcohol etílico al 70% los cuales se etiquetaron señalando si se colecto de maleza o cultivo, la fecha de colecta y la geo referencia.

Identificación de Cicadélidos

La separación de los cicadélidos de los demás insectos colectados se realizó en el laboratorio con ayuda del microscopio estereoscopio. Se tomaron en cuenta las características típicas de los cicadélidos como las espinas de tibia del tercer par de patas, el escutelo, la forma de la cabeza, etcétera. Posteriormente, los cicadélidos se separaron en grupos que compartían semejanza entre sí, se identificaron a nivel género y especie con la ayuda de las claves taxonómicas y mediante extracción de genitalia (Young, 1958).

Detección de *Xylella fastidiosa* en Plantas e Insectos por PCR

Extracción de ADN vegetal y de insectos

De cada muestra vegetal se tomaron de 50 a 100 mg de tejido y en el caso de insectos, se consideró al espécimen completo. De las plantas se seleccionaron las nervaduras principales y el peciolo de cada hoja, se colocaron en un mortero y se agregaron 300 µl de buffer de extracción CTAB y se maceraron con ayuda de un pistilo; una vez macerado el contenido de cada muestra se colocó en un tubo estéril; se agregó 1000 µl de CTAB más 100 µl de NaCl 5M, después se agitó en el vortex durante 30 seg; una vez agitado, se incubó en baño maría a una temperatura de 90 a 95 °C por 90 min; pasado el tiempo de incubación, se dejó enfriar a temperatura ambiente, para después centrifugar a 12,000 rpm por 1 min; se recuperó en un tubo estéril de 700 a 900 µl de sobrenadante de cada muestra con ayuda de una micropipeta, teniendo especial cuidado de no tocar la capa de tejido. Posteriormente se agregó a cada tubo 500 µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron por inversión durante 10 min; enseguida, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se tomaron 700 µl de la fase superior, se retransfirieron a un tubo estéril y se agregó isopropanol (previamente frío a -20°C), se mezclaron por inversión durante 5 minutos y se incubaron toda la noche a -20 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm 15 min, las muestras se decantaron teniendo cuidado de no perder la pastilla que se formó en el fondo de los tubos, se procedió a lavar cada pastilla con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, después se dejaron secar las pastillas colocando los tubos invertidos sobre papel absorbente y se re suspendieron en 100 µl de agua estéril libre de nucleasas. Posteriormente se cuantificó el ADN obtenido se agregaron 5 µl de cada muestra en un NANODROP.

PCR en plantas e insectos

Para la detección de *X. fastidiosa* pueden ser empleados los primers RST (Janse y Obradovic, 2010). En nuestro caso se utilizaron los primers específicos RST31 (5'-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCTGA-3') y RST33 (3'-CACCATTCGTATCCCGGTG-5') (Minesavage *et al.*, 1994). Para reacción de PCR, se añadió 2.5 µl de ADN de cada muestra (insecto o planta) a 2.5 ml de Buffer de PCR 10X, 1 µl MgCl₂ 50 mM, 0.5 DNTP's 10 mM, 2 µl de los

primers específicos RST31 y RST33, 0.5 µl de *Taq* polimerasa 5U/ µl y 14.5 µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 25 µl. La amplificación fue realizada usando 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60 °C, 45 seg 72 °C y un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Como control positivo se utilizó una muestra de vid previamente confirmada como positiva para *X. fastidiosa* y para el control negativo se utilizó agua destilada. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñó usando bromuro de etidio. Para comparar el tamaño de banda obtenido, se utilizó un marcador molecular de 100 pb.

PCR para *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en chabacano y fresno

Las muestras de chabacano y fresno que resultaron positivas para *X. fastidiosa* se analizaron nuevamente por PCR para la identificación de subespecie. Para la reacción de PCR se utilizaron los primers específicos para la subespecie *multiplex* XF1968-L (5'-GGAGGTTTACCGAAGACAGAT-3') y XF1968-R (5'-ATCCACAGTAAAACCATGC-3'), ALM1 (5'-CTGCAGAAAT TGGAACTTCAG-3') y ALM2 (5'-GCCACACGTGATCTATGAA-3') (Hernández-Martínez *et al.*, 2006). Para la reacción de PCR, se añadió 2.5 µl de ADN de cada muestra (insecto o planta) a 2.5 ml de Buffer de PCR 10X, 1 µl MgCl₂ 50 mM, 0.5 DNTP's 10 mM, 2 µl de los primers XF1968-L/ XF1968-R y ALM1/ ALM2, 0.5 µl de *Taq* polimerasa 5U/ µl y 14.5 µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 25 µl. La amplificación fue realizada usando 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C y la extensión final de un ciclo de 10 minutos a 72 °C. Como control positivo se utilizó una muestra de vid previamente confirmada como positiva para *X. fastidiosa* y para el control negativo se utilizó agua destilada.

