



“Identificación molecular de los principales insectos asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en las provincias de Cotopaxi, Pichincha e Imbabura”

Yáñez Atiencia, Paola Jazmín

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

28 de septiembre del 2020



Document Information

Analyzed document Urkund_Tesis -Yanez.docx (D79933709)

Submitted 9/25/2020 7:33:00 PM

Submitted by SEGOVIA SALCEDO CLAUDIA

Submitter email mcsegovia@espe.edu.ec

Similarity 2%

Analysis address mcsegovia.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / CLopez tesis.txt

SA Document CLopez tesis.txt (D29753088) 3 Submitted by: biblioteca@espe.edu.ec



Receiver: crcepeda.espe@analysis.arkund.com

Firma:

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "Identificación molecular de los principales insectos asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en las provincias de Cotopaxi, Pichincha e Imbabura" fue realizado por la señorita Yáñez Atiencia, Paola Jazmín el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de septiembre de 2020

Firma:

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

C. C.: 1709055998



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Yánez Atiencia, Paola Jazmín**, con cédula de ciudadanía n°1725153892, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Identificación molecular de los principales insectos asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en las provincias de Cotopaxí, Pichincha e Imbabura**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de septiembre de 2020

Firma:

Yánez Atiencia, Paola Jazmín

C.C.: 1725153892



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Yánez Atiencia, Paola Jazmín**, con cédula de ciudadanía n°1725153892, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Identificación molecular de los principales insectos asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en las provincias de Cotopaxi, Pichincha e Imbabura”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de septiembre de 2020

Firma:

Yánez Atiencia, Paola Jazmín

C.C.: 1725153892

Dedicatoria

El presente trabajo es dedicado a mi familia, cuyo amor, apoyo y motivación constante me han acompañado en cada trayecto de mi vida.

Agradecimiento

A mi familia, por su incansable apoyo en cada una de mis faenas y su comprensión infinita para guiarme a través de cada problema. En especial a mi madre, por su amor perenne y su ejemplo de vida, que me ha demostrado que el esfuerzo y dedicación son los pilares para construir nuestros sueños.

A mi directora de tesis, Claudia Segovia PhD., quien ha supervisado el desarrollo de este trabajo y me ha brindado tanto su tiempo como su guía para culminar el proyecto. Gracias por su colaboración, interés y conocimiento.

A Francisco Flores, PhD., por brindarme su apoyo para presentar esta investigación y por sus consejos para poder realizarla. Gracias por su tiempo y cooperación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), al Departamento Nacional de Protección Vegetal y al Departamento de Biotecnología, por abrirme las puertas para ampliar mi conocimiento y desarrollar el presente tema de estudio. En especial a Carmen Castillo, PhD., por su confianza, apoyo y tutela durante todo el trayecto de la investigación. Así como a la ingeniera Johana Buitrón y al ingeniero Pablo Llumiquinga por su paciencia y consejos.

Gracias a todas las personas que de una forma u otra me han facilitado su ayuda en cada etapa de este proyecto.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	11
Resumen.....	12
Abstract.....	13
Capítulo I: Introducción.....	14
Formulación de Problema.....	14
Justificación del Problema.....	16
Objetivos de la investigación.....	18
<i>Objetivo General</i>	18
<i>Objetivos Específicos</i>	18
Capítulo II: Marco teórico.....	19
Cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	19
Enfermedad de la punta morada de la papa.....	20
<i>Agentes causales</i>	21
<i>Vectores</i>	23
<i>Bactericera cockerelli</i> Šulc. (Hemiptera: Triozidae).....	24
<i>Haplotipos</i>	26
<i>Ciclo biológico</i>	28
<i>Daños a los cultivos</i>	30
<i>Enemigos naturales: Tamarixia triozae</i>	31
<i>Estrategias de control</i>	32
Identificación molecular de plagas.....	34
<i>Código de barras de ADN</i>	34
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	35
<i>Secuenciación Sanger</i>	37

Hipótesis	38
Capítulo III: Materiales y métodos	39
Colaboradores científicos.....	39
Zona de estudio	39
Metodología	39
<i>Material Biológico</i>	39
<i>Extracción de ADN</i>	40
<i>Cuantificación de ADN y preparación de diluciones</i>	40
<i>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	41
Amplificación del gen COI de <i>Bactericera cockerelli</i>	42
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (CaLso).....	43
Identificación molecular de <i>Tamarixia triozae</i>	44
<i>Electroforesis</i>	45
<i>Secuenciación Sanger</i>	45
<i>Análisis bioinformático</i>	46
Capítulo IV: Resultados	48
Extracción y cuantificación de ADN.....	48
Amplificación del gen COI de <i>Bactericera cockerelli</i>	49
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (CaLso)	50
Electroforesis para identificación de <i>Tamarixia triozae</i>	51
Identificación molecular de los insectos evaluados	51
Determinación de los Haplotipos de <i>B. cockerelli</i>	53
Capítulo V: Discusión	55
Capítulo VI: Conclusiones	64
Capítulo VII: Recomendaciones	65
Capítulo VIII: Bibliografía	66
Anexos	84

Índice de tablas

Tabla 1 Resumen de cebadores utilizados en ensayos de PCR convencional.....	41
Tabla 2 Componentes de PCR para la amplificación del gen COI de <i>Bactericera cockerelli</i>	42
Tabla 3 Condiciones de amplificación para el gen COI de <i>Bactericera cockerelli</i>	42
Tabla 4 Componentes de PCR para la detección de CaLso.....	43
Tabla 5 Condiciones de amplificación para la detección de CaLso	43
Tabla 6 Componentes de PCR para la identificación de <i>Tamarixia triozae</i>	44
Tabla 7 Condiciones de amplificación para la identificación de <i>Tamarixia triozae</i>	44
Tabla 8 Muestras enviadas a secuenciación Sanger.....	46
Tabla 9 Cuantificación de ADN genómico extraído mediante metodología RPEX y Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA).....	48
Tabla 10 Resultados de la identificación molecular de los insectos evaluados.....	52

Índice de figuras

Figura 1 Síntomas de punta morada en plantas de papa afectadas	20
Figura 2 Ciclo biológico resumido del psílido de la papa.....	29
Figura 3 Características morfológicas distintivas en el adulto del psílido de la papa.....	30
Figura 4 Electroforesis de un fragmento de 500bp del gen COI de <i>B. cockerelli</i>	49
Figura 5 Electroforesis para detección de CaLso en psílicos de la papa	50
Figura 6 Electroforesis para identificación de <i>Tamarixia triozae</i>	51
Figura 7 Alineamiento de un segmento de 460bp del gen COI de los haplotipos de <i>B. cockerelli</i>	53
Figura 8 Árbol filogenético para el haplotipo de <i>B. cockerelli</i> identificado en relación a los haplotipos reportados.....	54

Resumen

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) involucra la participación directa e indirecta de cerca de 250 mil personas y se considera el segundo cultivo más relevante en la región Sierra del Ecuador. Actualmente, su producción se ha visto afectada por la enfermedad conocida como Punta Morada de la Papa (PMP), la cual puede generar pérdidas de hasta el 90% de los lotes afectados. Por lo cual, el objetivo de la presente investigación es identificar molecularmente los principales insectos asociados con la PMP en las provincias de Cotopaxi, Pichincha e Imbabura. Para ello, se seleccionaron treinta y cinco insectos pre-identificados como *Bactericera cockerelli*, vector de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) y potencial vector de fitopatógenos responsables de la PMP y tres insectos identificados morfológicamente como *Tamarixia triozae*, el cual es un enemigo natural de *B. cockerelli*. Se realizaron ensayos de PCR para amplificar el gen COI de los psílidos, detectar la presencia de CaLso e identificar a *T. triozae*. Adicionalmente, con el afán de determinar el haplotipo de una submuestra de 26 psílidos y corroborar la identidad de los 3 presuntos *T. triozae* se analizaron sus secuencias mediante herramientas bioinformáticas. Los resultados determinaron la presencia del haplotipo Central de *B. cockerelli* en el país, la presencia de CaLso en un psílido de la papa y relacionaron la identidad de los 3 insectos pre-identificados como *T. triozae* con la especie del parasitoide *Diglyphus isaea*.

Palabras clave:

- PSÍLIDO DE LA PAPA
- HAPLOTIPOS
- FITOPATÓGENOS
- ENEMIGOS NATURALES
- SECUENCIACIÓN SANGER

Abstract

Potato cultivation (*Solanum tuberosum* L.) involves the direct and indirect participation of about 250 thousand people and is considered the second most relevant crop in the Sierra region of Ecuador. Currently, its production has been affected by the disease known as potato purple top (PPT), which can generate losses of up to 90% of the affected lots. Therefore, the objective of this research is to molecularly identify the main insects associated with PPT in the provinces of Cotopaxi, Pichincha and Imbabura. For this, we selected thirty-five insects pre-identified as *Bactericera cockerelli*, which is a vector of *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) and a potential vector of phytopathogens responsible for PPT, and three insects morphologically identified as *Tamarixia triozae*, which is a natural enemy of *B. cockerelli*. PCR assays were performed to amplify the COI gene from psyllids, detect the presence of CaLso, and to identify *T. triozae*. Additionally, to determine the haplotype of a subsample of 26 psyllids and to corroborate the identity of the 3 presumed *T. triozae*, their sequences were analyzed using bioinformatic tools. The results determined the presence of the Central haplotype of *B. cockerelli* in the country, the presence of CaLso in a potato psyllid and related the identity of the 3 insects pre-identified as *T. triozae* with the species of the parasitoid *Diglyphus isaea*.

Keywords:

- POTATO PSYLLID
- HAPLOTYPES
- PHYTOPATHOGENS
- NATURAL ENEMIES
- SANGER SEQUENCING

Capítulo I: Introducción

Formulación de Problema

En Ecuador, la papa simboliza el 7% de la canasta básica familiar, siendo su cultivo una actividad en la cual se vinculan alrededor de 250 mil personas a nivel nacional (Devaux et al., 2010; Mejía, 2017). En la Sierra andina del país, la producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) constituye una de las principales actividades económicas, al ser, tras el maíz, el segundo cultivo más importante de la región. Entre las tres zonas con mayor índice de productividad, destacan al Norte, las provincias de Imbabura y Carchi, al Centro, Chimborazo, Tungurahua, Pichincha y Cotopaxi, y al Sur, Cañar y Azuay (Devaux et al., 2010; Taramuel, 2017). Sin embargo, las cosechas de papa se ven afectadas por plagas capaces de disminuir su rendimiento al transmitir enfermedades, como la punta morada de la papa (PMP), que provoca hojas enrolladas cloróticas o moradas, formación de tubérculos aéreos, acortamiento entre los nudos y muerte prematura de la planta (Rubio Covarrubias et al., 2006). Se estima una disminución de hasta el 90% del rendimiento de papa debido a esta enfermedad (Cerna et al., 2012).

Dichos síntomas de la PMP se asocian con fitoplasmas y otros patógenos como *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso), cuya transmisión se produce a través de diversos insectos (Rubio Covarrubias et al., 2011). Especies de cicadélidos como *Circulifer tenellus* y otras especies asociadas a los géneros *Aceratagallia* y *Empoasca* se han identificado como vectores de fitoplasmas (Jakovljević et al., 2020; Munyaneza et al., 2010; Rubio Covarrubias et al., 2006). Sin embargo, el psílido *Bactericera cockerelli* (Šulc) (Hemiptera: Triozidae), vector de CaLso causante de la enfermedad Zebra chip, también ha sido considerado como un potencial portador de fitoplasmas, ya que diversos estudios han correlacionado la presencia de este patógeno en cuadros severos de PMP con una mayor incidencia de poblaciones de *B. cockerelli*, pudiendo

incluso presentarse en cultivos de papa infecciones mixtas de CaLso y fitoplasmas (Almeyda-León et al., 2008; Liefting, Veerakone, et al., 2009; Rubio Covarrubias et al., 2011). Estudios han determinado cuatro haplotipos de *B. cockerelli*, genéticamente diferentes, denominados como haplotipos Central, Occidental, Noroeste y Suroeste debido a las regiones geográficas en las cuales se identificaron en Estados Unidos (Swisher et al., 2012, 2014; Swisher, Munyaneza, et al., 2013). Estos haplotipos presentan diferencias biológicas entre las que varían la tasa de desarrollo, supervivencia, compatibilidad reproductiva y diferentes reacciones a pesticidas, cualidades que se vinculan con su habilidad para la transmisión de patógenos (Cooper et al., 2015; Liu & Trumble, 2007; López, 2012; Mustafa, 2014; Swisher et al., 2014).

En el país, la enfermedad de la PMP se reportó por primera vez en el 2013 en la provincia del Carchi y a través de diferentes investigaciones se logró identificar como agentes causales del padecimiento, al fitoplasma *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* perteneciente al grupo 16SrII (Caicedo et al., 2015) y otro fitoplasma perteneciente al subgrupo 16SrI-F (Castillo Carrillo et al., 2018). En años recientes, se ha reportado la presencia del haplotipo Central de *B. cockerelli* (Castillo Carrillo et al., 2019) y la del patógeno CaLso, relacionado con la enfermedad Zebra chip (Caicedo et al., 2020). La plaga de *B. cockerelli* se considera de alto riesgo en Ecuador, ya que el psílido genera por sí mismo daños en las solanáceas debido a una toxina que secreta al alimentarse, causando la enfermedad conocida como amarillamiento del psílido (Castillo Carrillo et al., 2019). Además, su capacidad como vector de CaLso y su posible habilidad para transmitir fitoplasmas provocando la PMP, facilita la dispersión de los padecimientos mencionados, acarreando pérdidas millonarias al sector agrícola (Rubio Covarrubias et al., 2011). Sin mencionar, que la posible presencia de diferentes haplotipos complica el desarrollo de estrategias para su monitoreo y control, debido a las variaciones biológicas y el grado de resistencia a los insecticidas (Swisher et al., 2014).

Justificación del Problema

La agricultura constituye uno de los ejes económicos de Ecuador, por lo que pérdidas cuantiosas en este sector repercuten ampliamente en la estabilidad económica del país. Debido a que el cultivo de papa es uno de los más relevantes en la región Sierra, es necesaria la identificación oportuna de patógenos y sus vectores para el control de enfermedades. Es así que, centros de investigación como el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ha planteado guías para el manejo de enfermedades como la PMP, en las que se detallan los síntomas de las plantas y la descripción de las características físicas y biológicas del posible vector *B. cockerelli* o psílido de la papa, incluyendo una estrategia que abarca el monitoreo del psílido y el empleo de insecticidas para aminorar sus poblaciones y eliminar los focos de infestación.

El establecimiento de un óptimo programa de manejo integrado de plagas (MIP), depende de la identificación precisa de los vectores que transmiten las enfermedades, sin embargo, la identificación basada en la morfología de los especímenes suele ser un proceso a menudo tardío, dificultoso e incluso ambiguo si se evalúan estadios inmaduros en lugar de adultos (Tahir et al., 2018). Mediante las herramientas proporcionadas por la biología molecular se han podido caracterizar las plagas no solo a nivel de especie sino también de haplotipos. En el caso de *B. cockerelli* se han registrado cuatro haplotipos, los cuales presentan variaciones en el índice reproductivo, de crecimiento y de supervivencia (Liu & Trumble, 2007). En Ecuador, el haplotipo Central del psílido se localizó por primera vez en la provincia de Pichincha el 2017, no obstante, se requieren monitoreos periódicos y análisis moleculares que aporten información actualizada sobre la dispersión de *B. cockerelli* y su diversidad genética en el país (Castillo Carrillo et al., 2019).

La caracterización molecular del psílido como potencial vector de la PMP, se debe realizar en conjunto con la identificación molecular de los agentes causales asociados a la enfermedad. De dicha forma se puede contribuir al entendimiento sobre la relación existente entre *B. cockerelli* como posible portador de fitoplasmas y CaLso en el marco de la PMP. Para afrontar el desafío fitosanitario que representa este padecimiento, también es relevante constatar la presencia de insectos benéficos que faciliten el control de las plagas. El parasitoide *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae) es el enemigo natural específico de *B. cockerelli*, esta avispa pequeña se ha incorporado como un agente biológico con resultados positivos para el control del psílido, una vez que los insecticidas sintéticos han perdido su eficacia (Workman & Whiteman, 2009). El control químico de las plagas suele perder efectividad con los años, debido a que el uso indiscriminado de plaguicidas provoca un aumento en la resistencia de los insectos objetivo, por lo que se recomienda su combinación con múltiples estrategias, como las prácticas culturales y la introducción de insectos benéficos ya sean depredadores o parasitoides (Cerna et al., 2012, 2013; Workman & Whiteman, 2009).

Esta investigación pretende caracterizar molecularmente a los insectos más relevantes vinculados con la PMP en las provincias de Pichincha, Imbabura y Cotopaxi. Por lo que, mediante la determinación de los haplotipos de *B. cockerelli*, la detección de CaLso en los psíidos de la papa y la identificación molecular de *T. triozae*, se espera contribuir al bagaje de información requerida para el desarrollo de nuevas estrategias del MIP. Al ser Ecuador un país agroganadero, la comprensión de la dinámica de plagas y su papel como vectores de fitopatógenos, es indispensable para preservar la sanidad y calidad de los cultivos. Siendo una necesidad para el sector papero, el reducir la dispersión de la PMP en conjunto con las infestaciones de *B. cockerelli*, que al ser vector de patógenos como CaLso genera pérdidas millonarias al sector agrícola.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Identificar molecularmente los principales insectos asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en las provincias de Cotopaxi, Pichincha e Imbabura.