Secuenciación de *Xylella fastidiosa* Subespecie *multiplex*

Los productos de PCR obtenidos con los primers específicos para subespecie antes nombrados, se secuenciaron y las secuencias obtenidas se compararon con la base de nucleótidos depositadas en el Gen Bank. Para su alineación se utilizó el paquete BLAST

Identificación Molecular de *Homalodisca vitripennis*

La identificación molecular y la secuenciación de *Homalodisca vitripennis*, se realizó en colaboración con los laboratorios de bacteriología y biología molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF-SENASICA) en Tecámac, Estado de México.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *Xylella fastidiosa* en Plantas mediante PCR

En total se analizaron 22 especies de plantas con síntomas similares a la enfermedad de Pierce en vid. Los resultados obtenidos mediante las pruebas de PCR con los primers específicos RST31 y RST33, indican la presencia de *X. fastidiosa* en las muestras de chabacano 1, chabacano 2 y chabacano 3 (*Prunus armeniaca*), los cuales presentaban quemaduras en los márgenes de las hojas, un halo clorótico, entrenudos cortos y muerte lateral descendente (Figura 8); en vid 1 (*Vitis vinífera*) que presentaba síntomas característicos de la enfermedad de Pierce como márgenes de la hoja quemados, presencia de un halo clorótico, tejido circundante al halo de color rojo, crecimiento lento y momificación de frutos (Figura 9); en la muestra de vid silvestre (*Vitis* sp.) que presentó síntomas irregulares de quemadura de la hoja y un halo clorótico intermitente (Figura 10); en la muestra de fresno 1 (*Fraxinus* sp.) que presentó quemaduras en el ápice de la hoja, en la muestra de fresno 2, que presentaba quemadura en gran parte de la zona apical de la hoja seguido de un halo clorótico (Figura 11). En el resto de las especies de plantas analizadas, no se detectó la presencia de *X. fastidiosa* (Cuadro 5).

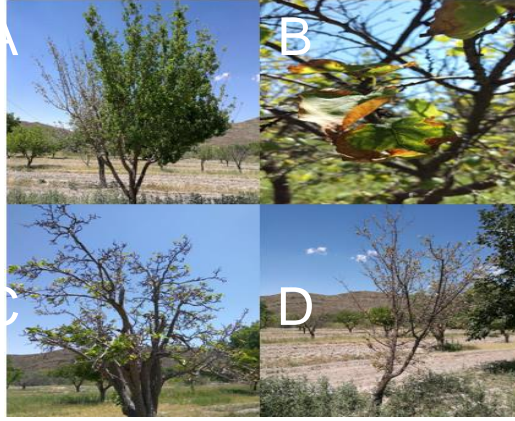


Figura 8. Síntomas presentes en chabacano muestra 1,2 y 3. A) Muerte lateral descendente B) Quemadura en los márgenes de la hoja C) entrenudos cortos y crecimiento lento D) Muerte total de la planta.



Figura 9. Síntomas presentes en vid muestra1. A) Hoja con quemadura en los márgenes con presencia de un halo clorótico tejido circundante rojizo. B) Frutos momificados con el racimo adherido a la planta.



Figura 10. Síntomas presentes en la planta de vid silvestre analizada. La quemadura comienza en la parte apical de la hoja la cual se extiende a toda la hoja de forma concéntrica y la aparición de un halo necrótico.



Figura 11. Síntomas presentes en los árboles de fresno analizados. A) Fresno 1. Hojas con quemadura en estado avanzado. B) Fresno 2. Hojas con quemadura en el ápice con presencia de un halo necrótico.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas de PCR en plantas para la detección de *Xylella fastidiosa*.

Planta	Nombre Científico	Resultado PCR (primers RST31/ RST33)
Vid silvestre	<i>Vitis</i> sp.	Positivo
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i> sp.	Negativo
Rosal	<i>Rosa</i> sp.	Negativo
Peral	<i>Pyrus communis</i>	Negativo
Durazno	<i>Prunus domestica</i>	Negativo
Persimonio	<i>Diospyrus kaki</i>	Negativo
Clavel	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Negativo
Palma china	<i>Yucca filifera</i>	Negativo
Nogal	<i>Carya illinoensis</i>	Negativo
Vid 1	<i>Vitis vinifera</i>	Positivo
Vid 2	<i>Vitis vinifera</i>	Negativo
Mirto	<i>Myrtus</i> sp.	Negativo
Cedro	<i>Cedrela</i> sp.	Negativo
Trueno	<i>Ligustrum japonicum</i>	Negativo
Olivo	<i>Olea europea</i>	Negativo
Azucena	<i>Lilium candidum</i>	Negativo
Zacate Johnson	<i>Sorghum alepense</i>	Negativo
Chabacano	<i>Prunus armeniaca</i>	Positivo
Chabacano	<i>Prunus armeniaca</i>	Positivo
Chabacano	<i>Prunus armeniaca</i>	Positivo
Mandarino	<i>Citrus reticulata</i>	Negativo
Buganvilla	<i>Bougainvillea</i> sp.	Negativo
Aguacate	<i>Persea americana</i>	Negativo
Higo	<i>Ficus carica</i>	Negativo
Fresno 1	<i>Fraxynus</i> sp.	Positivo
Fresno 2	<i>Fraxynus</i> sp.	Positivo
Fresno 3	<i>Fraxynus</i> sp.	Negativo
Fresno 4	<i>Fraxynus</i> sp.	Negativo

Los primers RST31 y RST33 utilizados en esta investigación fueron desarrollados por Minesavaje (1994) para detectar *X. fastidiosa* en plantas de vid establecidas bajo condiciones de invernadero, e inoculadas con cepas de *X. fastidiosa* aisladas de plantas de vid naturalmente infectadas. Dicho autor, comparó los primers antes mencionados (RST31/RST33) con los primers RST29, RST30 y RST32, señalando que los únicos primers capaces de identificar a *X. fastidiosa* en plantas de vid con síntomas de la enfermedad de Pierce fueron RST31 y RST33 que amplifican a 733 pb tal como se obtuvo en esta investigación (Figura 12).

De igual modo, Amanifar *et al.* (2014) utilizaron los primers RST31 y RST33 para determinar si el crecimiento colonial que obtuvieron a partir de diluciones de tejido de peciolos macerados de hojas de vid cultivadas en medio PD3 correspondían a *X. fastidiosa*, las pruebas de PCR resultaron positivas para *X. fastidiosa* y esto lo confirmaron realizando otra PCR con los primers específicos Dixon454fa / Dixon1261rg obteniendo nuevamente resultados positivos; asimismo, la comparación de la secuencia que obtuvieron con la base de datos del Gen Bank arrojó un porcentaje de similitud del 99% con *X. fastidiosa*.

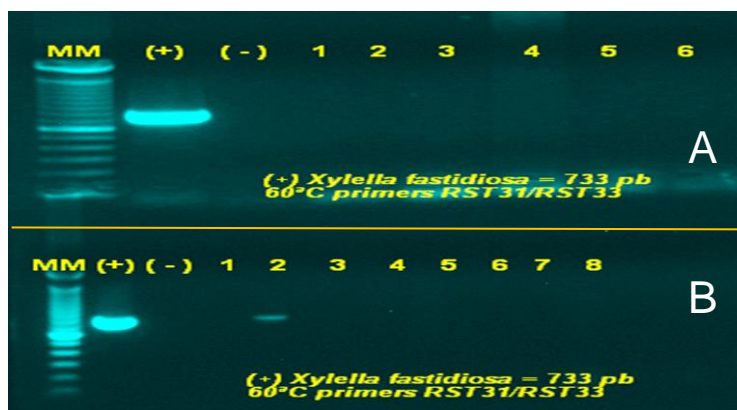


Figura 12. Resultados de las pruebas de PCR en plantas. A) Primers RST31/RST33 1. Rosal, 2. Vid 2, 3. Mirto, 4. Bouganvilia, 5. Cedro, 6. Trueno B) Primers RST31/RST33 1. Azucena, 2. Chabacano 1, 3. Mandarino, 4. Olivo, 5. Zacate Johnson, 6. Higo, 7. Aguacate.