Objetivos Específicos

- Caracterizar molecularmente una muestra de *Bactericera cockerelli* para determinar su haplotipo.
- Detectar la presencia/ausencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso).
- Identificar molecularmente una muestra de *Tamarixia triozae*.

Capítulo II: Marco teórico

Cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

El cultivo de papa en Ecuador es un pilar para la economía, junto con el maíz y el arroz, la papa es uno de los cultivos transitorios con los índices de producción más altos (INEC, 2020). En el 2019, la producción de este tubérculo a nivel nacional fue de 275.346 Tm, siendo las provincias de Carchi, Chimborazo y Cotopaxi, las que lideraron su cultivo con un 24.98%, 18.01% y 15.99% del total de hectáreas sembradas en el país, respectivamente (INEC, 2020). Sin embargo, las provincias con mayor rendimiento fueron Carchi, Pichincha y Chimborazo, con 32.01 t/ha, 25.37 t/ha y 24.50 t/ha correspondientemente (MAG, 2019). La superficie cosechada de papa en el 2019 subió un 1% en relación al 2018, a pesar de ello el costo de producción aumentó debido al uso de pesticidas para el control de plagas (BCE, 2019).

Se ha declarado el uso de alrededor de 24 variedades de papa, de las que se emplean con mayor frecuencia las variedades Superchola, Chola, ICA-Única, Yema de huevo y Gabriela. Entre ellas, la Superchola se reportó como la variedad más cultivada, con un 59% de uso entre los años 2018 y 2019, no obstante, la variedad con mayor rendimiento fue la Chola con un 26.58%, seguido de la Superchola con 25.09% (MAG, 2019). Las actividades ligadas al sector agropecuario representaron hasta diciembre de 2019 el 29.4% de empleo, siendo la rama con mayor concentración de trabajadores en todo el país. La producción de papa ecuatoriana, representa el 7% de la canasta básica familiar y las personas vinculadas con su cultivo sobrepasan las 250 mil, por lo que su rendimiento repercute directamente en la economía nacional (Devaux et al., 2010; INEC, 2019; Mejía, 2017). A pesar de que en 2019, la venta de este tubérculo excedió las 253 mil toneladas, su rendimiento se ha visto perjudicado en los últimos años por diversos factores abióticos y bióticos, entre los que destacan la falta de agua y el incremento de enfermedades y plagas (BCE, 2019; INEC, 2020; MAG, 2019).

Enfermedad de la punta morada de la papa

La punta morada de la papa (PMP) es una de las enfermedades con mayor repercusión en los cultivos, debido a que afecta el desarrollo de la planta y la formación de tubérculos. Se ha reportado como una crisis emergente en Estados Unidos, Centro América y Nueva Zelanda, donde el avance de la enfermedad ha ido incrementando con los años (Liefiting, Veerakone, et al., 2009; Munyaneza et al., 2010; Rubio Covarrubias et al., 2006, 2013). Los síntomas más comunes de este padecimiento son enanismo, tubérculos delgados, acortamiento entre los nudos, tallos en zigzag, hojas enrolladas cloróticas o moradas y brotación de tubérculos aéreos (ver Figura 1) (Cuesta et al., 2018; Rubio Covarrubias et al., 2011). Según la fase de desarrollo en la cual la planta se infecte con la PMP, el rendimiento en la producción puede reducirse hasta el 100% debido a muertes prematuras, lo cual provoca pérdidas económicas cuantiosas, debido a que su cultivo es uno de los más importantes en Ecuador (MAG, 2019; Rubio Covarrubias et al., 2013).

Figura 1

Síntomas de punta morada en plantas de papa afectadas



Nota. El gráfico representa características distintivas de la punta morada de papa, como lo son hojas enrolladas con coloración púrpura (A) y tubérculos aéreos (B). Recuperado de: (Castillo Carrillo et al., 2018; Cuesta et al., 2018).

En Ecuador, los problemas generados por enfermedades y plagas que se registraban en el 2018 eran de un 53%, cifra que aumentó en el 2019 a 81%. Entre los problemas fitosanitarios reportados en 2019, la PMP ocupó el segundo lugar con un 26% de incidencia a nivel nacional. Esta enfermedad fue el principal problema en las provincias del Carchi, Pichincha e Imbabura, con una presencia del 41%, 66% y 59% respectivamente. En Cotopaxi, fue la segunda afección más grave con un 19%, siendo superada por el tizón tardío con un 58% (MAG, 2019). Ensayos realizados en lotes de papa con síntomas de PMP, han permitido inferir que los posibles agentes causales se pueden transmitir por tubérculos semilla procedentes de plantas de papa infectadas (Castillo Carrillo et al., 2018). Debido a que las estrategias de control no se han regularizado entre los agricultores y aún no se han esclarecido las relaciones existentes entre sus posibles agentes causales y vectores, los registros de lotes de papa infectados con PMP siguen en aumento (Castillo Carrillo et al., 2018; Rubio Covarrubias et al., 2011).

Agentes causales

Los principales agentes causales relacionados con la PMP son los fitoplasmas y otros patógenos como *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) (Rubio Covarrubias et al., 2011). Los fitoplasmas, pertenecen a la clase Mollicutes y se consideran como estados intermedios de bacterias sin pared celular con un diámetro de 200-800nm (Ramírez Gomez et al., 2008). Infecciones en más de 700 especies de plantas se relacionan con fitoplasmas, los cuales al ser parásitos obligatorios, se benefician de la ausencia de la pared celular para adaptarse a múltiples entornos gracias a su alta capacidad pleomórfica (Jakovljević et al., 2020; Pagliari & Musetti, 2019). Los fitoplasmas habitan en el floema y cuando un insecto se alimenta de la planta infectada, estos llegan hasta la hemolinfa de los vectores, donde se multiplican y pueden transmitirse a otra planta cuando el insecto vuelve a alimentarse (Crizón, 2017).

El complejo cuadro de síntomas en las plantas infectadas con fitoplasmas sugiere que estos patógenos producen un desbalance hormonal y una alteración con el flujo del floema, sin embargo, se siguen investigando sus mecanismos de acción en correlación con la fisiología de las plantas hospederas (Dalgo, 2020; Pagliari & Musetti, 2019).

El registro de especies de *Candidatus Liberibacter* como agentes causales de múltiples enfermedades en cultivos de importancia agronómica ha ido en aumento en los últimos años (Haapalainen et al., 2018). Pese a que varias especies de su género se han identificado, aún no se han podido establecer los mecanismos de patogénesis y los vectores de muchas de ellas (Wang et al., 2017). Entre los padecimientos con mayor severidad asociados con *Candidatus Liberibacter* se han identificado al dragón amarillo o Huanglongbing (HLB), que afecta principalmente a los cítricos y la enfermedad Zebra chip, con la papa como especie afectada (Crosslin et al., 2011; Liefiting, Sutherland, et al., 2009; Wang et al., 2017). La especie *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso o Lso), es una alfa-proteobacteria no cultivable y limitada al floema de las plantas hospederas que infecta, siendo su cultivo diana la papa (Dalgo, 2020; Munyaneza et al., 2014). Es un bacilo de aproximadamente 3 μ m de largo y 0.3 μ m de ancho y se puede transmitir por vectores, semillas e injertos (Delgado-Ortiz et al., 2019). Se ha determinado a CaLso como el causante del padecimiento Zebra chip, cuya característica distintiva es un intenso pardeamiento en forma de estrías en la médula de la papa (Borges et al., 2017; EPPO, 2020). Dicho oscurecimiento medular se intensifica tras freír el tubérculo, por lo que pierde todo su valor comercial al no ser apto para su consumo doméstico e industrial (Dahan et al., 2017, 2019; Frias et al., 2020).

En el contexto de PMP, tanto fitoplasmas como CaLso provocan síntomas similares en las especies vegetales afectadas. Las plantas hospederas disminuyen su tamaño, presentan tallos retorcidos en zigzag, entrenudos acortados, hojas superiores enrolladas cloróticas o de color púrpura en algunas variedades, nódulos inflamados y

formación de tubérculos aéreos (Cuesta et al., 2018; EPPO, 2020; Rubio Covarrubias et al., 2013). Alrededor de siete cepas de fitoplasmas se han identificado como causantes de la PMP, las cuales pertenecen a los grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrVI, 16SrXII, 16SrXIII y 16SrXVIII (Lee et al., 2009; Omar et al., 2018). En el caso de CaLso, se han identificado a nivel mundial siete haplotipos, A, B, C, D, E, F y U, pero solo los haplotipos A y B se han correlacionado como los agentes de la enfermedad Zebra chip, por lo que se presume su relación con la PMP (Delgado-Ortiz et al., 2019; Swisher & Garczynski, 2019). Diversos ensayos han demostrado que en plantas enfermas con la PMP existen ambos fitopatógenos (Liefiting et al., 2008; Rubio Covarrubias et al., 2011). Un ensayo en México, comprobó que el 54% de los tubérculos procedentes de plantas con PMP eran positivos para CaLso y solo un 3,5% positivos para fitoplasmas, por lo que se considera que CaLso, además de causar la enfermedad Zebra chip, podría estar relacionado con la PMP (Rubio Covarrubias et al., 2013).

En Ecuador, se han reportado como agentes causales de PMP al fitoplasma *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* perteneciente al grupo 16SrII (Caicedo et al., 2015) y otro fitoplasma perteneciente al subgrupo 16SrI-F (Castillo Carrillo et al., 2018). En el presente año, 2020, se realizó el primer reporte de la presencia de CaLso en la provincia de Pichincha identificándose el haplotipo A del patógeno (Caicedo et al., 2020). Sin embargo, pese a las investigaciones realizadas, no se ha logrado dilucidar cuál es el rol preciso de los fitoplasmas reportados o CaLso como agentes causales de la compleja sintomatología de la PMP (Dalgo, 2020; Rubio Covarrubias et al., 2011).

Vectores

Existen plagas de insectos que pueden actuar como vectores de fitopatógenos y agravan la dispersión de enfermedades exponencialmente si no se controla su población (Crizón, 2017). Se han identificado como vectores de fitoplasmas alrededor de 200 especies de insectos, estos se alimentan del floema de la planta hospedera y

pertencen al orden Hemiptera como saltones, cigarras y psílicos (Al-ghaithi et al., 2018; Pagliari & Musetti, 2019). Especies de cicadélidos como *Circulifer tenellus*, *Ceratagallia* spp. y otras asociadas a los géneros *Aceratagallia* y *Empoasca* se han identificado como los portadores de fitoplasmas que provocan la PMP (Jakovljević et al., 2020; Munyaneza et al., 2010; Rubio Covarrubias et al., 2006). Por otra parte, se ha reportado al menos a tres especies de psílicos como vectores de *Candidatus Liberibacter*, siendo *B. cockerelli* el insecto vector de CaLso (Munyaneza et al., 2014).

Se presume que el psílido de la papa, *B. cockerelli*, es un portador tanto de CaLso como de fitoplasmas, ya que estudios en México han correlacionado la elevada presencia del psílido con lotes de papa afectados con PMP, en los cuales se detectaron infecciones mixtas de ambos fitopatógenos (Almeyda-León et al., 2008; Liefiting, Veerakone, et al., 2009; Rubio Covarrubias et al., 2011). En Ecuador, ensayos de PCR convencional permitieron detectar la presencia CaLso en *B. cockerelli*, lo cual confirma que este psílido es el vector de CaLso en el país (Caicedo et al., 2020). Sin embargo, aún no se ha podido determinar al insecto portador de los fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16Srl-F y *Ca. P. aurantifolia* (Caicedo et al., 2015; Castillo Carrillo et al., 2018). Se considera que *B. cockerelli* podría ser su potencial vector, ya que se ha relacionado su presencia con lotes de papa que presentaban síntomas de PMP (Ramírez-Dávila et al., 2012; Rubio Covarrubias et al., 2013). No obstante, se requieren más investigaciones para precisar el género y especie de los insectos vectores de los patógenos asociados con PMP en el país (Castillo Carrillo et al., 2018).

***Bactericera cockerelli* Šulc. (Hemiptera: Triozidae)**

El insecto *Bactericera cockerelli*, también llamado comúnmente como psílido de la papa o psílido del tomate, originalmente se describió como *Trioza cockerelli*, pero en 1997, cuando se determinó al género *Bactericera*, este insecto se redefinió como *B. cockerelli*, siendo actualmente miembro del orden Hemiptera y la familia Triozidae

(Butler & Trumble, 2012b; Wu et al., 2016). Esta plaga se alimenta del floema de sus plantas hospederas en al menos 20 familias de especies vegetales, particularmente de las solanáceas (Yang et al., 2010). Entre las principales plantas huéspedes de este psílido se encuentran la papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*), ají y pimiento (*Capsicum* spp.) (Vega-Gutiérrez et al., 2008). Otras especies hospederas incluyen *Datura stramonium*, *Cyphomandra betacea*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Nicotiana tabacum* (Gerónimo, 2018). Ensayos han demostrado que *B. cockerelli* prefiere tanto la papa como el tomate para establecerse e iniciar la oviposición, optando por plantas de pimienta y berenjena en su ausencia (Thinakaran et al., 2015).

El psílido de la papa es originario del suroeste de Estados Unidos y el norte de México (Djaman et al., 2020). La población de esta plaga ha mostrado dos picos anuales en Idaho y se ha reportado la disminución de su población al final de la temporada, cuando las temperaturas son frías (Swisher et al., 2014; Wenninger et al., 2017). La oviposición y desarrollo de psílicos de la papa alcanza su auge a temperaturas de 26.7°C, a menos de 7°C o a más de 38°C se produce la muerte de los estados inmaduros (Abdullah, 2008; Butler & Trumble, 2012b). En Estados Unidos, *B. cockerelli* no sobrevive a los inviernos por las bajas temperaturas y por la ausencia de sus plantas hospederas, por otra parte, tampoco puede soportar los veranos en México y América Central debido a las altas temperaturas. Por lo que su hábito migratorio es ir al norte durante el verano y la primavera (Abdullah, 2008; López, 2012).

Se ha notificado que el psílido de la papa es capaz de vivir hasta un año en el norte de México y sur de Texas, lugares donde la temperatura es óptima y el alimento está disponible de forma continua (Knowlton & Janes, 1931; Liu et al., 2006). La incidencia de altas poblaciones de *B. cockerelli* se ha observado con mayor frecuencia en los monocultivos, donde los psílicos adultos se dispersan entre las plantas saltando y

volando (Dalgo, 2020; Henne & Rush, 2010). Los métodos de dispersión de esta plaga aún son polémicos, pero se presume que es capaz de recorrer amplias distancias con la ayuda del viento (Olaniyan et al., 2020). De hecho, se ha estimado que este psílido puede recorrer distancias de 100-150m (Cameron et al., 2013). Al ser un insecto de rápida propagación con múltiples plantas hospederas, esta plaga ha pasado a considerarse una de las más relevantes para el sector agrícola.

Esta plaga se ha dispersado desde su área nativa en Estados Unidos y México, a diferentes países como El Salvador, Guatemala, Nicaragua, Honduras y Canadá, tanto por la intervención del ser humano como por la posible ayuda del viento (EPPO, 2013). En 2016, *B. cockerelli* se introdujo por accidente en Nueva Zelanda, investigaciones concluyeron que su entrada se produjo debido a importaciones ilegales de material vegetal infestado desde Estados Unidos (Thomas et al., 2011). La presencia de este psílido también se reportó en Australia el 2017, pese a que en dicho país se estableció un protocolo de bioseguridad como medida preventiva (Olaniyan et al., 2020). En Ecuador, el primer reporte de la presencia del psílido se realizó en la provincia de Pichincha el 2017 (Castillo Carrillo et al., 2019). Se presume que *B. cockerelli* se introdujo accidentalmente desde Centroamérica, posiblemente desde Nicaragua, Honduras o Guatemala, donde ya se había reportado su presencia (Caicedo et al., 2020). Esta plaga se ha propagado rápidamente en el país, reportándose poblaciones extremadamente elevadas en las provincias de Imbabura, Cotopaxi, Carchi y Pichincha (Castillo Carrillo et al., 2019).

Haplotipos

El análisis de secuencias del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), el uso de marcadores de inter-secuencias simples repetitivas (ISSRs) y el uso de técnicas como el análisis de fusión de alta resolución (HRM), entre otras, han permitido determinar los haplotipos de *B. cockerelli* (Olaniyan et al., 2020). En Estados Unidos se

ha detectado la presencia de cuatro haplotipos del psílido de la papa, denominados según las zonas geográficas en las cuales se identificaron (Swisher et al., 2014). Dichos haplotipos se han designado como haplotipo Central, identificado en Texas y Nebraska, haplotipo Occidental, localizado en California, haplotipo Noroccidental únicamente identificado en Washington e Idaho y haplotipo Suroccidental presente en Colorado y Nuevo México (Liu et al., 2006; Liu & Trumble, 2007; Swisher et al., 2012, 2014).