Detección de *Xylella fastidiosa* Subsp. *multiplex*

Las muestras correspondientes a chabacano 1, chabacano 2 y fresno 1 analizadas mediante la prueba de PCR multiprimers considerando los pares de primers XF1968-L / XF1968 y ALM1 / ALM2 específicos para *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* fueron positivas ya que se obtuvieron bandas de 638 y 521 pb respectivamente (Figura 13) (Cuadro 6). De los productos de PCR se obtuvo la secuencia, misma que se comparó con la base de datos del Gen Bank mediante BLAST obteniendo un porcentaje de coincidencia de 34 %.

La prueba de PCR multiprimers con los pares de primers: XF1968-L / XF1968-R, XF2542-L / XF2542-R y ALM1 / ALM2 utilizados para diferenciar *X. fastidiosa* en plantas infectadas de vid, almendro y laurel de flor, fue desarrollada por Hernández-Martínez *et al.* (2006). En este ensayo, las subespecies fueron diferenciadas en base al conjunto de primers que amplificaron; en base a lo anterior, reportaron que: si la muestra amplifica con el par de primers XF2542, se trata de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, la cual se encontró en plantas de vid y almendro; si la muestra amplifica con los pares de primers XF1968 y ALM, de igual manera que si amplifica con los tres pares de primers, se trata de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, encontrada solo en almendro; finalmente, si la muestra amplifica con el par de primers XF1968 se trata de *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*, encontrada en el laurel de flor.

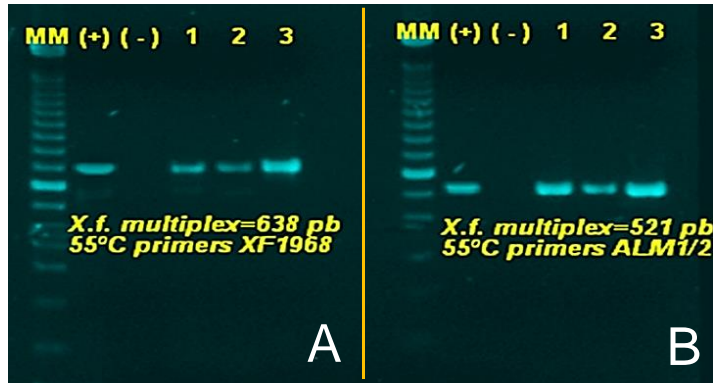


Figura 13. Resultados de las pruebas de PCR en plantas de fresno y chabacano. A) Par de primers XF1968-L / XF1968-F, (+) control positivo, (-) Control negativo, 1. Chabacano 1, 2. Chabacano 2, 3. Fresno 1. B) Par de ALM1 / ALM2 (+) Control positivo, (-) Control negativo, 1. Chabacano 1, 2. Chabacano 2, 3. Fresno 1.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de PCR multiprimers para la detección de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en plantas de fresno y chabacano.

Muestra	Primers	Primers
	ALM 1/ ALM 2	XF1968-L/XF1968-R
Chabacano 1	+	+
Chabacano 2	+	+
Fresno 1	+	+

Por otro lado, Harris *et al.* (2014) realizaron un ensayo similar para diferenciar las subespecies de *X. fastidiosa* en árboles urbanos en el Distrito de Columbia, Estados Unidos; en base a esto, reportan que *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* se detectó en *Morus alba*, *Platanus occidentalis*, *Quercus coccinea*, *Q. macrocarpa*, *Q. palustris*, *Q. phellos*, *Q. rubra* y *Ulmus americana* y que *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* solo se detectó en *Morus alba*.

Asimismo, Melanson *et al.* (2012) al realizar pruebas de PCR multiprimer para diferenciar las subespecies de *X. fastidiosa* obtenidas de diferentes especies de plantas en Luisiana, Estados Unidos en medio PW, reportaron que *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* se detectó en árboles de durazno y álamo; *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* se detectó en plantas de vid, mientras que en laurel de flor detectaron a *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*.

Los datos reportados anteriormente son similares a los descritos en la base de datos de EFSA (2016); estos señalan que *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, se detectó en plantas de vid, mientras que *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* esta presente en árboles de fresno y chabacano, al igual que en árboles de olivo; por otra parte, reportan que en zacate Johnson, mandarino, aguacate e higo, se ha detectado una subespecie no determinada.

El bajo porcentaje de similitud obtenido al comparar la secuencia de los productos de PCR de la prueba multiprimers utilizada en esta investigación con la base de datos del Gen Bank, podría deberse a lo descrito por Nunney *et al.* (2015). Ellos señalan que una cepa de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* aislada de plantas de mora en la costa este de Nueva York es completamente diferente a otras cepas de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* y a pesar que cada cepa presenta variaciones genéticas, en general estas suelen ser mínimas; lo cual podría ser resultado de la recombinación homóloga y al retrocruzamiento.

Identificación de Insectos y Detección de *Xylella fastidiosa*

Se lograron identificar seis géneros y cuatro especies de cicadélidos (Cuadro 7) mediante observaciones morfológicas y con el uso de claves taxonómicas. Uno de los cicadélidos se identificó como *Homalodisca vitripennis* (Figura 14) conocida comúnmente como chicharrita de alas cristalinas, la cual se reporta como el principal vector de *X. fastidiosa*, por lo cual, para corroborar su identificación se realizó extracción de genitalia y se identificó a nivel especie mediante el uso de claves específicas.

La identificación molecular y el análisis de la secuencia de *H. vitripennis* realizada en los laboratorios de Bacteriología y Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF-SENASICA) indicó un porcentaje de similitud de 100% para *H. vitripennis*.

En relación a lo anterior Almeida y Purcell (2003) demostraron que *Homalodisca vitripennis* es vector de *Xylella fastidiosa*, mediante un experimento de transmisión en invernadero, el cual consistió en que los

insectos se alimentaran de plantas de vid infectadas con la enfermedad de Pierce causada por *X. fastidiosa* y de inmediato alimentarlos con plantas de vid sanas. Los resultados que obtuvieron demostraron que las plantas sanas presentaron síntomas de la enfermedad de Pierce tiempo después que los insectos se alimentaron de ellas. Dichos autores realizaron la identificación de *X. fastidiosa* utilizando tejido vegetal de plantas con síntomas, ese tejido se macero e hicieron diluciones, mismas que se agregaron al medio de cultivo PWG para observar el crecimiento colonial, con esto determinaron la presencia de *Xylella fastidiosa* en plantas que presentaron síntomas de la enfermedad de Pierce.

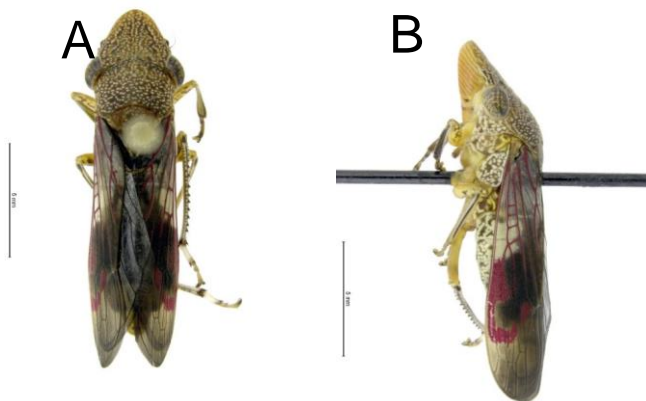


Figura 14 Imágenes de *Homalodisca vitripennis*. A) Vista dorsal. B) Vista lateral.

A finales de la década de los 90's en el valle de Napa, Sonoma y Temecula, Estados Unidos, se confirmó que *Homalodisca vitripennis* es el principal vector transmisor de la enfermedad de Pierce, según lo mencionado por Hopkins y Purcell (2002); estos autores observaron la coincidencia de patrones de altas poblaciones de *H. vitripennis* con la aparición de nuevos brotes de la enfermedad de Pierce y quemaduras de la hoja en algunas plantas ornamentales como el laurel de flor (*Nerium oleander*). Por mucho tiempo, este vector fue considerado como secundario, pues se creía que el principal vector era *Graphocephala atropunctata* (chicharrita verdiazul).

La literatura no menciona a los demás géneros de cicadélidos identificados en esta investigación como insectos vectores de *Xylella fastidiosa*, sin

embargo, se menciona a *Empoasca papayae* y *Empoasca dilitara* como vectores de fitoplasmas y rickettsias asociados al BTS en papayo tal como (Acosta *et al.*, 2017; Martonell y Adsuar, 1954). Por otro lado, a algunas especies del género *Aceratogallia* se les ha asociado con la transmisión del virus PYD en irán (Bureau, 2016), mientras que al género *Balclutha* no se menciona en la literatura como vector de algún fitopatógeno.