Muestras del psílido de la papa encontrados en México, Honduras, Salvador y Nicaragua se identificaron también como el haplotipo Central (Swisher, Arp, et al., 2013). Por otra parte, en Nueva Zelanda se identificó una muestra de *B. cockerelli* como el haplotipo Occidental (Thomas et al., 2011). En el 2017, se reportó en Ecuador la presencia del haplotipo Central de este psílido (Castillo Carrillo et al., 2019). Debido a que no existen reportes de *B. cockerelli* en países aledaños en América Latina, se presume que esta plaga se introdujo accidentalmente desde países de Centroamérica como Honduras, Guatemala o Nicaragua, lugares donde ya se ha identificado la presencia de esta plaga (Caicedo et al., 2020).

Estudios biológicos de los haplotipos de *B. cockerelli* han demostrado que el haplotipo Central tiene un índice de crecimiento, desarrollo y supervivencia mayor que el haplotipo Occidental (Liu & Trumble, 2007). También se ha determinado que el haplotipo Noroccidental no produce huevos viables al aparearse entre otros haplotipos (Mustafa et al., 2015). Sin embargo, dicho haplotipo Noroccidental es más tolerante a las bajas temperaturas que las otras poblaciones (Swisher, Arp, et al., 2013). Los cuatro haplotipos también han mostrado diferencias en su desempeño en plantas hospederas, capacidad de invasión y resistencia a pesticidas (Olaniyan et al., 2020). De hecho, un ensayo en México, demostró que el haplotipo Occidental poseía una resistencia elevada a los pesticidas en comparación con el haplotipo Central. Sin embargo, no se pudo determinar si esa resistencia es propia de la población del haplotipo Occidental o si se

desarrolló tras movimientos migratorios de la plaga (Liu & Trumble, 2007). La comprensión de los haplotipos de *B. cockerelli* y sus diferencias biológicas es indispensable para reducir las poblaciones de esta plaga, puesto que dichas variaciones podrían ser un obstáculo para desarrollar estrategias de control eficientes (Swisher et al., 2014).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *B. cockerelli* tiene tres etapas de desarrollo: huevo, ninfa y adulto (ver Figura 2) (Cuesta et al., 2018). Los huevos son pequeños, ovalados, amarillentos y para eclosionar demoran de 3 a 7 días. Generalmente se ubican en el envés y los bordes de las hojas (Rubio Covarrubias et al., 2013). Cuando alcanzan la etapa de ninfa atraviesan cinco instares o estadios en un total de 21 días (Cuesta et al., 2018). En el primero, las ninfas son dorsoventralmente aplanadas y tanto su cabeza como el cefalotórax son redondeados. En su segunda etapa ninfal, se acentúan las divisiones entre cabeza, tórax y abdomen, se visibilizan los paquetes alares y el tórax se torna amarillo verdoso (Dalgo, 2020).

En el tercer estadio, los ojos son rojos, las patas se segmentan y se marcan los paquetes alares. En la cuarta fase ninfal, los ojos son rojo oscuro, el tegumento del insecto se presenta íntegro y la segmentación se define completamente. Para el quinto instar, las antenas de la cabeza del psílido engrosan, la coloración se torna verde y los paquetes alares se proyectan en ángulos humerales hasta la zona anterior del cuerpo (Knowlton & Janes, 1931; Rubio Covarrubias et al., 2013; Wallis, 1995). Una vez terminada la etapa ninfal, los psílicos de la papa emergen como adultos, al inicio son inactivos y presentan las alas blancas, pero al transcurrir de 3 a 4 horas las alas se tornan transparentes y el cuerpo adquiere tonos cafés y negros. La cabeza del insecto mide una décima parte de la longitud del cuerpo, con ojos cafés y antenas filiformes (Knowlton & Janes, 1931; Wallis, 1995).

Figura 2

Ciclo biológico resumido del psílido de la papa



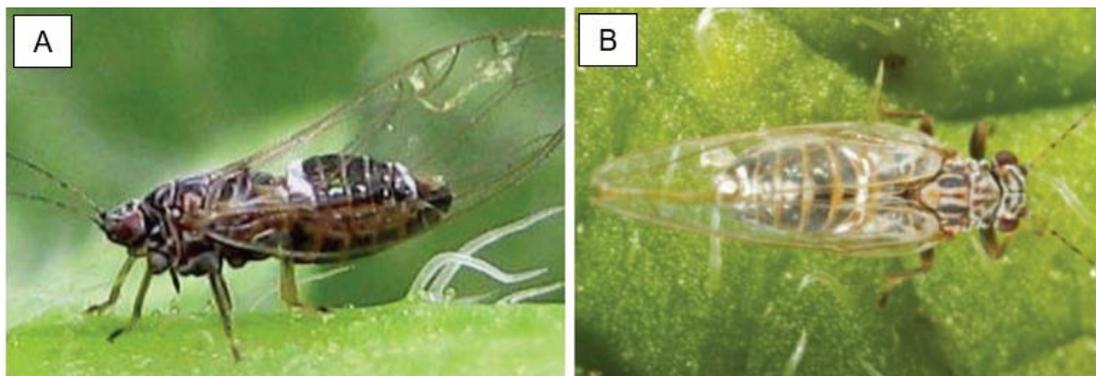
Nota. En el gráfico se resume la duración de las tres fases de desarrollo de *B. cockerelli*: huevo, ninfa y adulto, los cuales miden 0.3 mm, 0.23-1.6 mm y 2.5-3 mm, respectivamente. Recuperado de: (Cuesta et al., 2018).

Los adultos miden entre 2.5 a 3 mm de largo, sus alas son aproximadamente 1.5 veces el largo del cuerpo y se caracterizan por presentar bandas blancas tanto en la base como en el extremo del abdomen. Particularmente las marcas más distintivas son la banda blanca ancha en el primer segmento abdominal y la banda blanca en forma de V invertida en el último segmento abdominal (EPPO, 2013). En general, las alas anteriores presentan venas de color ocre o marrón y su membrana es transparente (ver Figura 3) (Cuesta et al., 2018). El ciclo de vida completo en condiciones óptimas a 26°C dura 35 días, el período de pre-cópula oscila de 3 a 5 días y el de ovoposición de 6-8 días (Wallis, 1995). Las hembras pueden depositar entre 250 y 1300 huevos, siendo el promedio de ovoposición de 500 huevos por hembra (Abdullah, 2008). Dichos psílidos

femeninos viven un promedio de 60 días, mientras que los machos sobreviven alrededor de 20 días (Cuesta et al., 2018).

Figura 3

Características morfológicas distintivas en el adulto del psílido de la papa



Nota. En la figura se representan las características principales de adultos de *B. cockerelli*. Vista lateral (A): Alas 1.5 veces más largas que el cuerpo con venas de color ocre. Vista dorsal (B): Banda blanca ancha en el primer segmento abdominal y banda blanca en forma de V invertida en el último segmento abdominal. Recuperado de: (Cuesta et al., 2018).

Daños a los cultivos

B. cockerelli es una plaga que se alimenta del floema de sus plantas huéspedes y puede causar dos tipos de daño. El daño directo lo provoca al inducir una enfermedad conocida como amarillamiento del psílido. Este padecimiento se caracteriza porque las hojas se curvan y se vuelven cloróticas, la planta presenta un crecimiento retardado y en casos extremos puede morir (EPPO, 2013). Se presume que la causa de dicha condición es una toxina secretada por las ninfas, aunque esta toxina nunca ha sido aislada (Wallis, 1995). El nivel de daño depende del estadio de la planta y de la cantidad de toxina introducida (López, 2012). Reportes sugieren que los primeros síntomas se presentan después de que las ninfas se alimenten por tres días, pero que la aparición de la sintomatología completa precisa de 36 días de alimentación continua (Carter,

1952). Se estima que se requieren de al menos 30 ninfas para que la planta manifieste los síntomas (Blood et al., 1933), sin embargo, otras investigaciones presumen que una sola ninfa es suficiente para que la planta enferme (Carter, 1952). El amarillamiento del psílido es una de las pocas enfermedades donde los efectos fitotóxicos son sistémicos y toda la planta hospedera resulta perjudicada, por lo que su recuperación es complicada y tardía (Liu et al., 2006).

El daño indirecto de *B. cockerelli* se considera más severo que el directo, puesto que esta plaga es capaz de transmitir los haplotipos A y B de CaLso, fitopatógeno responsable de la enfermedad Zebra chip (Munyanza, 2015; Secor et al., 2009). Los psílicos de la papa actúan como vectores de dicho patógeno tanto en su etapa ninfal, como en su fase adulta, por lo cual se incrementa la rapidez de dispersión de la enfermedad (Frias et al., 2020; Swisher & Garczynski, 2019). Se ha demostrado que este psílido puede adquirir CaLso desde una planta infectada tras solo 7 min de ingestión del floema (Sandanayaka et al., 2014). Plantas de tomate y papa infectadas con CaLso, presentan una alteración en la emisión de compuestos volátiles. Demostrándose que *B. cockerelli* prefiere alimentarse primero de plantas infectadas con CaLso y después movilizarse a las plantas sanas, lo cual favorece la adquisición y transmisión del fitopatógeno (Davis et al., 2012). Adicionalmente, se presume el rol del psílido de la papa como vector de fitoplasmas, los cuales se consideran los principales agentes causales de la PMP (Rubio Covarrubias et al., 2011, 2013).

Enemigos naturales: Tamarixia triozae

Se han reportado varias especies como enemigos naturales de *B. cockerelli*, tal como *Orius tristicolor* (Blanco) (Hemiptera: Anthocoridae), *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Conelcciidae), *Chysoperla carnae* Stephens y *C. rufilabris* (Burmeister) (Neuroptera: Chrysopidae), entre otros (Butler & Trumble, 2012a). Sin embargo, la capacidad de dichos insectos como agentes de control biológico

(BCAs) han tenido mero éxito en laboratorios e invernaderos, ya su capacidad de supervivencia en el campo es mucho menor y no se ha demostrado que puedan reducir las poblaciones del psílido de la papa (Vereijssen et al., 2018). Por otra parte, el parasitoide *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae), ha evidenciado alcanzar un alto nivel de parasitismo en las ninfas de *B. cockerelli* en especies de tomate y papa libres de insecticidas (Rojas et al., 2015).

De forma general, *T. triozae* ataca a las ninfas de *B. cockerelli* en el cuarto y quinto instar de desarrollo. Esta pequeña avispa coloca sus huevos en las ninfas y cuando estos eclosionan devoran a los psílicos de la papa. Este parasitoide se puede dispersar rápidamente en distancias menores a 1.5m (Butler & Trumble, 2012a). Estudios han concluido que *T. triozae* puede parasitar un promedio de 4.66 ninfas del psílido de la papa en 6 horas. No obstante, adultos de *T. triozae* presentan una mortalidad de hasta el 91% debido al uso de pesticidas como imidacloprid y abamectina (Martinez et al., 2015). Por ello, la eficacia de usar a *T. triozae* en conjunto con el control químico para reducir las plagas de *B. cockerelli*, varía dependiendo del insecticida y su tiempo de aplicación (Luna-Cruz et al., 2015). En Nueva Zelanda, ya se aprobó el empleo de *T. triozae* como BCA y las primeras liberaciones del parasitoide se realizaron en agosto del 2017 (Vereijssen et al., 2018)

Estrategias de control

Se presume que los psílicos de la papa pueden transmitir fitoplasmas dos horas después de su colonización y que una vez que la planta infectada presenta los síntomas de PMP, esta no se recupera pese a que se hayan retirado los psílicos del lote (Cuesta et al., 2018). Por lo cual, las estrategias de manejo se enfocan en evitar el ingreso de *B. cockerelli* a los cultivos de papa. Para ello se recomiendan programas de manejo integrado de plagas (MIP), los cuales se basan en controles culturales, biológicos y químicos (Vereijssen et al., 2018). Como prácticas culturales se recomienda emplear

semillas certificadas para asegurar un buen inicio de producción, es necesario evitar los tubérculos semilla procedentes de lotes con PMP o donde se haya detectado el psílido de la papa (Cuesta et al., 2018). Respecto al control biológico, se proponen introducir enemigos naturales de la plaga, como *T. triozae*, cuyo potencial como BCA, contribuiría a reducir infestaciones de *B. cockerelli* (Olaniyan et al., 2020).

Sin embargo, la eficacia del control biológico se ve limitada por el empleo excesivo de plaguicidas. Los cuales además de poner en riesgo a los enemigos naturales, provocan daños ambientales y pueden generar resistencia no solo en poblaciones de *B. cockerelli*, sino también en las demás plagas presentes en los lotes (Lewis et al., 2015; Martínez et al., 2015). Para el control químico, se proponen alternativas como el uso de insecticidas sintéticos, no obstante, su modo de acción no es lo suficientemente rápido para frenar el ingreso de nuevos vectores al cultivo (Vereijssen et al., 2018). En Ecuador, se ha propuesto como estrategia de manejo el monitoreo del insecto vector, control químico, prácticas culturales como la rotación de siembras y el uso de semilla sana (Cuesta et al., 2018).

A pesar de dichas estrategias, las poblaciones de *B. cockerelli* han aumentado en Ecuador, lo cual podría asociarse con las aplicaciones desmesuradas de insecticidas, así como el uso de semillas recicladas procedentes de lotes infectados. De hecho, en el 2019 se reportó que solo el 8% de agricultores utilizó semillas certificadas, mientras que el 92% restante empleó semillas recicladas (MAG, 2019). Con la finalidad de frenar el avance de PMP, es indispensable monitorear las poblaciones de *B. cockerelli*, para comprender y cuantificar los factores que afectan su dispersión (Henne & Rush, 2010). También se recomienda evitar la movilización de material vegetal entre las provincias, para prevenir la introducción de PMP y de *B. cockerelli* (Castillo Carrillo et al., 2019).

Identificación molecular de plagas

El enfoque tradicional para la identificación de plagas se basa en las diferentes características morfológicas que presentan los insectos. Debido a que se requiere una amplia experiencia, únicamente los taxónomos y técnicos capacitados se consideran competentes para identificar los taxones con precisión (Jinbo et al., 2011). Sin embargo, las claves taxonómicas empleadas se utilizan meramente para el análisis de los insectos en su etapa adulta, por lo que los estados inmaduros y pupas no se identifican adecuadamente (Barrett & Hebert, 2005). Otros desafíos que enfrenta el enfoque tradicional, son la plasticidad fenotípica y la presencia de especies crípticas, los cuales complican aún más la identificación morfológica de una especie (Murugan et al., 2015). Por lo cual, la identificación de plagas según sus características morfológicas, comprende procesos a menudo complicados y tardíos (Tahir et al., 2018).

Dichas limitaciones, ralentizan la identificación oportuna de especies invasoras como plagas, que tienen la capacidad de generar alteraciones ambientales y por ende acarrear graves pérdidas económicas (Paz et al., 2011). El avance en la biología molecular constituye una herramienta valiosa, que en conjunto con el enfoque tradicional, ha permitido solventar interrogantes respecto a la identificación de especies (Tahir et al., 2018). Las técnicas moleculares también han facilitado el análisis de las relaciones filogenéticas y la genética de poblaciones. Entre ellas, el código de barras de ADN, es el método más sencillo y frecuentemente utilizado por los investigadores (Nagoshi et al., 2011).

Código de barras de ADN

El código de barras de ADN es una técnica empleada para la identificación de especies mediante el uso de secuencias cortas y estándares de ADN de un gen o genes específicos (Paz et al., 2011). La precisión de la identificación depende de la divergencia interespecífica y la variación intraespecífica, entre mayor sea la distancia

entre ambas, mejor será la identificación de la especie (Jinbo et al., 2011). Esta técnica se propuso inicialmente, para amplificar una región de aproximadamente 648bp del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI) en taxones animales (Hebert et al., 2003). Este fragmento de 648bp manifiesta una elevada tasa de sustitución, evidenciada en los altos índices de variación entre especies del mismo género (Luo et al., 2011).

Entre las ventajas de utilizar el gen COI para la identificación de plagas, se encuentran su tamaño reducido y estructura, los cuales se han conservado en la mayor parte de los organismos estudiados (López, 2012). Así mismo, se destaca la presencia de extremos conservados que posibilitan su amplificación mediante el empleo de cebadores universales (Hebert et al., 2003). Y la facilidad que ofrece para discriminar especies estrechamente relacionadas y sus haplotipos, gracias a que produce una tasa de evolución molecular mayor que otros genes como el 16S (Paz et al., 2011; Tahir et al., 2018). La identificación molecular de los cuatro haplotipos de *B. cockerelli* se ha realizado mediante el análisis de un fragmento de 500bp del gen COI (Swisher et al., 2012, 2014). Dicha región es una de las más conservadas, por lo cual, nuevas poblaciones pueden describirse a partir de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs). También se sugiere, que otros genes del mitogenoma de *B. cockerelli* pueden resultar útiles para establecer nuevos haplotipos (Wu et al., 2016).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR convencional fue inventada en 1983, con el propósito de amplificar exponencialmente un segmento diana de ADN a partir de una cadena molde. Con este método se pueden obtener millones de copias de un fragmento específico de ADN, por lo que teóricamente la cantidad de ADN matriz no es un factor limitante. En comparación con la replicación cromosomal del ADN *in vivo*, la clonación por PCR es un proceso más sencillo y menos demoroso (Pelt-Verkuil et al., 2008). La PCR requiere de cuatro componentes básicos: ADN molde, un par de cebadores que flanqueen el ADN

diana que se busca amplificar, ADN polimerasa termoestable y cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs), que serán el sustrato para clonar las cadenas. Estos elementos integran una mezcla de reacción que se somete a ciclos repetitivos para lograr la amplificación (Kadri, 2020).