Cuadro 7. Resultados de las pruebas PCR en insectos para la detección de *Xylella fastidiosa*.

Cicadélido	Resultados PCR
<i>Homalodisca vitripennis</i>	Positivo
<i>Empoasca dilitara</i>	Negativo
<i>Balclutha mexicana</i>	Negativo
<i>Balclutha abdominalis</i>	Negativo
<i>Aceratogallia spp.</i>	Negativo
<i>Etrythronera spp.</i>	Negativo

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló la presente investigación podemos concluir lo siguiente

Se detectó a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en plantas de vid comercial y vid silvestre.

Se detectó a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en plantas de chabacano y fresno.

Se detectó a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en *Homalodisca vitripennis*.

Homalodisca vitripennis es un potencial vector de *X. fastidiosa* en la zona vitivinícola de Parras.

Comentado [a1]: En una sola hoja

LITERATURA CITADA

Comentado [a2]: En una sola hoja
Aplicar sangría francesa el interlineado sencillo.

- Acosta I., K., Zamora L., Piñol B., Quiñones M., Ramos L., P. L., Luis M., 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, 2017.
- Almeida R., L. Nunney, 2015, How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? , *Plant Disease*:1457-1467.
- Almeida R. y Purcell A. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to Grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera:Cicadellidae). Entomological Society of America, *Journal of Economic Entomology*, 96(2):264-271.
- Almeida R.P.P., Blua M.J., Lopes J.R.S., Purcell A., 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 775-786.
- Amanifar, N., Taghavi, M., Izadpanah, K. y Babael G. 2014. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*. Vol. 53, No. 2, Agosto, 2014.
- Alston, M. J., Fuller, B. K., Kaplan, D. J., and Tumber, P. K. 2012. The Economic Consequences of Pierce’s Disease and Related Policy in the California Winegrape Industry. RMI-CWE Working Paper number 1202.
- Bradbury, J.F. 1991. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 1049. CAB International, Wallingford, UK.
- Bureau A. 2016. A Guide for Diagnosis & Detection Of Quarantine Pests. Potato yellow dwarf virus. Islamic Republic Of Iran Ministry of Jihad-e-Agriculture Plant Protection Organization.

- CABI. 2012. Crop Protection Compendium. Datasheet for: *Xylella fastidiosa*. Wallingford, U.K.
- Caruso M. E., Ferraz de Oliveira R, Vasconcelos R. R., Lázaro M.C., Sánchez S.E., Carlos P.L. 007. Deficiencia hídrica agrava os síntomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira "Natal". *Bragantia: revista de ciencias agronómicas*, (66)003:373-379.
- Casadevall, A., y Pirofski, L. 2014. Microbiology: Ditch the term pathogen. *Nature*. 516:165-166.
- Díaz O, BE. 2003. Vectores de la enfermedad de Pierce. INIFAP-CIRNO-Campo Experimental Costa de Ensenada, Ensenada, Baja California In. I Seminario Internacional de Vitivinicultura.
- Choi, H.K., landolino, A., Silva, F. G., and Cook, D. R. 2013. Water deficit modulates the response of *Vitis vinifera* to the Pierce's disease pathogen *Xylella fastidiosa*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 26:643-657.
- Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV –CNRF). 2011. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* Wells et al)... Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. México, D.F. 6p.
- EFSA, 2013. Statement of EFSA on host plants, entry and spread pathways and risk reduction options for *Xylella fastidiosa* Wells et al.. European Food Safety Authority, Parma, Italy. *EFSA Journal* 2013; 11(11):3468
- EFSA, 2016. Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 November 2015. *EFSA Journal*, 14(2):4378. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4378>
- EPPO/CABI. 2009. Data Sheets on Quarantine Pests: *Xylella fastidiosa*. Consultado en línea el 26 de marzo 2010: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xylella_fastidiosa/XYLEFA_ds.pdf