Cada ciclo está conformado por tres etapas, la primera es la desnaturalización, cuyo propósito es separar las dos cadenas del ADN molde al elevar la temperatura a 94°C. La segunda es la hibridación, donde los cebadores se unen a las zonas complementarias que flanquean el ADN diana, usualmente se realiza a temperaturas entre 40 y 70°C, entre más alta es la temperatura más selectiva es la hibridación. La tercera etapa es la extensión, la cual se realiza usualmente a 72°C y permite la síntesis de las nuevas cadenas de ADN mediante la acción de la ADN polimerasa, que incorpora los dNTPs usando como plantilla el ADN molde. Teóricamente cada ciclo duplica la cantidad de ADN, siendo necesarios entre 20 y 40 ciclos para sintetizar una cantidad de ADN suficiente para su análisis. Todo el proceso demora por lo general de 2 a 3 horas, por lo cual se lo considera una técnica rápida y eficiente (Kadri, 2020; Pelt-Verkuil et al., 2008).

La amplificación del ADN diana se visualiza mediante electroforesis para corroborar el ensayo de PCR y verificar tanto la calidad como la cantidad de los fragmentos obtenidos. Entre las múltiples aplicaciones de la PCR, destacan la detección de una secuencia de ADN específico en un fluido biológico, la elaboración de huellas genéticas para identificar personas en el contexto judicial o para identificar variedades de especies animales, vegetales o microbianas. Por lo que se usa ampliamente para controles de calidad de alimentos, ensayos de diagnóstico, selección de variedades, prácticas forenses, entre otras (Kadri, 2020). La amplificación del gen COI de *B. cockerelli* mediante PCR convencional y su posterior purificación han posibilitado obtener secuencias de calidad para la determinación de sus haplotipos (Swisher et al.,

2012, 2014). Esta técnica también ha sido la más usada para la detección de CaLso tanto en insectos vectores como en las plantas hospederas. Sin embargo, la eficiencia de su detección depende en gran medida de la sensibilidad de los cebadores y los protocolos empleados (Mirmajlessi et al., 2019).

Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger se desarrolló en 1977 para determinar secuencias de fragmentos relativamente cortos del ADN humano. Actualmente, aunque existen métodos que permiten secuenciar genomas completos de forma rápida y económica, la secuenciación Sanger se sigue empleando para secuenciar fragmentos individuales, como los amplicones obtenidos a través de PCR. Esta técnica consiste en combinar el ADN molde con la ADN polimerasa, un cebador, dNTPs y dideoxinucleótidos (ddNTPs), los cuales están marcados con fluoróforos distintos y detienen la síntesis de la cadena de ADN. Mediante la electroforesis capilar, cada fragmento sintetizado pasa a través de una cámara que excita el fluoróforo correspondiente, emitiéndose una fluorescencia de diferentes colores, lo cual permite asignar el nombre de la base respectiva y revelar la secuencia del ADN (Franca et al., 2002).

El análisis de las secuencias de 500bp del gen COI de *B. cockerelli* ha facilitado la identificación de SNPs y la determinación de los cuatro haplotipos existentes. Es así que se ha podido identificar que entre el haplotipo Central y el Occidental solo existe un SNP, mientras que el haplotipo Noroccidental presenta 16 y 17 SNPs en relación al haplotipo Central y Occidental respectivamente (Swisher et al., 2012). También se ha confirmado que el haplotipo Suroccidental presenta 6, 7 y 15 SNPs respecto al haplotipo Central, Occidental y Noroccidental correspondientemente (Swisher et al., 2014). Para estudiar la diversidad génica del psílido de la papa también se ha utilizado la secuenciación Sanger con otros genes del mitogenoma de *B. cockerelli*, como el gen citocromo B (López, 2012).

Hipótesis

En la entomofauna presente en los cultivos de papa en Imbabura, Cotopaxi y Pichincha, se encuentran haplotipo/s de *B. cockerelli* posiblemente relacionados con la PMP y la presencia de CaLso, así como especímenes del parasitoide *T. triozae*, principal enemigo natural del psílido de la papa.

Capítulo III: Materiales y métodos

Colaboradores científicos

- Directora del proyecto: Dra. Segovia Salcedo, María Claudia PhD. Docente-Investigadora. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Codirector del proyecto: Dr. Flores Flor, Francisco Javier PhD. Docente-Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Directora externa del proyecto: Dra. Castillo Carrillo, Carmen Isabel PhD. Investigadora. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Zona de estudio

La presente investigación se realizó en el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) bajo la tutela de la Dra. Castillo Carrillo, Carmen Isabel PhD. Se trabajó conjuntamente con el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB). Dichos laboratorios pertenecen a las instalaciones de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC)-INIAP, ubicado en la Panamericana Sur Km1, vía Tambillo, en el Cantón Mejía, Provincia de Pichincha. En las coordenadas 0°22'11.3"S y 78°33'06.0"W.

Metodología

Material Biológico

El Departamento Nacional de Protección Vegetal proporcionó una muestra de insectos colectada en las provincias de Cotopaxi, Pichincha e Imbabura durante septiembre de 2017 y diciembre de 2019. Dichos insectos preservados en alcohol al 70% fueron clasificados y pre-identificados según sus características morfológicas. Para los análisis moleculares, se seleccionaron 35 especímenes pre-identificados como *Bactericera cockerelli* y 3 insectos presuntamente identificados como *Tamarixia triozae*. A cada uno se le asignó un código para su manejo en el laboratorio (ver Anexo 1).

Extracción de ADN

El ADN de los 35 psílicos y 1 insecto correspondiente a *T. triozae* se extrajo utilizando el procedimiento de extracción rápida de psílicos (RPEX) propuesta por Crosslin et al. (2013). Primero se tomó un solo insecto del tubo eppendorf con alcohol al 70% utilizando una punta de pipeta y se lo dejó secar sobre papel. Después se añadió 75µl del buffer de extracción (Tris-HCl 100mM (pH 8.0), ácido etilendiaminotetraacético de sodio (EDTA) 5mM y Tween 20 al 0.5% (v/v)) en un tubo de PCR de 0.2 ml. Acto seguido, se sumergió una punta de pipeta estéril en una alícuota del buffer de extracción, para lograr que el líquido ascienda por ella y no se absorba el insecto. Luego, con dicha punta se tomó al insecto seco del papel y se lo introdujo en el tubo de PCR de 0.2 ml. A continuación, se procedió a macerarlo con la ayuda de la misma punta al presionarlo contra las paredes del tubo.

Posteriormente se agregó 2µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Life Technologies, Carlsbad, CA) y se incubaron los tubos en un termociclador con 1 ciclo de 15 minutos a 37 °C, 10 minutos a 100 °C y 10min a 10 °C. Finalmente, se retiraron los tubos, se mezclaron brevemente por agitación vorticial suave y se centrifugaron por 10 segundos a 1600g en una microcentrífuga. Los stocks de ADN extraídos mediante RPEX se almacenaron a -20°C para su uso en pruebas posteriores. Adicionalmente, el ADN de los otros 2 insectos pre-identificados como *T. triozae* se extrajo mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Ref: A1125) (Promega Corporation, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 2).

Cuantificación de ADN y preparación de diluciones

El ADN extraído de cada insecto se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Epoch de BioTek. Para la calibración se usó como blanco 2µl agua ultra pura, los cuales se colocaron en los dos primeros pocillos de la placa Take3 (BioTek, USA). Una vez que el coeficiente de variación entre los blancos fue menor al 10% se procedió a realizar

la lectura de las muestras. Para ello se limpió la placa Take3 con agua destilada y se colocaron 2µl de cada muestra de ADN en los pocillos. Finalmente, los resultados de las lecturas se exportaron a un documento de Excel.

Para el ADN de los 36 insectos extraído con la metodología RPEX se prepararon diluciones de 100µl a una concentración de 10ng/µl. Mientras que para el ADN extraído con kit de los otros 2 insectos pre-identificados como *T. triozae* no se prepararon diluciones debido a que su concentración de ADN fue menor a 10ng/ul.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

En los ensayos de PCR convencional para la amplificación del gen COI de *B. cockerelli*, la detección de CaLso y la identificación de *T. triozae* se utilizaron los juegos de cebadores CO1F3/CO1R3, OA2/OI2c e ITS5-Ttr/RNA2-Ttr respectivamente (ver Tabla 1).

Tabla 1

Resumen de cebadores utilizados en ensayos de PCR convencional

Fragmento	Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
COI	CO1F3	TACGCCATACTAGCAATCGG	(Crosslin et al., 2011)
	CO1R3	GAGTAACGTCGTGGTATTCC	
16S	OA2	GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA	(Liefing, Sutherland, et al., 2009)
	OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	
ITS	ITS5-Ttr	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(Castillo Carrillo et al., 2016)
	RNA2-Ttr	CACGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAGAGT	

Nota. Esta tabla muestra los siguientes cebadores: El set CO1F3/CO1R3 usado para amplificar el fragmento COI de *B. cockerelli*, OA2/OI2c empleado para la detección de CaLso en los psíidos e ITS5-Ttr/RNA2-Ttr utilizado para identificar presuntas especies de *T. triozae*.

Amplificación del gen COI de *Bactericera cockerelli*. Para la amplificación del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) de los 35 psíidos de la papa, se utilizaron como cebadores el set CO1F3/CO1R3. La PCR convencional se realizó según las condiciones descritas por Crosslin, et al., (2011), esperando obtener bandas de 500bp. Los componentes de la reacción se detallan en la Tabla 2 y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 3.

Tabla 2

*Componentes de PCR para la amplificación del gen COI de **Bactericera cockerelli***

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	1 Rx (μL)
Agua	-	-	8,2
Buffer	5x	1x	4
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,2
dNTPs	5mM	0,1mM	0,4
CO1F3	10μM	0,5uM	1
CO1R3	10μM	0,5uM	1
Taq	5 U/μL	0,005U/μL	0,2
ADN	10 ng/μL	2 ng/μL	4ul
Volumen total de la reacción (μL)			20μL

Tabla 3

*Condiciones de amplificación para el gen COI de **Bactericera cockerelli***

Actividad	Repeticiones	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización Inicial	1x	2 min	94
Desnaturalización		15 s	94
Alineamiento	35x	1 min	52
Extensión		1 min	72
Extensión Final	1x	5 min	72

Nota. Esta tabla ha sido adaptada de: (Crosslin et al., 2011).

Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso). Para detectar la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) en los 35 psíidos de la papa se utilizó el set de cebadores OA2/OI2c. Para el ensayo de PCR convencional se siguieron las condiciones descritas por Liefting et al. (2009), esperando obtener bandas de 1160bp aproximadamente. Los componentes de la reacción se detallan en la Tabla 4 y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 5.

Tabla 4

Componentes de PCR para la detección de CaLso

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	1 Rx (µL)
Agua	-	-	8,2
Buffer	5x	1x	4
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,2
dNTPs	5mM	0,1mM	0,4
OA2	10µM	0,5uM	1
OI2c	10µM	0,5uM	1
Taq	5 U/µL	0,005U/µL	0,2
ADN	10 ng/µL	2 ng/µL	4ul
Volumen total de la reacción (µL)			20µL

Tabla 5

Condiciones de amplificación para la detección de CaLso

Actividad	Repeticiones	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización Inicial	1x	2 min	94
Desnaturalización		30 s	94
Alineamiento	40x	30 s	65
Extensión		1 min	72
Extensión Final	1x	5 min	72

Nota. Esta tabla ha sido adaptada de: (Liefting, Sutherland, et al., 2009).

Identificación molecular de *Tamarixia triozae*. Para identificar molecularmente los 3 presuntos insectos pre-identificados como *Tamarixia triozae* se utilizó el juego de cebadores ITS5-Ttr/ RNA2-Ttr, esperando obtener un fragmento de alrededor de 780bp. Para el ensayo de PCR convencional se siguieron las condiciones descritas por Castillo Carrillo et al. (2016). Los componentes de la reacción se detallan en la Tabla 6 y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 7.

Tabla 6

*Componentes de PCR para la identificación de **Tamarixia triozae***

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	1 Rx (µL)
Agua	-	----	10,25
Buffer	5x	1x	5
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
dNTPs	5mM	0,2mM	1
ITS5-Ttr	10µM	0,4µM	1
RNA2-Ttr	10µM	0,4µM	1
Taq	5 U/µL	0,005U/µL	0,2
ADN	-	2 ng/µL	5
Volumen total de la reacción (µL)			25

Tabla 7

*Condiciones de amplificación para la identificación de **Tamarixia triozae***

Actividad	Repeticiones	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización Inicial	1x	2 min	94
Desnaturalización		30 s	95
Alineamiento	35x	30 s	51
Extensión		1 min	72
Extensión Final	1x	5 min	72

Nota. Esta tabla ha sido adaptada de: (Castillo Carrillo et al., 2016).

Electroforesis

La electroforesis de todos los ensayos de PCR se realizó en geles de agarosa de 60mL al 2%, para ello se disolvieron 1.2g de agarosa en 60mL del tampón TAE1x (Tris-Acetato-EDTA) y se agregaron 3µL del colorante de tinción SafeView™ Classic (Applied Biological Materials Inc., USA). Una vez solidificado el gel, se cargaron 5µL de los amplicones, 2µL del marcador y cada gel se corrió a 100V por 35min. En el caso de las muestras obtenidas de la amplificación del gen COI de *B. cockerelli* y de las muestras correspondientes a *CaLso* se utilizó el marcador TrackIt 1Kb DNA Ladder de Invitrogen (No. Catálogo: 10488-072). Y para los amplicones resultantes de la PCR para la identificación de *T. triozae* se utilizó el marcador TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen (No. Catálogo: 10488-085).

Secuenciación Sanger

Para la secuenciación de los amplicones se seleccionaron en total 29 muestras. Tres de ellas corresponden a los 3 insectos pre-identificados como *T. triozae* y las restantes veinte y seis, son una submuestra representativa de los especímenes de *B. cockerelli*. Dicha submuestra se seleccionó considerando la calidad del ADN de los amplicones, así como el lugar y fecha de colecta de los especímenes. Los 26 insectos correspondientes a *B. cockerelli* se identificaron con la letra "A" como prefijo seguido del número de la respectiva muestra. Mientras que los 3 insectos presuntamente identificados como *T. triozae* se registraron con los códigos 21*R designado al insecto cuyo ADN se extrajo con la metodología RPEX, así como 21*K y 22*K para los dos insectos cuyo ADN se extrajo mediante el Kit de Promega (ver Tabla 8). La secuenciación Sanger se realizó en la empresa MacroGen (Korea), para ello se trabajó con la empresa intermediaria IDgen, cuyos servicios incluyen el transporte, purificación y ensamblaje de secuencias. Se enviaron 30 µL de cada amplicón y 10µL del respectivo cebador por cada cinco amplicones.

Tabla 8*Muestras enviadas a secuenciación Sanger*

Provincia	Localidad	Fecha de colecta	Pre-identificación	Código
Cotopaxi	Cangahua (5 Esquinas)	12-mar-19	<i>B. cockerelli</i>	A1
Cotopaxi	Cangahua	21-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A2
Cotopaxi	Cerro Azul	20-oct-19	<i>B. cockerelli</i>	A3
Cotopaxi	Chanchaló	21-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A4
Cotopaxi	Chitán	13-mar-19	<i>B. cockerelli</i>	A5
Cotopaxi	El Milagro Pastocalle	12-mar-19	<i>B. cockerelli</i>	A6
Cotopaxi	Jatunera	12-mar-19	<i>B. cockerelli</i>	A7
Cotopaxi	Salache	24-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A10
Imbabura	Chilcapamba	11-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A12
Imbabura	Chilcapamba	2-dic-19	<i>B. cockerelli</i>	A13
Imbabura	Chiriguasi Alto	4-dic-19	<i>B. cockerelli</i>	A14
Imbabura	El Inca	6-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A17
Imbabura	Mariana Acosta	8-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A18
Imbabura	San Pablo	25-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A21
Imbabura	Tumbatú	5-dic-19	<i>B. cockerelli</i>	A22
Imbabura	Tunibamba	26-oct-19	<i>B. cockerelli</i>	A23
Imbabura	Ugshapungo	12-nov-19	<i>B. cockerelli</i>	A24
Pichincha	Checa	15-oct-17	<i>B. cockerelli</i>	A25
Pichincha	Checa	13-ago-18	<i>B. cockerelli</i>	A26
Pichincha	EESC	5-sep-17	<i>B. cockerelli</i>	A27
Pichincha	EESC	1-nov-17	<i>B. cockerelli</i>	A28
Pichincha	EESC	1-dic-17	<i>B. cockerelli</i>	A29
Pichincha	EESC	1-feb-18	<i>B. cockerelli</i>	A30
Pichincha	EESC	1-ago-18	<i>B. cockerelli</i>	A31
Pichincha	Machachi	21-sep-18	<i>B. cockerelli</i>	A34
Pichincha	Tumbaco CADET	1-dic-17	<i>B. cockerelli</i>	A35
Cotopaxi	Latacunga	1-mar-19	<i>T. triozae</i>	21*R
Cotopaxi	Latacunga	1-mar-19	<i>T. triozae</i>	21*K
Cotopaxi	Latacunga	1-mar-19	<i>T. triozae</i>	22*K

Análisis bioinformático

La empresa IDgen proporcionó como resultados las secuencias crudas, ensambladas y los resultados correspondientes a la identificación de las especies mediante el análisis en el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Se constataron los resultados obtenidos utilizando el algoritmo BLASTN incorporado en el programa BLAST. Posteriormente, se procedió a analizar la calidad de las secuencias, mediante la examinación de los electroferogramas en el programa MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) y se descartaron las colas de los electroferogramas debido a una mala resolución.

El caso de las 26 muestras identificadas como *B. cockerelli* se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias obtenidas en este estudio y las secuencias de los haplotipos reportados en el GenBank® NCBI. Se consideraron los cuatro haplotipos reportados en Estados Unidos identificados especímenes de *B. cockerelli* aislados en Nebraska con número de accesión JQ708094.1 (haplotipo Central), Prosser con número de accesión JQ708093.1 (haplotipo Noroccidental), Hermiston con número de accesión JQ708095.1 (haplotipo Occidental) y Farmington con número de accesión KC305359.1 (haplotipo Suroccidental). También se incluyó el haplotipo Central de *B. cockerelli* reportado en Pichincha, con el número de accesión MK054304.1. Para el alineamiento se usó el algoritmo MUSCLE presente en el programa MEGA X. A continuación, se eliminaron los fragmentos ambiguos utilizando el software online GBlocks Server (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html).

Utilizando el programa MEGA X se analizaron las secuencias obtenidas y se seleccionó una muestra representativa de este estudio para elaborar un árbol filogenético empleando el algoritmo de Neighbor Joining, con el modelo T92 (Tamura 3-parameter), usando un valor de Bootstrap de 100 réplicas y tomando a la especie *Cervaphis Quercus* (MH821657.1) como grupo externo.

Capítulo IV: Resultados

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN de los 35 psílidos de la papa y de 1 insecto pre-identificado como *T. triozae* mediante la metodología RPEX permitió obtener concentraciones adecuadas de ADN para los ensayos moleculares posteriores. La cuantificación del ADN genómico de todas las muestras de *B. cockerelli* tuvo un rendimiento promedio de 111ng/μL, mientras que la muestra de *T. triozae* tuvo una concentración de 26ng/μL. Por otra parte, la cuantificación del ADN extraído mediante el kit de Promega de los otros dos insectos considerados como *T. triozae* obtuvo una concentración promedio de 4ng/μL.

Sin embargo, la pureza del ADN genómico fue distinta para los dos métodos de extracción. En el caso de *T. triozae*, la pureza del ADN genómico extraído mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA) fue mayor en comparación con la pureza promedio obtenida del ADN extraído según el procedimiento RPEX. Ya que la pureza del ADN para *T. triozae* fue de 1.8 y 1 en relación con el kit y el método RPEX respectivamente. En el caso de los psílidos la pureza promedio de su ADN genómico fue de 1.5 (ver Tabla 9).

Tabla 9

Cuantificación de ADN genómico extraído mediante metodología RPEX y Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA).

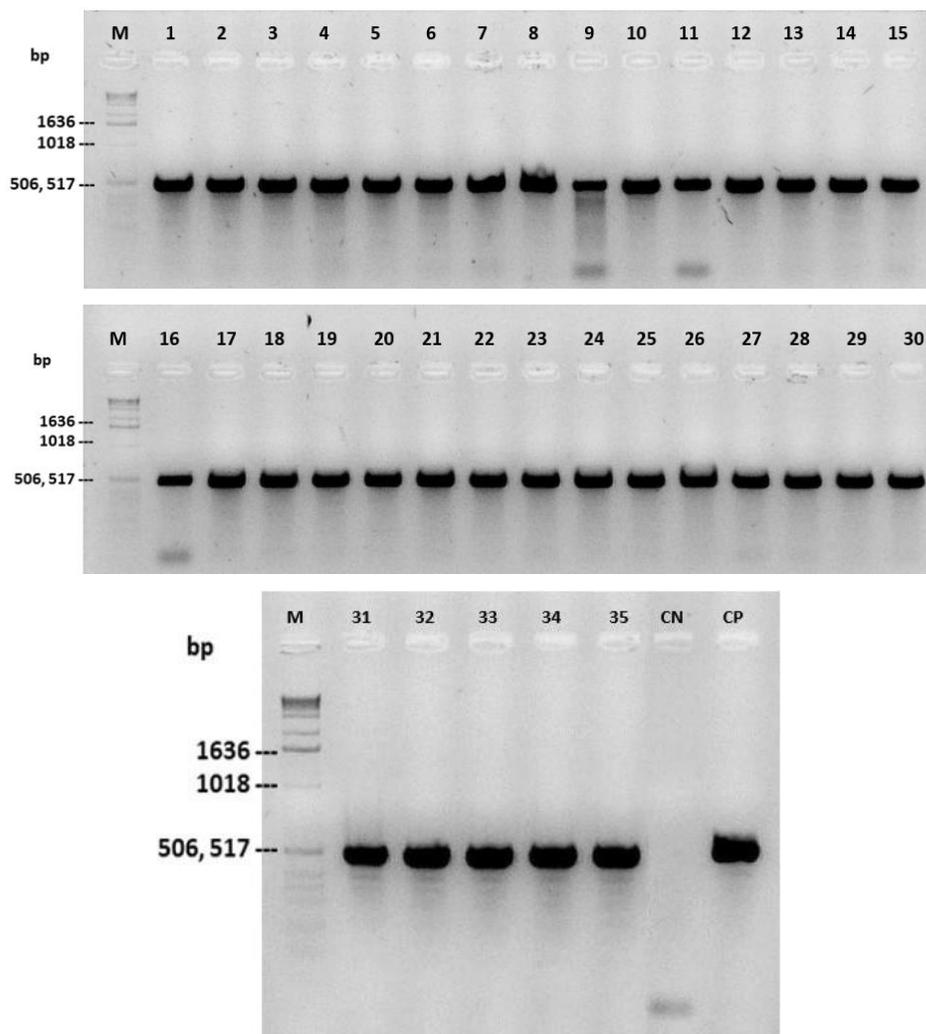
Método de Extracción	Insectos	Pureza promedio (260/280)	Concentración promedio (ng/μL)
RPEX	<i>B. cockerelli</i>	1.5	111
	<i>T. triozae</i>	1	26
Kit	<i>T. triozae</i>	1.8	4

Amplificación del gen COI de *Bactericera cockerelli*

Las 35 muestras de los psílicos de la papa amplificaron exitosamente bandas de 500bp (ver Figura 4). Con referencia en estos amplicones obtenidos, la calidad de cada muestra de ADN y tanto el lugar como fecha de colecta del insecto, se seleccionó la submuestra conformada por 26 especímenes de *B. cockerelli*.

Figura 4

Electroforesis de un fragmento de 500bp del gen COI de *B. cockerelli*



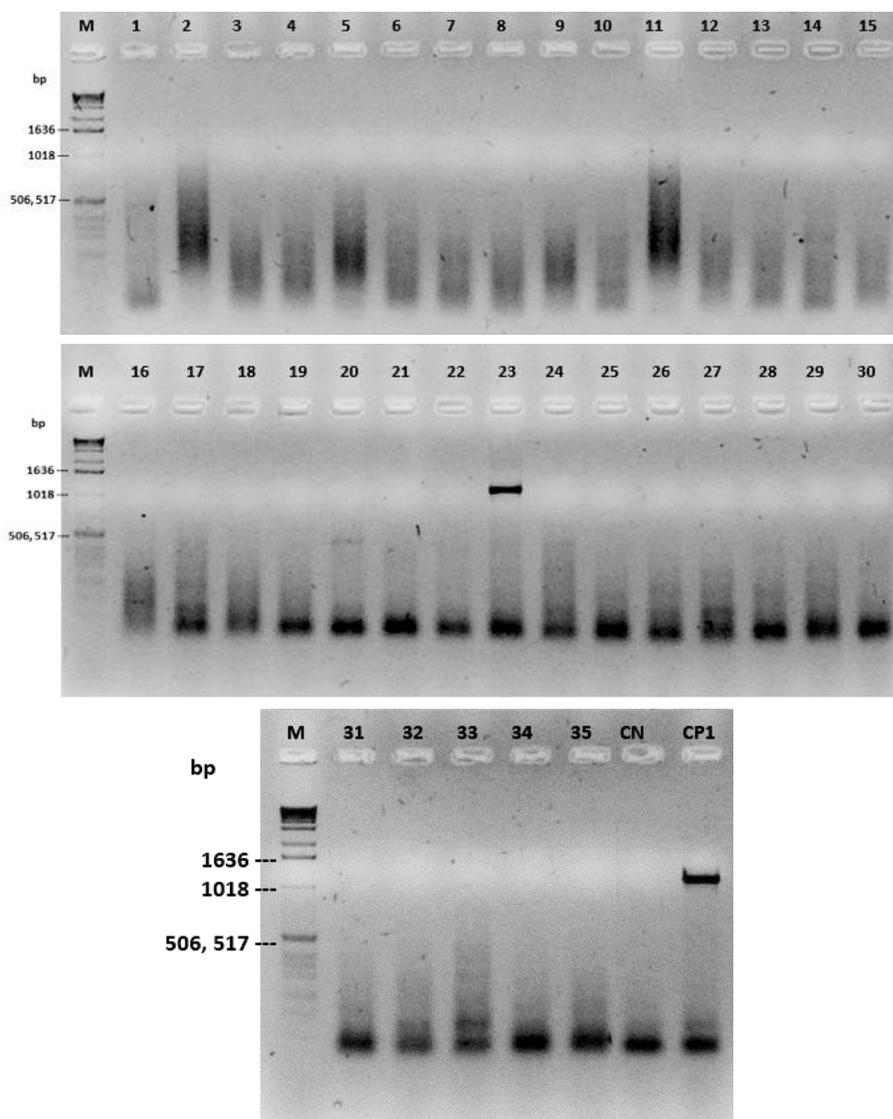
Nota. Carril M: TrackIt 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Carriles 1-35: Muestras de insectos individuales de *B. cockerelli* (10ng/μL), Carril CN: Control Negativo; Carril CP: Control Positivo.

Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso)

De los 35 insectos de *B. cockerelli* utilizados para la detección de CaLso, solo la muestra 23 fue positiva ya que presentó una banda de aprox. 1160bp. Todas las demás muestras fueron negativas para CaLso (ver Figura 5).

Figura 5

Electroforesis para detección de CaLso en psílididos de la papa



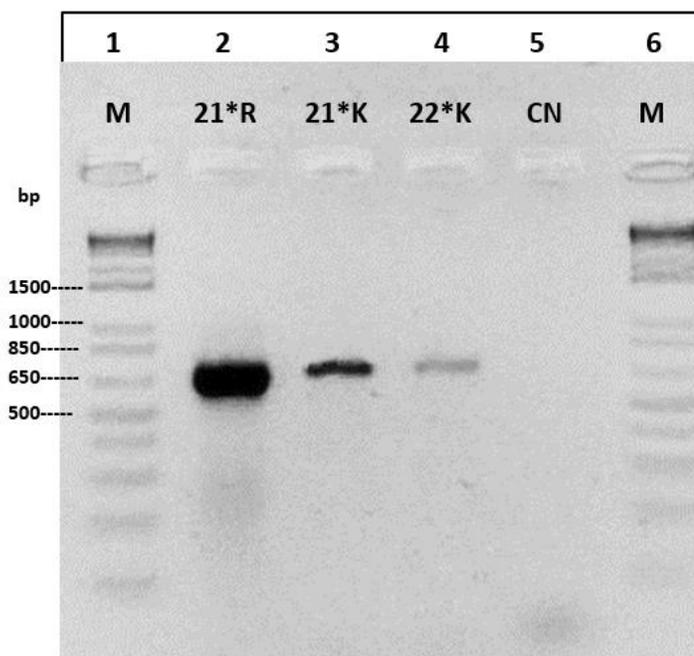
Nota. Carril M: Marcador TrackIt 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Carriles 1-35: Muestras de insectos individuales de *B. cockerelli* (10ng/μL); Carril CN: Control Negativo; Carril CP1: Control Positivo.

Electroforesis para identificación de *Tamarixia triozae*

Como resultado de la electroforesis, los tres insectos presuntamente identificados como *Tamarixia triozae* presentaron bandas de aproximadamente 780bp (ver Figura 6).

Figura 6

Electroforesis para identificación de *Tamarixia triozae*



Nota. Carril 1 y 6: Marcador TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Carril 2: Presunto *T. triozae* cuyo ADN se extrajo con metodología RPEX. Carriles 3-4: Presunto *T. triozae* cuyo ADN se extrajo con Kit de Promega. Carril 5: Control Negativo (CN).

Identificación molecular de los insectos evaluados

Mediante el uso del programa BLASTN se corroboró que la submuestra de 26 insectos pre-identificados como psílicos de la papa en realidad correspondían a la especie de *B. cockerelli* con una identidad del 100%. Sin embargo, se evidenció que la identidad de los 3 especímenes identificados morfológicamente como *T. triozae* se relacionó con la especie *Diglyphus isaea* con identidades superiores al 79% (ver Anexo

3). En la Tabla 10 se detallan los porcentajes de identidad de los especímenes analizados, después de remover las bases de mala calidad de sus secuencias.

Tabla 10

Resultados de la identificación molecular de los insectos evaluados

Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	No. Accesoión
A1	459	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A2	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A3	460	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A4	459	97	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A5	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A6	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A7	460	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A10	460	96	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A12	459	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A13	460	97	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A14	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A17	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A18	460	97	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A21	460	96	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A22	460	96	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A23	460	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A24	459	97	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A25	460	96	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A26	460	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A27	459	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A28	459	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A29	459	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A30	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A31	460	99	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A34	459	98	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
A35	459	97	<i>B. cockerelli</i>	COI	100	MK054304.1
21*R	552	93	<i>Diglyphus isaea</i>	ITS	82.20	DQ137251.1
21*K	364	92	<i>Diglyphus isaea</i>	ITS	82.92	DQ137253.1
22*K	641	85	<i>Diglyphus isaea</i>	ITS	79.56	DQ137251.1

Determinación de los Haplotipos de *B. cockerelli*

Se determinó que los 26 psílicos de la papa de este estudio corresponden al haplotipo Central, cuyas secuencias son idénticas en un 100% a los haplotipos reportados en Nebraska (JQ708094.1) y Pichincha (MK054304.1). La muestra A2 es representativa de este estudio debido a que es idéntica a las otras 25 secuencias de *B. cockerelli*. En la Figura 7 se observa el alineamiento de la secuencia de 460bp del gen COI de la muestra A2 en comparación con los cuatro haplotipos de *B. cockerelli* reportados en Estados Unidos y Ecuador.

Figura 7

Alineamiento de un segmento de 460bp del gen COI de los haplotipos de *B. cockerelli*

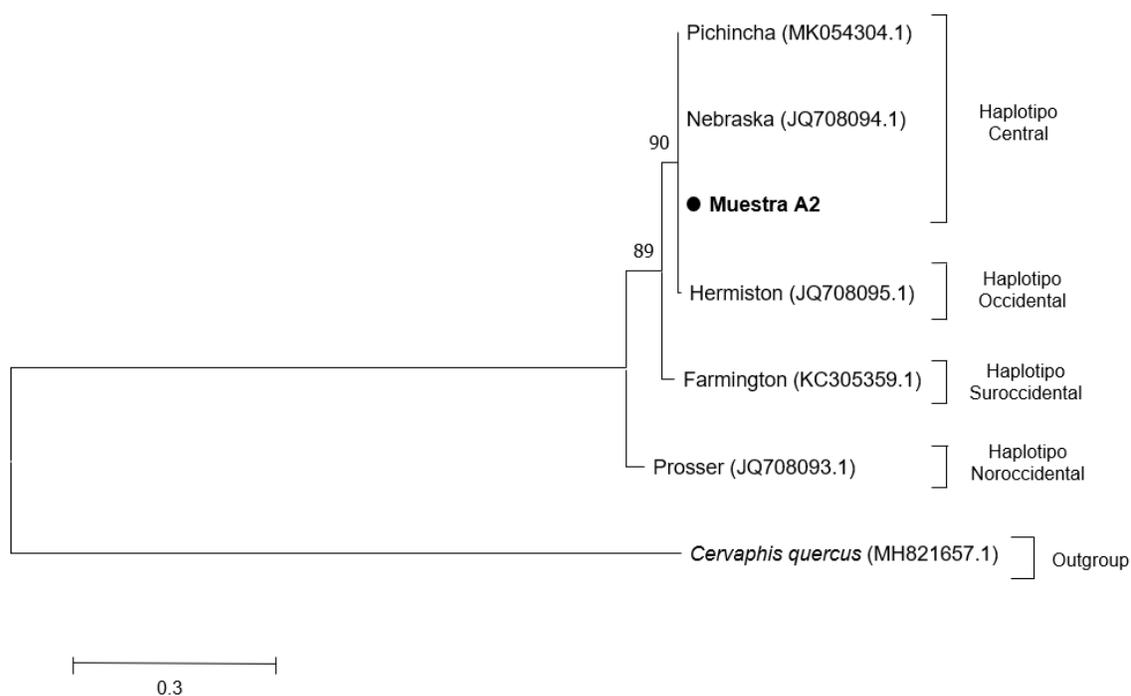
Pichincha-H. Central	TCGGAAATTCT	AGGATTCATT	GTTTGAGCAC	ATCATATATT	TACAGTAGGT	ATAGATGTTG	ATTCTCGTGC	CTATTTCACT	[80]
Nebraska-H. Central	[80]
Hermiston-H. OccidentalC.....	[80]
Farmington-H. Suroccidental	C.....G.....	[80]
Prosser-H. Noroccidental	C.....	[80]
Muestra A2	[80]
Pichincha-H. Central	TCCGCAACTA	TAATTATGTC	TGTCOCCTACA	GGAATTAAAA	TTTTAGTTG	ATTAGCAACT	ATTTATGGGA	TAAAAATATA	[160]
Nebraska-H. Central	[160]
Hermiston-H. Occidental	[160]
Farmington-H. SuroccidentalT.....	[160]
Prosser-H. NoroccidentalT.....T.....	[160]
Muestra A2	[160]
Pichincha-H. Central	TTTTTCCTCCA	AGTATTATTT	GATCTCTAGG	ATTCATTTTC	CTGTTTACAC	TGGGAGGTTT	AACAGGTGTA	ATTTTAGCAA	[240]
Nebraska-H. Central	[240]
Hermiston-H. Occidental	[240]
Farmington-H. Suroccidental	C.....	[240]
Prosser-H. Noroccidental	C.....	A.....T.....	[240]
Muestra A2	[240]
Pichincha-H. Central	ATTCTTCAAT	TGACATTATT	TTACATGACA	CATACTATGT	AGTAGCACAT	TTCCATTATG	TTCTATCTAT	AGGGGCTGTA	[320]
Nebraska-H. Central	[320]
Hermiston-H. Occidental	[320]
Farmington-H. SuroccidentalT.....G.....	[320]
Prosser-H. NoroccidentalT.....G.....T.....	[320]
Muestra A2	[320]
Pichincha-H. Central	TTTGCAATTA	TTGCTAGATT	TATTAATTGA	TACCCTTTAA	TAACAGGAGT	AATTATAAAT	AAAAC TTAT	TAAAAACACA	[400]
Nebraska-H. Central	[400]
Hermiston-H. Occidental	[400]
Farmington-H. Suroccidental	[400]
Prosser-H. NoroccidentalC.....T.....	[400]
Muestra A2	[400]
Pichincha-H. Central	ATTTATTAGT	ACTTTTATTG	GTGTTAACCT	TACTTTTTTC	CCCCAACATT	TCTTAGGACT			[460]
Nebraska-H. Central			[460]
Hermiston-H. Occidental			[460]
Farmington-H. Suroccidental			[460]
Prosser-H. NoroccidentalG.....		[460]
Muestra A2			[460]