- FAO. 2003. Examen de los problemas fitosanitarios actuales relacionados con los cítricos y las políticas aplicadas para afrontarlos. Grupo Intergubernamental sobre Frutos Cítricos. La Habana, Cuba. 17 p.
- Firrao G., Bazzi C., 1994. Specific identification of *Xylella fastidiosa* using the polymerase chain reaction. *Phytopathologia Mediterranea* **33**: 90-92. Disponible en URL <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19952300667>
- FUNDECITRUS. 2009. CVC-Clorose variegada dos citros. Fondo de Defesa da Citricultura. San Paulo Br. 12 p.
- Garnsey, S y M., Cambra. 1991. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In: A handbook for detection and diagnosis of graft transmissible disease of citrus.p.193-216
- Golino, D. A. 1993. Pierce's disease. In: Martelli, G. P. (Ed). Graft-transmissible diseases of grapevines, Handbook for detection and diagnosis. FAO. Roma It. 263 p.
- Gould, A.B., J. H. Lashomb. 2007. Bacterial leaf scorch (BLS) of shade trees. Plant Disease Lessons. APSnet.
- Guevara, L. J. 2000. La enfermedad de Pierce en el cultivo de la vid en la costa de Ensenada, B. C. Folleto técnico No. 20 INIFAP-CECOEN.
- Goodwin P., A.H Purcell., 1992. Pierce's disease. In: Grape Pest Management, 2nd Edition. Oakland, USA: University
- Gonzales, LLM. 2004. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*). In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada. Mundi-Prensa. Madrid, Esp. 391 p.
- Hartman, J, Safrfray, D, Perkins, D, Strang, J, Bessin, R., Beale, J. 2001. Pierce's disease, a new disease in grapes in Kentucky. University of Kentucky Integrated Pest Management.
- Hernández, G. L. y Ochoa, C. F. 1997. Detección de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* por ELISA-DAS en vid (*Vitis vinifera* L) y malezas en viñedos

del Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. Revista Facultad de Agronomía (LUZ) 14:297-306.

- Hernandez-Martinez R., Costa, H. S., Dumenyo C. K. y Cooksey, D. A. (2006). Differentiation of Strains of *Xylella fastidiosa* Infecting Grape, Almonds, and Oleander Using a Multiprimer PCR Assay. *Plant Disease*, vol. 90, issue 11 (2006) pp. 1382-1388. DOI 10.1094/PD-90-1382.
- Hopkins D.L., 2005. Biological control of Pierce's disease in the vineyard with strains of *Xylella fastidiosa* benign to grapevine. *Plant Disease* 89: 1348- 1352.
- Hopkins, D. L., y A. H. Purcell. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* 86:1056–1066.
- Hopkins D.L., Adlerz W.C., 1988. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Disease* 72: 429-431.
- Hopkins, D.L. y Mollenhauer, H. H. (1973). Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. *Science* 179, 298-300.
- Hopkins, DL, F Bistline, L Russo, L, C. Thompson. 1991. Seasonal fluctuation in occurrence of *Xylella fastidiosa* in roots and stems extracts from citrus with blight. *Plant Disease* 75: 145-147.
- IPPC. 2013. International Plant Protection Convention (IPPC). Norma Internacional para Medidas Fitosanitaria (NIMF) 5 Glosario de Términos Fitosanitarios (2013). En línea: <https://www.ippc.int/es/core-activities/standardssetting/ispms>.
- IPPC. 2011. International Plant Protection Convention (IPPC). Norma Internacional para Medidas Fitosanitaria (NIMF) 8 Determinación de la Situación de una Plaga en un Área (1998). En línea: <https://www.ippc.int/es/coreactivities/standards-setting/ispms>.
- Janse J.D., A. Obradovic, 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *J. Plant Pathology* 92, S35–S48.