Nota. Las secuencias de los haplotipos reportados poseen los siguientes números de accesión: Haplotipo Central-Nebraska (JQ708094.1), Haplotipo Central-Pichincha (MK054304.1), Haplotipo Occidental-Hermiston (JQ708095.1), Haplotipo Suroccidental-Farmington (KC305359.1) y Haplotipo Noroccidental-Prosser (JQ708093.1).

El árbol filogenético mostró un análisis robusto, con valores de soporte de Bootstrap superiores a 70. Por lo cual se constató gráficamente que la muestra A2 corresponde al haplotipo Central, al igual que las secuencias reportadas en Pichincha y Nebraska. En la Figura 8 se visualiza el árbol filogenético construido con la muestra A2, las secuencias reportadas en Estados Unidos y Ecuador respecto a los haplotipos de *B. cockerelli* y el grupo externo *Cervaphis Quercus*.

Figura 8

Árbol filogenético para el haplotipo de *B. cockerelli* identificado en relación a los haplotipos reportados



Nota. El árbol filogenético establece gráficamente la relación entre el haplotipo identificado para la muestra A2 (representativa de este estudio) y los cuatro haplotipos de *B. cockerelli* reportados. Los números en los nodos son los valores de Bootstrap obtenidos con el método Neighbor Joining y el modelo T92. La especie *Cervaphis Quercus* se usó como grupo externo. Los números en paréntesis corresponden a los números de acceso en el GenBank.

Capítulo V: Discusión

La identificación molecular de los insectos ha permitido resolver incógnitas respecto a la identidad de una gran variedad de organismos, con lo cual se ha posibilitado la determinación oportuna de especies de insectos plaga con el potencial de generar graves repercusiones económicas (Barrett & Hebert, 2005). El primer paso para obtener resultados de calidad en los ensayos moleculares es la extracción de ADN (Cerdeja Granados & Díaz, 2013). Los métodos basados en el empleo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y los kits comerciales han sido las técnicas más frecuentes para extraer el ADN de *B. cockerelli*, así como de muchos otros insectos (Castillo Carrillo et al., 2016; Crosslin et al., 2006; Ravindran et al., 2011). Sin embargo, dichos procesos requieren de una cantidad considerable de tiempo e involucran el desecho de solventes orgánicos potencialmente peligrosos. Además, los kits son más costosos, de menor rendimiento y necesitan equipos de laboratorio poco accesibles (Paydar et al., 2018).

Razones por las que, la metodología RPEX representa un método fácil, rápido y reproducible para una extracción de calidad de ácidos de nucleicos de insectos como *B. cockerelli* (Crosslin et al., 2013a). La cuantificación del ADN extraído mediante el protocolo RPEX verificó que el procedimiento fue exitoso para obtener concentraciones adecuadas de ADN genómico tanto para los psílidos de la papa como para el insecto considerado como *T. triticeae* (ver Tabla 9). Ya que para los ensayos moleculares con insectos se considera adecuada una concentración entre 5 y 50ng/μL (Crosslin et al., 2006). Sin embargo, pese a que la concentración promedio de ADN de los otros dos presuntos *T. triticeae* extraída mediante el kit de Promega fue menor a 5ng/ul, su pureza promedio fue la más alta con un valor de 1.8. Por lo que, pese a la baja concentración, el ADN se considera de calidad óptima por tener un valor de pureza comprendido entre 1.8 y 2 (Ruíz Sesma et al., 2010).

A medida que ha progresado el campo de la biología molecular, se han desarrollado cada vez más técnicas y protocolos para la extracción de ácidos nucleicos de diversos organismos. Entre ellos destacan los métodos de extracción rápida porque permiten a los investigadores ahorrar grandes cantidades de tiempo y recursos cuando se trabajan con poblaciones de insectos numerosas (Matos-Maraví et al., 2019). La metodología RPEX se ha comparado con métodos basados en el uso de CTAB y kits comerciales, obteniendo los mismos resultados en pruebas de PCR y en ensayos realizados para la detección de CaLso (Crosslin et al., 2013b). De hecho, el análisis de los resultados de la secuenciación Sanger permitió corroborar que todas las muestras cuyo ADN se extrajo con RPEX presentaron secuencias con calidades superiores al 90%. Mientras que en el caso de los dos insectos tratados como *T. triozae* cuyo ADN se extrajo con Kit se obtuvieron secuencias con calidades del 92% y 85% (ver Tabla 10). Por lo cual, se considera que la metodología RPEX es eficiente para extraer el ADN no solo de psílidos, sino también de otros insectos, como es el caso de los ectoparasitoides.

La técnica de la PCR convencional es el método más comúnmente usado para distinguir especies que están estrechamente relacionadas, así como para detectar patógenos (Mirmajlessi et al., 2019). La validación del ADN y del ensayo de PCR es un requisito preliminar antes de continuar con los análisis moleculares. La importancia de la validación radica en que permite visualizar el ADN extraído y por tanto se evalúa también el correcto funcionamiento de equipos y reactivos empleados durante la PCR. Con este procedimiento se puede asegurar que el método de extracción de ácidos nucleicos y la reacción de PCR ejecutada, en verdad funcionan (Crosslin et al., 2011). La amplificación del gen COI de los 35 especímenes pre-identificados como *B. cockerelli* mediante el uso de los cebadores CO1F3/CO1R3 permitió la obtención de bandas de aproximadamente 500bp (ver Figura 4). Dichos resultados permitieron la

validación exitosa del ADN de los psíidos, ya que gracias al control positivo se corroboró la eficiencia del ensayo, mientras que con el control negativo se constató que no existió ningún tipo de contaminación cruzada (Fox et al., 1991).

Respecto a detección de CaLso en las 35 muestras de *B. cockerelli* previamente validadas, se determinó que únicamente la muestra 23 fue positiva para este fitopatógeno. Ya que fue la única muestra donde se obtuvo una banda de alrededor de 1160bp mediante el empleo de los cebadores OA2/OI2c. La eficacia del ensayo se comprobó debido a la correcta amplificación del control positivo y la ausencia de bandas en el control negativo (ver Figura 5). Los resultados de esta investigación concuerdan con varios ensayos realizados para la detección de CaLso tanto en plantas como en psíidos de la papa, donde generalmente se realiza la amplificación de la secuencia parcial del gen de ARN ribosómico 16S para definir si el fitopatógeno está presente o ausente. Estos estudios han confirmado que *B. cockerelli* es el vector de CaLso, ya que varios insectos han resultado positivos para esta bacteria al igual que las plantas que infestan (Caicedo et al., 2020; Castillo Carrillo et al., 2019; Liefting, Sutherland, et al., 2009; Secor et al., 2009).

El primer reporte de la plaga *B. cockerelli* se realizó en Pichincha el 2017 (Castillo Carrillo et al., 2019). Desde entonces se ha reportado su presencia en las provincias de Imbabura, Carchi, Pichincha y Cotopaxi, asociándose con brotes esporádicos de PMP en Tungurahua, Bolívar y Chimborazo. Por lo cual se aconseja evitar la movilización de material vegetal entre provincias, para evitar la diseminación de patógenos y plagas en las provincias del sur del país como Azuay, Cañar y Loja, donde se ha reportado la ausencia tanto de PMP como de *B. cockerelli* (Castillo Carrillo, 2019). Es importante recalcar que en Ecuador antes del presente año, 2020, no existía ningún reporte de CaLso ni en cultivos de solanáceas, ni en su insecto vector *B. cockerelli*. Sin embargo, los resultados de la presente investigación confirman la presencia de CaLso

en la muestra 23, la cual corresponde a un psílido colectado en la provincia de Imbabura en octubre de 2019 (Anexo 1). Dichos resultados concuerdan con los reportados por Caicedo et al. (2020), quien determinó la presencia de CaLso en Pichincha, tanto en plantas de papa como en adultos de *B. cockerelli*.

La amplificación mediante PCR convencional del gen ITS para identificar a los insectos de la especie *T. triozae* mediante los cebadores ITS5-Ttr/ RNA2-Ttr, permite obtener un fragmento de alrededor de 780bp (Castillo Carrillo et al., 2016). En la Figura 6 se pueden observar bandas de aproximadamente 780bp, siendo más intensa la banda de la muestra 21*R, cuyo ADN se extrajo con RPEX con comparación con las muestras 21*K y 22*K, cuyo ADN se extrajo con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA). No obstante, no se pudo aseverar que la reacción de PCR realmente permitiera identificar especies de *T. triozae* debido a que no se contó con un control positivo. Únicamente se pudo descartar la contaminación de la reacción gracias a que el control negativo no presentó ninguna banda.

La secuenciación Sanger de los fragmentos COI e ITS amplificados para insectos presuntamente identificados como *B. cockerelli* y *T. triozae* respectivamente, permitió corroborar la identidad de los 26 especímenes del psílido de la papa. Sin embargo, también reveló que las secuencias de los tres insectos considerados como *T. triozae* se relacionan con la especie *Diglyphus isaea* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) con identidades superiores al 79% (ver Tabla 10). Al igual que *T. triozae*, los especímenes de *D. isaea* también son parasitoides pertenecientes al orden Hymenoptera y la familia Eulophidae. No obstante, *T. triozae* es miembro de la subfamilia Tetrastichinae y del género *Tamarixia*, mientras que *D. isaea* pertenece a la subfamilia Eulophinae y al género *Diglyphus* (Muchemi et al., 2018b; Yefremova, 2015). Las pequeñas avispa parásitas que pertenecen a la familia Eulophidae miden alrededor de 0.5-2.0mm y parasitan principalmente los estados larvales de los órdenes

Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera. Por lo cual, muchos de estos ectoparasitoides se han usado exitosamente como agentes de control biológico en cultivos de frutas, plantas ornamentales y hortalizas (Muchemi et al., 2018a; Yefremova, 2015).

El parasitoide *D. isaea* se caracteriza por parasitar las larvas de los minadores de hojas (*Liriomyza* spp.) en cultivos de tomate y plantas ornamentales. Este insecto es usado como agente de control biológico en Estados Unidos y varios países de Europa, Sudáfrica y Asia (Lomeli-Flores et al., 2016; Musundire et al., 2012). Morfológicamente *D. isaea* es semejante a *T. triozae* debido a que ambos especímenes son ectoparásitos de la misma familia. A pesar de ello, algunas características claves para distinguir fenotípicamente a *D. isaea* son el color metálico de los especímenes y las antenas masculinas de setas cortas, ya que *T. triozae* es siempre no metálico y los machos presentan antenas con setas muy largas (Hansson & Navone, 2017). Ambas especies se han reportado en países de Europa, América del Norte y Centroamérica (Castillo Carrillo et al., 2016; Hansson & Navone, 2017; Luna-Cruz et al., 2015; Zhang et al., 2012). Sin embargo, *D. isaea* es la única que se ha reportado oficialmente en países de Sudamérica como Brasil (Carvalho et al., 2011).

Dichos reportes de *D. isaea* en América del Sur permiten inferir la posibilidad de encontrar los mismos especímenes en Ecuador. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante el algoritmo BLASTN donde tres insectos se asocian con la especie *D. isaea*. La correcta identificación de insectos a nivel de especie según sus características morfológicas presenta una serie de obstáculos. Entre los cuales destacan la plasticidad fenotípica, la presencia de especies crípticas y la disponibilidad de claves taxonómicas solo para ciertos estadios (Murugan et al., 2015). Además, para una identificación certera se requiere de un taxónomo experto, cuyo trabajo también se ve dificultado cuando se trabaja con altas densidades de insectos que deben ser

caracterizados y clasificados. Por lo que el proceso de identificación fenotípica se considera una tarea compleja y laboriosa que debe apoyarse necesariamente en la genómica de insectos para que se puedan generar resultados fiables (Matos-Maraví et al., 2019).

Sumado a la dificultad del proceso de identificación morfológica, la recolecta y preservación de los insectos también juega un rol fundamental para dilucidar la especie de un insecto. Ya que debido al pequeño tamaño y fragilidad de ciertas especies es común que se produzcan roturas de alas, cabezas u otros apéndices del insecto. Influyendo también el porcentaje de alcohol en el cual son preservadas las muestras, ya que se ha demostrado que a mayores concentraciones de alcohol se preserva mejor el ADN, pero se afecta más la integridad física de los especímenes. Lo cual afecta directamente el proceso de pre-identificación de los insectos (Marquina et al., 2020). Debido a que las muestras identificadas morfológicamente como *T. triozae* eran parte de un pool de múltiples insectos y sus características fenotípicas son similares a *D. isaea*, es probable que se haya realizado una pre-identificación errónea de los 3 insectos analizados en este estudio.

Para la identificación de haplotipos de *B. cockerelli* se ha sugerido analizar los polimorfismos presentes en el genoma mitocondrial completo. No obstante, dicho enfoque no es práctico cuando se trabaja con poblaciones elevadas, donde además de existir un alto número de muestras, también se pueden presentar regiones del ADN mitocondrial poco variables (Wu et al., 2016). Por lo cual, es recomendable definir los haplotipos empleando segmentos variables e informativos. En dicho campo, el empleo del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), ha permitido el estudio de la genética de poblaciones. Lo cual se debe a su variabilidad respecto a especies estrechamente relacionadas, así como en poblaciones que pertenecen a la misma especie. La determinación de los haplotipos de *B. cockerelli* analizando una secuencia de 500bp del

gen COI, ha facilitado el reconocimiento de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) entre los cuatro haplotipos reportados como Occidental, Central, Noroccidental y Suroccidental (Crosslin et al., 2013b; Swisher et al., 2012, 2014).

Como se observa en la Figura 7, los veinte y seis psíidos de la papa, representados por la secuencia de la muestra A2, tienen una identidad del 100% con respecto a las secuencias del haplotipo Central registradas en Pichincha (MK054304.1) y Nebraska (JQ708094.1). Lo cual también se puede evidenciar gráficamente mediante el árbol filogenético de la Figura 8, donde la muestra A2 se agrupa en un mismo clado con los haplotipos Central de Nebraska y Pichincha. Resultados que concuerdan con las investigaciones de Castillo Carrillo et al. (2019), quien reportó la presencia del haplotipo Central de *B. cockerelli* en Pichincha, mediante el análisis de la secuencia de un fragmento de 470bp del gen COI. En su investigación determinó que, con excepción de dos muestras, todas las secuencias de los psíidos colectados eran idénticas en un 100% al haplotipo Central reportado en Nebraska (JQ708094.1). Entre las otras dos muestras con una identidad del 99%, una presentó una base ambigua “N” y la otra presentó dos sitios de delección, lo cual podría sugerir que dicha muestra pertenece a una población diferente (Castillo Carrillo et al., 2019).

Gracias a que la región de 500bp del gen COI se localiza en una de las regiones más conservadas del mitogenoma, nuevas poblaciones pueden describirse por la presencia de SNPs (Wu et al., 2016). Sin embargo, antes de determinar un nuevo haplotipo se sugieren ensayos complementarios como el empleo de enzimas de restricción para la discriminación de haplotipos, análisis de fusión de alta resolución y la búsqueda de SNPs en porciones más variables del genoma mitocondrial de *B. cockerelli* (Swisher et al., 2012, 2014; Wu et al., 2016). Considerando que aún no se han definido las características biológicas del haplotipo Suroccidental. Se ha demostrado que variaciones presentes en la región COI de los otros tres haplotipos se

correlacionan con diferencias biológicas en los insectos. Entre ellas destacan índices diferentes de supervivencia, mejor resistencia a los pesticidas por parte del haplotipo Occidental y la infertilidad del haplotipo Noroccidental al reproducirse con especímenes de los haplotipos Central y Occidental (Liu et al., 2006; López, 2012; Mustafa et al., 2015). Lo cual se asocia con la mayor variación genética que presenta el haplotipo Noroccidental. Ya que se ha identificado que dicho haplotipo posee 16, 17 y 15 SNPs en relación al haplotipo Central, Occidental y Suroccidental respectivamente. Mientras que el haplotipo Suroccidental tiene 6 y 7 SNPs respecto a los haplotipos Central y Occidental. Por otra parte, los haplotipos Occidental y Central son diferentes por un único SNP (Swisher et al., 2012, 2014). Relación que se puede corroborar en el árbol filogenético de la Figura 8, donde se observa que el haplotipo Occidental es el más cercano genéticamente al haplotipo Central, seguido del haplotipo Suroccidental y Noroccidental respectivamente.

Ensayos han demostrado que el haplotipo Central de *B. cockerelli* se correlaciona con un mayor índice de desarrollo y supervivencia en comparación con los haplotipos Occidental y Noroccidental (Liu & Trumble, 2007). La presencia de este haplotipo se ha registrado en países como Nicaragua, Honduras, El Salvador y México (Swisher, Arp, et al., 2013). Se presume que la migración de esta plaga se ve impulsada por el viento, aunque su dispersión en países como Nueva Zelanda se asocian con la introducción accidental del psílido debido a intervenciones antropogénicas (Thomas et al., 2011). Es posible que la presencia del haplotipo Central de *B. cockerelli* en Ecuador se deba a una introducción accidental desde los países de América Central, en los cuales también se ha reportado este haplotipo (Caicedo et al., 2020; Swisher, Arp, et al., 2013). Los resultados obtenidos soportan la importancia de la identificación molecular de insectos como un apoyo al enfoque tradicional basado en las características fenotípicas. Ya que además de constatar la identidad de insectos posiblemente mal

identificados, los ensayos genéticos de la entomofauna permiten la caracterización molecular de posibles vectores y la detección oportuna de fitopatógenos. Tal es el caso de *B. cockerelli*, el cual además de transmitir CaLso, también se ha relacionado con lotes de plantas enfermas con la PMP, por lo cual se presume que esta plaga, también es un vector potencial de fitoplasmas (Rubio Covarrubias et al., 2011, 2013).

Esta investigación ha permitido determinar que el haplotipo de los especímenes de *B. cockerelli* colectados en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura pertenecen al haplotipo Central y ha posibilitado la detección positiva de CaLso en uno de ellos. Estos resultados aportan información relevante al monitoreo del psílido de la papa, ya que han permitido constatar la genética de las poblaciones presentes en el país y la presencia de uno de los fitopatógenos que transmite. Conocimiento indispensable para una comprensión total de la biología de sus poblaciones y la consecuente elaboración de estrategias efectivas para reducir los focos de infestación de esta plaga (Butler & Trumble, 2012b; Mustafa et al., 2015). Por otra parte, en el presente estudio se reportó que la identidad de las tres secuencias de los insectos presuntamente identificados como *Tamarixia triozae* se asocia con la especie *Diglyphus isaea*, la cual es capaz de controlar otras plagas como los minadores de hojas. Sin embargo, se requieren más ensayos moleculares para determinar su presencia. Dejando también en evidencia la necesidad de continuar con la identificación molecular de enemigos naturales de *B. cockerelli*. Los cuales podrían ser implementados en programas para el manejo integrado de plagas, ofreciendo alternativas para reducir el uso desmedido de plaguicidas que contaminan el medio ambiente, afectan a los insectos benéficos y generan resistencia en los vectores (Butler & Trumble, 2012a; Olaniyan et al., 2020).

Capítulo VI: Conclusiones

Mediante ensayos moleculares y el uso de herramientas bioinformáticas se caracterizó molecularmente una muestra de 26 psílicos de la papa, determinando que todos los insectos corresponden al haplotipo Central de *B. cockerelli*.

La técnica de PCR convencional permitió una validación exitosa del ADN extraído de los psílicos de la papa, así como la detección de la presencia de CaLso en un espécimen de *B. cockerelli*, colectado en la provincia de Imbabura, en la localidad de Tunibamba.

Gracias al análisis de las secuencias de los insectos identificados morfológicamente como el parasitoide *Tamarixia triozae*, se pudo esclarecer que la identidad de los insectos colectados se relaciona con *Diglyphus isaea*, el cual es un enemigo natural de los minadores de hojas (*Liriomyza* spp.)

Capítulo VII: Recomendaciones

Caracterizar molecularmente una población mayor de *B. cockerelli* utilizando métodos complementarios como ensayos con enzimas de restricción o análisis de fusión de alta resolución.

Durante los ensayos de PCR tratar de incorporar siempre un control positivo de los insectos que se pretenden identificar, puesto que sin este control el análisis de los fragmentos diana se vuelve ambiguo y sujeto a la interpretación del observador.

En futuros análisis genéticos de *B. cockerelli* se recomienda el empleo de tecnologías más avanzadas, como la secuenciación masiva para analizar varios genes del mitogenoma de los psílicos de la papa.

Se recomienda realizar monitoreos periódicos de la entomofauna presente en los cultivos de papa, a fin de analizar los posibles vectores de fitopatógenos y desarrollar estrategias oportunas para su control.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abdullah, N. M. M. (2008). Life history of the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera : Psyllidae) in Controlled Environment agriculture in Arizona. *African Journal of Agricultural Research*, 3(1), 60–67.
<http://www.academicjournals.org/AJAR>
- Al-ghaithi, A. G., Al-subhi, A. M., Al-mahmooli, I. H., & Al-sadi, A. M. (2018). Genetic analysis of ‘ Candidatus Phytoplasma aurantifolia ’ associated with witches ’ broom on acid lime trees. *PeerJ*, 6:e4480. <https://doi.org/10.7717/peerj.4480>
- Almeyda-León, I., Sánchez-Salas, J., & Garzón-Tiznado, J. (2008). Vectores causantes de punta morada de la pala en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica En México*, 34(2), 141–150. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=608/60834201>
- Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83(3), 481–491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- BCE. (2019). Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario. *Banco Central Del Ecuador*, 92–IV, 6.
http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/minero/reporte_coyuntura_mineria_nacional_0514.pdf
- Blood, H., Richards, B., & Wann, F. B. (1933). Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology*, 23(11), 930.
- Borges, K. M., Cooper, W. R., Garczynski, S. F., Thinakaran, J., Jensen, A. S., Horton, D. R., Munyaneza, J. E., Cueva, I., & Barcenas, N. M. (2017). “Candidatus liberibacter solanacearum” associated with the psyllid, *bactericera maculipennis* (Hemiptera: Triozidae). *Environmental Entomology*, 46(2), 210–216.
<https://doi.org/10.1093/ee/nvw174>

- Butler, C. D., & Trumble, J. T. (2012a). Identification and impact of natural enemies of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in Southern California. *Journal of Economic Entomology*, *105*(5), 1509–1519. <https://doi.org/10.1603/EC12051>
- Butler, C. D., & Trumble, J. T. (2012b). The potato psyllid , *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera : Triozidae): life history, relationship to plant diseases , and management strategies. *Terrestrial Arthropod Reviews* *5*, *5*, 87–111. <https://doi.org/10.1163/187498312X634266>
- Caicedo, J., Crizón, M., Pozo, A., Cevallos, A., Simbaña, L., Rivera, L., & Arahana, V. (2015). First report of ' Candidatus Phytoplasma aurantifolia' (16SrII) associated with potato purple top in San Gabriel-Carchi, Ecuador . *New Disease Reports*, *32*(November), 20. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.020>
- Caicedo, J., Simbaña, L., Calderón, D., Lalangui, K., & Rivera-Vargas, L. (2020). First report of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in Ecuador and in South America. *Australasian Plant Disease Notes*, *15*(1), 10–12. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-0375-0>
- Cameron, P. J., Wigley, P. J., Charuchinda, B., Walker, G. P., & Wallace, A. R. (2013). Farm-scale dispersal of *Bactericera cockerelli* in potato crops measured using Bt mark-capture techniques. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *148*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1111/eea.12085>
- Carter, W. (1952). Injuries to plants caused by insect toxins. II. *The Botanical Review*, *18*(10), 680–721. <https://doi.org/10.1007/BF02957557>
- Carvalho, A., Bueno, V., Silva, D., & Costa, V. (2011). Record of *Diglyphus* Walker (Hymenoptera: Eulophidae) Species in Brazil. *Neotropical Entomology*, *40*(2), 290–291. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2011000200023>

- Castillo Carrillo, C. (2019). *Punta morada de papa en Ecuador, actualidad*. Artículos Del VIII Congreso de La Papa Ecuatoriana-2019.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5346/1/iniapsc382a.pdf>
- Castillo Carrillo, C., Fu, Z., & Burckhardt, D. (2019). First record of the tomato potato Psyllid *Bactericera Cockerelli* from South America. *Bulletin of Insectology*, 72(1), 85–91.
- Castillo Carrillo, C., Fu, Z., Jensen, A. S., & Snyder, W. E. (2016). Arthropod Pests and Predators Associated with Bittersweet Nightshade, a Noncrop Host of the Potato Psyllid (Hemiptera: Triozidae). *Environmental Entomology*, 45(4), 873–882.
<https://doi.org/10.1093/ee/nvw072>
- Castillo Carrillo, C., Paltrinieri, S., Bustamante, J. B., & Bertaccini, A. (2018). Detection and molecular characterization of a 16Srl-F phytoplasma in potato showing purple top disease in Ecuador. *Australasian Plant Pathology*, 47(3), 311–315.
<https://doi.org/10.1007/s13313-018-0557-9>
- Cerda Granados, D., & Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro*, 94, 82–92.
<https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i94.1089>
- Cerna, E., Ail, C., Landeros, J., Sánchez, S., Badii, M., Aguirre, L., & Ochoa, Y. (2012). Comparacion de la toxicidad y selectividad de insecticidas para la plaga. In *Agrociencia* (Vol. 46, Issue 8). ISSN 2521-9766
- Cerna, E., Ochoa, Y., Aguirre, L., Flores, M., & Landeros, J. (2013). Determinación de la resistencia a insecticidas en cuatro poblaciones del psílido de la papa *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Triozidae) Determination of insecticide resistance in four populations of potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Su. *Revista Internacional de*

Botánica Experimental, 9457(82), 63–68.

Cooper, W. R., Swisher, K. D., Garczynski, S. F., Mustafa, T., Munyaneza, J. E., & Horton, D. R. (2015). Wolbachia Infection Differs among Divergent Mitochondrial Haplotypes of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(2), 137–145.

<https://doi.org/10.1093/aesa/sau048>

Crizón, M. (2017). *Identificación molecular del fitoplasma causante de la punta morada de la papa y ensayos de resistencia sistémica adquirida* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/13057>

Crosslin, J. M., Lin, H., & Munyaneza, J. E. (2011). Detection of “*Candidatus liberibacter solanacearum*” in the potato psyllid, *bactericera cockerelli* (Sulc), by conventional and real-time PCR. *Southwestern Entomologist*, 36(2), 125–135.

<https://doi.org/10.3958/059.036.0202>

Crosslin, J. M., Swisher, K. D., & Hamlin, L. L. (2013a). A rapid method for preparation of nucleic acid extracts from potato psyllids¹ for detection of “*Candidatus Liberibacter Solancearum*” and molecular analysis. *Southwestern Entomologist*, 38(1), 41–48. <https://doi.org/10.3958/059.038.0112>

Crosslin, J. M., Swisher, K. D., & Hamlin, L. L. (2013b). A rapid method for preparation of nucleic acid extracts from potato psyllids¹ for detection of “*Candidatus Liberibacter Solancearum*” and molecular analysis. *Southwestern Entomologist*, 38(1), 41–48. <https://doi.org/10.3958/059.038.0112>

Crosslin, J. M., Vandemark, G. J., & Munyaneza, J. E. (2006). Development of a real-time, quantitative PCR for detection of the columbia basin potato purple top phytoplasma in plants and beet leafhoppers. *Plant Disease*, 90(5), 663–667.

<https://doi.org/10.1094/PD-90-0663>

Cuesta, X., Peñaherrera, D., Velásquez, J., & Castillo, C. (2018). *Guía de manejo de la punta morada de la papa. Manual Técnico No. 104.*

<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5345/1/iniapscmt104.pdf>

Dahan, J., Wenninger, E. J., Thompson, B. D., Eid, S., Olsen, N., & Karasev, A. V. (2019). Prevalence of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” Haplotypes in Potato Tubers and Psyllid Vectors in Idaho From 2012 to 2018. *Plant Disease*, 103(10), 2587–2591. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2113-RE>

Dahan, J., Wenninger, E. J., Thompson, B., Eid, S., Olsen, N., & Karasev, A. V. (2017). Relative abundance of potato psyllid haplotypes in southern idaho potato fields during 2012 to 2015, and incidence of ‘*candidatus liberibacter solanacearum*’ causing zebra chip disease. *Plant Disease*, 101(5), 822–829.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0668-RE>

Dalgo, M. (2020). *Evaluación de un sistema de manejo integrado de *Bactericera cockerelli* y su relación con punta morada de la papa en Tumbaco, Pichincha* [Univerdad Central del Ecuador].

<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/21455>

Davis, T. S., Horton, D. R., Munyaneza, J. E., & Landolt, P. J. (2012). Experimental Infection of Plants with an Herbivore-Associated Bacterial Endosymbiont Influences Herbivore Host Selection Behavior. *PLoS ONE*, 7(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049330>

Delgado-Ortiz, J. C., Beltrán-Beache, M., Cerna-Chávez, E., Aguirre-Uribe, L. A., Landero-Flores, J., Rodríguez-Pagaza, Y., & Ochoa-Fuentes, Y. M. (2019). *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas:

- Diagnóstico y control. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1–12. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177>
- Devaux, A., Ordinola, M., Hibon, A., & Flores, R. (2010). *El sector papa en la región andina : diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú)*.
- Djaman, K., Higgins, C., Begay, S., Koudahe, K., Allen, S., Lombard, K., & Neill, M. O. (2020). Seasonal Occurrence of Potato Psyllid (*Bactericera cockerelli*) and Risk of Zebra Chip Pathogen (*Candidatus Liberibacter Solanacearum*) in Northwestern New Mexico. *Insects*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/insects11010003>
- EPPO. (2013). *Bactericera cockerelli*. *EPPO Bulletin*, 43(2), 202–208. <https://doi.org/10.1111/epp.12044>
- EPPO. (2020). PM 7/143 (1) ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*.’ *EPPO Bulletin*, 50(1), 49–68. <https://doi.org/10.1111/epp.12611>
- Fox, J. C., Ait-Khaled, M., Webster, A., & Emery, V. C. (1991). Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? *Journal of Virological Methods*, 33(3), 375–382. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90037-Z](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90037-Z)
- Franca, L. T. C., Carrilho, E., & Kist, T. B. L. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(2), 169–200. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003797>
- Frias, A. A. T., Ibanez, F., Mendoza, A., Carvalho Nunes, W. M., & Tamborindeguy, C. (2020). Effects of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (haplotype B) on *Bactericera cockerelli* fitness and vitellogenesis. *Insect Science*, 27(1), 58–68. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12599>

- Gerónimo, E. (2018). Potencialización de extractos vegetales en el manejo de plagas tolerantes a plaguicidas sintéticos [Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. In *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/45755>
- Haapalainen, M., Wang, J., Latvala, S., Lehtonen, M. T., Pirhonen, M., & Nissinen, A. I. (2018). Genetic Variation of ' Candidatus Liberibacter solanacearum ' Haplotype C and Identification of a Novel Haplotype from *Trioza urticae* and Stinging Nettle. *Phytopathology*, *108*(8), 925–934. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0410-R>
- Hansson, C., & Navone, P. (2017). Review of the European species of *Diglyphus* Walker (Hymenoptera: Eulophidae) including the description of a new species. *Zootaxa*, *4269*(2), 197–229. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4269.2.2>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & DeWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(Suppl. 1), 96–99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Henne, D., & Rush, C. M. (2010). Movement of *Bactericera cockerelli* (Heteroptera: Psyllidae) in Relation to Potato Canopy Structure, and Effects on Potato Tuber Weights. *Journal of Economic Entomology*, *103*(5), 1524–1530. <https://doi.org/10.1603/EC10085>
- INEC. (2019). *Encuesta Nacional de Empleo, Desempleo y Subempleo (ENEMDU)*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/EMPLEO/2019/Diciembre/201912_Mercado_Laboral.pdf
- INEC. (2020). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019*. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Presentacion de los principales resultados ESPAC 2019.pdf