- Jiménez, L. 1985. Evidencia inmunológica del mal de Pierce de la vid en Venezuela. *Turrialba* 35: 243- 247.
- Li W.B., C., Zhou, W., Pria, D., Junior, V., Teixeira, Miranda, E. Pereira, A. Ayres, C. He, P. Costa, J. Hartung. 2002. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grape vine. *Plant Disease* 86(11): 1206-1210.
- Li Y., Hao G., Galvani C.D., Meng Y., De La Fuente L., Hoch H.C., Burr T.J., 2007. Type I and type II pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-wall aggregation. *Microbiology* 153: 719-726
- Li W., Pria, Jr W. D., Teixeir D. C., Miranda V. S., Ayres A. J., Franco C. F., Costa M., Fundecitrus, Araraquara, 14807-040, SP Brazil; He C.-X. y Costa P. I., 2001. Coffee Leaf Scorch Caused by a Strain of *Xylella fastidiosa* from Citrus, Institute of Chemistry, UNESP, Araraquara, SP, Brazil; and J. S. Hartung, USDA-ARS Beltsville, MD 20705-2350.
- Lima, J. E., O. Miranda, V. S. Hartung, J. S. Brlansky, R. H. Coutinho, A., Roberto, S. R., y Carlos E. F. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* 82:94-97.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasheri, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M. R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Savino, V., and Saponari, M. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *J. Plant Pathol.* 96:1-8.
- Matiello, J. B., Almeida, S. R., Garcia, A. W. R., Miguel, A. E., Perine, J., Araujo, M. M., Coabril, C. A., Miranda, V. S., and Manfio, G. P. 1998. Levantamento da ocorrência do amarelinho em regiões cafeeira do Brasil e primeira constatação em cafeeiros Conillon. XXIII Congresso Brasileiro de Cafeicultura, Resúmen, p.2, Poço de Caldas, MG.

- Martonell L. F. y Adsuar, J. 1952. Insect Associated with Papaya Virus Disease in the Antilles and Florida. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY Vol. 4. No. li.
- Melanson, R. A., Sanderlin, R. S., McTaggart, A. R. y Ham, J. H. 2012. A Systematic Study Reveals that *Xylella fastidiosa* Strains from Pecan Are Part of *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*. The American Phytopathological Society. Plant Disease / August 2012 1123.
- Meng Y., Li Y., Galvani C.D., Hao G., Turner J.N., Burr T.J., Hoch H.C., 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *Journal of Bacteriology* 187: 5560-5567.
- Minesavage G.V., Thompson C.M., Hopkins D.L., Leite M.V.B.C., Stall R.E., 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**: 456-461.
- Navarrete, MA (2015). ELISpot and DC-ELISpot Assay to Measure Frequency of Antigen-Specific IFN γ -Secreting Cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) **1318**: 79-86.
- Nunney, L. R., Hopkins, D. L., Morano, L. D., Russell, S. E., Stouthamer, R. 2014a. Intersubspecific recombination in *Xylella fastidiosa* strains native to the United States: infection of novel hosts associated with an unsuccessful invasion. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1159-1169.
- Oliveira A.C., Vallim M.A., Semighini C.P, Araújo W.L., Goldman G.H., Machado M.A., 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **92**: 1048-1054.
- Ortega, E. 1986. Métodos de detección de virus y viroides en Cítricos. FONAIAP Divulga. Año 4: 37-40.
- Paradela F., O., Sugimori, M. H., Ribeiro, I. J. A., Machado, M. A., Laranjeira, F. F., Garcia, A., Jr., Beretta, M. J. G., Harakawa, R., Rodrigues Neto, J., and Beriam, L. O. S. 1995. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. LARANJA 16(2):127-134.

- Prato, J. R. A. 2000. Quem diria, a *Xylella fastidiosa* sempre esteve no café. A Granja, fevereiro/ 2000, Nº 614:40-43.
- Purcell, A. H., Saunders, S. R., Hendson, M., Grebus, M. E., and Henry, M. J. 1999. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology*.
- SCOPE. 2014. Enfermedad de Pierce. Sistema Coordinado para la Vigilancia Reglamentaria y su Epidemiología (SCOPE). Consultado en línea el 18 de junio de 2014: <http://www.scopemx.uaslp.mx/>.
- Schuenzel E., Scally M., Stouthamer R., Nunney L, 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3832-3839.
- SIAP. 2014. Anuarios Estadísticos de la Producción Agrícola en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx>.
- SIAP. 2010. Anuarios Estadísticos de la Producción Agrícola en México. SAGARPA.
- SENASICA. 2016. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Cd. de México,. Ficha Técnica No. 26. 19 p.
- Triapitsyn, S.V., y Phillips, P.A. 2000. First record of *Gonatocerus triguttatus* (Hymenoptera: Mymaridae) from eggs of *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae) with notes on the distribution of the host. *Florida Entomologist* 83: 200-203.
- University of California. 1992. Pierce's disease. In: Grape Pest Management. Division of Agricultural Sciences. Publication, 4105: 64-69.
- Wells JM, Raju BC, Hung HY, Weisburg WG, Mandelco-Paul L and Brenner DJ, 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov, sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* subsp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 136-143.

Winkler, A. J. 1976. Viticultura. CECSA. México, D.F. 792 p.