- Jakovljević, M., Jović, J., Krstić, O., Mitrović, M., Marinković, S., Toševski, I., & Cvrković, T. (2020). Diversity of phytoplasmas identified in the polyphagous leafhopper *Euscelis incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae) in Serbia: pathogen inventory, epidemiological significance and vectoring potential. *European Journal of Plant Pathology*, 156(1), 201–221. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01878-w>
- Jinbo, U., Kato, T., & Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14, 107–124. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>
- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* (pp. 1–14). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Knowlton, G. F., & Janes, J. (1931). Studies on the biology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Annals of the Entomological Society of America*, 24, 283–292. <https://doi.org/10.1093/aesa/24.2.283>
- Lee, I. M., Bottner, K. D., & Sun, M. (2009). An emerging potato purple top disease associated with a new 16SrIII group phytoplasma in Montana. *Plant Disease*, 93(9). <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0970B>
- Lewis, O. M., Michels, G. J., Pierson, E. A., & Heinz, K. M. (2015). A Predictive Degree Day Model for the Development of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) Infesting *Solanum tuberosum*. *Environmental Entomology*, 44(4), 1201–1209. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv078>

- Liefting, L., Perez-Egusquiza, Z., Clover, G. R. G., & Anderson, J. A. D. (2008). A New 'Candidatus Liberibacter' Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease*, 92(10), 1474. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1474A>
- Liefting, L., Sutherland, P., Ward, L., Paice, K., Weir, B., & Clover, G. (2009). A new "Candidatus Liberibacter" species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*, 93(3), 208–214. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0208>
- Liefting, L., Veerakone, S., Ward, L., & Clover. (2009). First report of "Candidatus phytoplasma australiense" in potato. *Plant Disease*, 93(9). <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0969A>
- Liu, D., Johnson, L., & Trumble, J. (2006). Differential responses to feeding by the tomato/potato psyllid between two tomato cultivars and their implications in establishment of injury levels and potential of damaged plant recovery. *Insect Science*, 13, 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2006.00082.x>
- Liu, D., & Trumble, J. T. (2007). Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123, 35–42. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00521.x>
- Lomeli-Flores, J. R., Rodríguez-Leyva, E., & Torres-Ruíz, A. (2016). *Control biológico de plagas en la agricultura protegida en México* (J. R. Lomeli-Flores & H. González-Hernández (eds.)). Memorias XXVII Curso Nacional de Control Biológico, Guadalajara, Jalisco. <https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Lomeli-Flores-2016-Biocontrol-in-protected-agriculture.pdf>
- López, B. (2012). *Variación genética de Bactericera cockerelli (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) en las zonas paperas de México* [Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/3024>

- Luna-Cruz, A., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., Ortega-Arenas, L. D., Bautista-Martínez, N., & Pineda, S. (2015). Toxicity and residual activity of insecticides against *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Journal of Economic Entomology*, *108*(5), 2289–2295. <https://doi.org/10.1093/jee/tov206>
- Luo, A., Zhang, A., Ho, S. Y., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., Cameron, S. L., & Zhu, C. (2011). *Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-84>
- MAG. (2019). *Informe de Rendimientos Objetivos Papa 2019*. http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/papa/rendimiento_papa_2019.pdf
- Marquina, D., Ronquist, F., & Piotr, Ł. (2020). The effect of ethanol concentration on the preservation of insects for biodiversity studies. *BioRxiv*, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.03.05.978288>
- Martinez, A. M., Chavarrieta, J. M., Morales, S. I., Caudillo, K. B., Figueroa, J. I., Diaz, O., Bujanos, R., Gomez, B., Viñuela, E., & Pineda, S. (2015). Behavior of *tamarixia triozae* females (Hymenoptera: Eulophidae) attacking *bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) and effects of three pesticides on this parasitoid. *Environmental Entomology*, *44*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1093/ee/nvu015>
- Matos-Maraví, P., Ritter, C. D., Barnes, C. J., Nielsen, M., Olsson, U., Wahlberg, N., Marquina, D., Sääksjärvi, I., & Antonelli, A. (2019). Biodiversity seen through the perspective of insects: 10 simple rules on methodological choices and experimental design for genomic studies. *PeerJ*, *2019*(4), 1–31. <https://doi.org/10.7717/peerj.6727>

- Mejía, A. (2017). *Pérdidas poscosecha en la cadena de valor del rubro papa, un estudio de caso en la provincia del Carchi* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador].
<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/14224>
- Mirmajlessi, S. M., Sjölund, M. J., Mänd, M., Loiseau, M., Ilardi, V., Haesaert, G., Karise, R., Gottsberger, R. A., Sumner-Kalkun, J., & Bertaccini, A. (2019). PCR-based diagnostic methods for 'Candidatus Liberibacter solanacearum' - Review. *Plant Protection Science*, 55(4), 229–242. <https://doi.org/10.17221/145/2018-PPS>
- Muchemi, S. K., Zebitz, C. P. W., Borgemeister, C., Akutse, K. S., Foba, C. N., Ekesi, S., & Fiaboe, K. K. M. (2018a). Interaction between *Chrysocharis flacilla* and *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae), Two Parasitoids of *Liriomyza* Leafminers. *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 556–563.
<https://doi.org/10.1093/jee/toy007>
- Muchemi, S. K., Zebitz, C. P. W., Borgemeister, C., Akutse, K. S., Foba, C. N., Ekesi, S., & Fiaboe, K. K. M. (2018b). Interaction between Two Leafminer Parasitoids, *Halticoptera arduine* (Hymenoptera: Pteromalidae) and *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae), in the Management of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Environmental Entomology*, 47(3), 692–699.
<https://doi.org/10.1093/ee/nvy051>
- Munyanzeza, J. E. (2015). Zebra Chip Disease, Candidatus Liberibacter, and Potato Psyllid: A Global Threat to the Potato Industry. *American Journal of Potato Research*, 92(2), 230–235. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9448-6>
- Munyanzeza, J. E., Crosslin, J. M., Upton, J. E., & Buchman, J. L. (2010). Incidence of the beet leafhopper-transmitted virescence agent phytoplasma in local populations of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus*, in Washington State. *Journal of Insect*

Science, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1673/031.010.1801>

Munyaneza, J. E., Fisher, T. W., & Sengoda, V. G. (2014). Association of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” With the Psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1061–1066. <https://doi.org/10.1603/EC10027>

Murugan, K., Vadivalagan, C., Karthika, P., Wei, H., Aziz, A. T., Alsalhi, M. S., & Devanesan, S. (2015). DNA barcoding and molecular evolution of mosquito vectors of medical and veterinary importance. *Parasitology Research*, 115(1), 107–121. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4726-2>

Mustafa, T. (2014). *Comparative biology of potato psyllid, Bactericera cockerelli (Hemiptera: Triozidae), haplotypes* [Washington State University]. https://research.wsulibs.wsu.edu/xmlui/bitstream/handle/2376/5408/Mustafa_wsu_0251E_11215.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Mustafa, T., Horton, D. R., Cooper, W. R., Swisher, K. D., & Zack, R. S. (2015). Interhaplotype Fertility and Effects of Host Plant on Reproductive Traits of Three Haplotypes of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Environmental Entomology*, 44(2), 300–308. <https://doi.org/10.1093/ee/nvu029>

Musundire, R., Chabi-Olaye, A., Salifu, D., & Krüger, K. (2012). Host plant-related parasitism and host feeding activities of *diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae) on *liriomyza huidobrensis*, *liriomyza sativae*, and *liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 161–168. <https://doi.org/10.1603/EC10420>

Nagoshi, R. N., Brambila, J., & Meagher, R. L. (2011). Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm *Spodoptera* species in Florida. *Journal of Insect Science*,

11(154), 1–11. <https://doi.org/10.1673/031.011.15401>

- Olaniyan, O., Rodríguez-gasol, N., Cayla, N., Michaud, E., & Wratten, D. (2020). *Bactericera cockerelli* (Sulc), a potential threat to China's potato industry. *Journal of Integrative Agriculture*, *19*(2), 338–349. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62754-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62754-1)
- Omar, A. F., Aljmhan, K. A., Alsohim, A. S., & Pérez-López, E. (2018). Potato purple top disease associated with the novel subgroup 16SrII-X phytoplasma. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(11), 3678–3682. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003033>
- Pagliari, L., & Musetti, R. (2019). Phytoplasmas: An Introduction. In R. Musetti & P. Laura (Eds.), *Phytoplasmas. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1875, pp. 1–6). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8837-2_1
- Paydar, S., Ucar, E., Yari, P., Safavi, S. M., Kahrizi, D., Nateqi, M., Mirmoayedi, A., & Yari, K. (2018). A simplified and optimized protocol for total DNA extraction from insect species: Applicable for studying genetic diversity and PCR-based specimen identification via partial amplification of cytochrome oxidase I (COI) gene. *Cellular and Molecular Biology*, *64*(12), 22–25. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.12.5>
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. (2011). DNA Barcode of Life: An Introduction and Perspective. *Acta Biológica Colombiana*, *16*(3), 161–175. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000300011
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A., & John, P. (2008). A Brief Comparison Between In Vivo DNA Replication and In Vitro PCR Amplification. In *Principles and Technical*

Aspects of PCR Amplification (pp. 9–15). Springer Netherlands.

https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4_2

Ramírez-Dávila, J., Porcayo-Camargo, E., Sánchez-Pale, J., & Vázquez-García, L.

(2012). Spatial Behavior Comparison of *Bactericera cockerelli* Sulc. (Hemiptera: Triozidae) in Mexico. *Neotrop Entomol*, 41, 9–16. <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0019-y>

Ramírez Gomez, M., Santamaria Cesar, E., Mendez Rivera, J. S., Rios Flores, J. L.,

Hernandez Salgado, J. R., & Pedro Mendez, J. G. (2008). *Evaluacion de insecticidas alternativos para el control de Paratrioza (Bactericera cockerelli B.y L.) (Homoptera: Triozidae) en el cultivo de chile jalapeño (Capsicum annum L.)*.

Revista Chapingo Serie Zonas Áridas.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4555/455545066007>

Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., & Gross, D. C. (2011). Development of primers for improved pcr detection of the potato Zebra chip pathogen, “*Candidatus Liberibacter solanacearum*.” *Plant Disease*, 95(12), 1542–1546. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0386>

Rojas, P., Rodríguez-Leyva, E., Refugio Lomeli-Flores, J., & Liu, T. X. (2015). Biology

and life history of *Tamarixia triozae*, a parasitoid of the potato psyllid *Bactericera cockerelli*. *BioControl*, 60(1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9625-4>

Rubio Covarrubias, O. Á., Almeyda León, I. H., Cadena Hinojosa, M. A., & Lobato-

Sánchez, R. (2011). Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaerosus* en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(1), 17–28.

Rubio Covarrubias, O. Á., Almeyda León, I. H., Ireta Moreno, J., Sánchez Salas, J. A.,

- Fernández Sosa, R., Borbón Soto, J. T., Díaz Hernández, C., Garzón Tiznado, J. A., Rocha Rodríguez, R., & Cadena Hinojosa, M. A. (2006). Distribución de la punta morada y “*Bactericera cockerelli*” Sulc. en las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura Técnica En México*, 32(2), 201–211.
- Rubio Covarrubias, O. Á., Cadena Hinojosa, M. A., & Vázquez Carillo, M. G. (2013). *Manejo integrado de la punta morada de la papa en el Estado de México. Folleto Técnico Núm. 2*. INIFAP-CIRCE Campo Experimental Valle de México. Sitio Experimental Metepec. <https://doi.org/10.13140/2.1.3912.0967>
- Ruíz Sesma, B., Rojas Martínez, R., Ruiz Hernández, H., Mendoza Nazar, P., Oliva Llaven, M., Ibarra Martínez, C., Aguilar Tipacamu, G., Herrera Haro, J., Hernández Garay, A., Sanzon Gómez, D., Bautista Trujillo, G., Ruiz Moreno, A., & Medina Sanzon, L. (2010). Extracción y cuantificación de ADN de pajillas de semen bovino criopreservado. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 103–108.
- Sandanayaka, W. R. M., Moreno, A., Tooman, L. K., Page-Weir, N. E. M., & Fereres, A. (2014). Stylet penetration activities linked to the acquisition and inoculation of *Candidatus Liberibacter solanacearum* by its vector tomato potato psyllid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(2), 170–181. <https://doi.org/10.1111/eea.12179>
- Secor, G. A., Rivera, V. V., Abad, J. A., Lee, I. M., Clover, G. R. G., Liefiting, L. W., Li, X., & De Boer, S. H. (2009). Association of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease*, 93(6), 574–583. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0574>
- Swisher, K. D., Arp, A. P., Bextine, B. R., Álvarez, E. Y. A., Crosslin, J. M., &

- Munyaneza, J. E. (2013). Haplotyping the potato psyllid, *bactericera cockerelli*, in Mexico and central America. *Southwestern Entomologist*, *38*(2), 201–208.
<https://doi.org/10.3958/059.038.0205>
- Swisher, K. D., & Garczynski, S. F. (2019). Identification of a new haplotype of ‘Candidatus liberibacter solanacearum’ in *Solanum tuberosum*. *Plant Disease*, *103*(3), 468–474. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0937-RE>
- Swisher, K. D., Henne, D. C., & Crosslin, J. M. (2014). Identification of a fourth haplotype of *bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in the United States. *Journal of Insect Science*, *14*(2006), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu023>
- Swisher, K. D., Munyaneza, J. E., & Crosslin, J. M. (2012). High resolution melting analysis of the cytochrome oxidase i gene identifies three haplotypes of the potato psyllid in the United States. *Environmental Entomology*, *41*(4), 1019–1028.
<https://doi.org/10.1603/EN12066>
- Swisher, K. D., Munyaneza, J. E., & Crosslin, J. M. (2013). Temporal and spatial analysis of potato psyllid haplotypes in the United States. *Environmental Entomology*, *42*(2), 381–393. <https://doi.org/10.1603/EN12261>
- Tahir, H. M., Noor, A., Mehmood, S., Sherawat, M. S., & Qazi, M. A. (2018). Evaluating the accuracy of morphological identification of insect pests of rice crops using DNA barcoding. *Mitochondrial DNA Part B*, *3*(2), 1220–1224.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1532334>
- Taramuel, X. (2017). Evaluación del peso del tubérculo y densidad de siembra en la producción de semilla registrada de papa (*Solanum tuberosum* L.) Variedad “superchola” en la granja Yuyucocha, Ibarra [Universidad Técnica del Norte Facultad]. In *Universidad Técnica del Norte*.

<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/7447/2/ARTICULO.pdf>

- Thinakaran, J., Pierson, E. A., Longnecker, M., Tamborindeguy, C., Munyaneza, J. E., Rush, C. M., & Henne, D. C. (2015). Settling and Ovipositional Behavior of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) on Solanaceous Hosts Under Field and Laboratory Conditions. *Journal of Economic Entomology*, *108*(3), 904–916. <https://doi.org/10.1093/jee/tov058>
- Thomas, K. L., Jones, D. C., Kumarasinghe, L. B., Richmond, J. E., Gill, G. S. C., & Bullians, M. S. (2011). Investigation into the entry pathway for tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli*. *New Zealand Plant Protection*, *64*, 259–268.
- Vega-Gutiérrez, M. T., Rodríguez-Maciél, J. C., Díaz-Gómez, O., Bujamos-Muñiz, R., Mota-Sánchez, D., Martínez-Carrillo, J. L., Lagunes-Tejeda, Á., & Garzón-Tiznado, J. A. (2008). Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones Mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Agrociencia*, *42*(4), 463–471.
- Vereijssen, J., Smith, G. R., & Weintraub, P. G. (2018). *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) and *Candidatus liberibacter solanacearum* in potatoes in New Zealand: Biology, transmission, and implications for management. *Journal of Integrated Pest Management*, *9*(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmy007>
- Wallis, R. L. (1995). Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. *USDA Technical Bulletin*, *1107*, 25. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.156862>
- Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L. T., & Martins, J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*-Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. *Annual Review of Phytopathology*, *55*(June), 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035513>

- Wenninger, E. J., Carroll, A., Dahan, J., Karasev, A. V., Thornton, M., Miller, J., Nolte, P., Olsen, N., & Price, W. (2017). Phenology of the Potato Psyllid , *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), and “ *Candidatus Liberibacter solanacearum* ” in Commercial Potato Fields in Idaho. *Environmental Entomology*, *46*(6), 1179–1188. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx158>
- Workman, P. J., & Whiteman, S. A. (2009). Importing *Tamarixia triozae* into containment in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, *62*, 412–412. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2009.62.4864>
- Wu, F., Cen, Y., Wallis, C. M., Trumble, J. T., Prager, S., Yokomi, R., Zheng, Z., Deng, X., Chen, J., & Liang, G. (2016). The Complete Mitochondrial Genome Sequence of *Bactericera cockerelli* and Comparison with Three Other Psylloidea Species. *PLOS ONE*, *11*(5), 2–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155318>
- Yang, X., Zhang, Y., Hua, L., & Liu, T.-X. (2010). Life History and Life Tables of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae) on Potato Under Laboratory and Field Conditions in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Journal of Economic Entomology*, *103*(5), 1729–1734. <https://doi.org/10.1603/EC10083>
- Yefremova, Z. A. (2015). An annotated checklist of the Eulophidae (excl. Tetrastichinae) (Hymenoptera: Chalcidoidea) of Israel. *Zootaxa*, *3957*(1), 1–36. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3957.1.1>
- Zhang, Y. M., Liu, T. X., Peng, L., Rojas, P., & Trumble, J. (2012). Risk Assessment of Selected Insecticides on *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a Parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera : Trizoidae). *Journal of Economic Entomology*, *105*(2), 490–496. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1603/EC11295>

Anexos