

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TÍTULO:
“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL RECEPTOR DE LA
VITELOGENIA EN
***Bactericera cockerelli* [Sulc, 1909] (HEMIPTERA:TRIOZIDAE)”**

Por


Olga Karina Villanueva Segura

Como requisito para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
ENTOMOLOGÍA MÉDICA

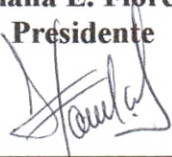
Noviembre, 2015

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL RECEPTOR
DE LA VITELOGENINA EN
Bactericera cockerelli [Sulc, 1909]
(HEMIPTERA: TRIOZIDAE)**

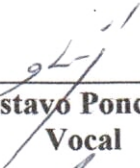
Comité de Tesis:




Dra. Adriana E. Flores Suárez
Presidente




Dra. Susana Favela Lara
Secretario



Dr. Gustavo Ponce García
Vocal



Dra. Elva T. Aréchiga Carvajal
Vocal



Dr. Humberto Quiroz Martínez
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca-manutención con el número de registro: 191608/167042.

Agradezco a la Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez por ser el asesor de esta tesis, además por haberme recibido en su laboratorio en el momento indicado; básicamente sin usted, este proyecto no hubiese podido realizarse. También, le doy las gracias por los consejos a nivel personal que me ha dado hasta la fecha, que han sido decisivos para mi formación.

A la Dra. Susana Favela Lara por el apoyo, consejos y guía durante el proceso de realización del presente proyecto, estuviste en el punto crítico del mismo.

Al Dr. Gustavo Ponce García, el doc, por ser asesor, tutor y director del comité doctoral de esta estudiante con mente dispada.

Al Dr. Refugio Lomelí Flores por la donación de los especímenes de *Bactericera cockerelli*

A la Dra. Elva T. Aréchiga Carvajal por las evaluaciones tutoriales y ser miembro de mi comité doctoral

Al Dr. Humberto Quiroz Martínez por formar parte del comité doctoral.

Al M.C. Iram Pablo Rodríguez Sánchez por la contribución para la realización de los experimentos, así como también por todas las veces que hemos trabajado juntos.

A los integrantes del laboratorio de Fisiología y Toxicología de Insectos: Beatriz López, Selene Gutiérrez, Martha López, Gerardo Trujillo, Franco Morales, Esteban Mora, Jesús Dávila, Yamili Contreras, Aaron.

A mis amigos que me han apoyado, animado, despejado muchas dudas experimentales y me mandaban artículos ó libros para la actualización del proyecto: Anadulce Hernández, Melisa Gómez, Ixchelt Cuaranta, Arturo Machuca, Gerardo Alvarado.

A mis amigos externos, que contribuyeron mucho para los momentos de diversión: Guadalupe Santiago, Nydia Rivas, Roberto de la Garza, Rodolfo Puente, Nancy Villarreal, Maribel Luna, Argentina Flores y Delia Reyna.

A todos aquellos que contribuyeron de una u otra forma para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres

Olga Segura Amaya
Oscar Villanueva Martínez

A mis hermanos

Katia Yasmín
Oscar de Jesús
Gladys Deyanira
Rolando Javier

A mi sobrina

Nahomi Yoselyn

*NADA ES ABSOLUTO. TODO CAMBIA, TODO SE MUEVE, TODO GIRA, TODO
VUELA Y DESAPARECE*

Frida Kahlo

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1.	Taxonomía <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc	3
2.1.1.	Distribución de <i>B. cockerelli</i> Sulc	3
2.1.2.	Hospederos	5
2.1.3.	Bionomía de <i>B. cockerelli</i> Sulc	5
2.1.4.	Daños ocasionados por <i>B. cockerelli</i> Sulc como plaga agrícola	8
2.2.	Control de <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc	11
2.2.1	Control Cultural	11
2.2.2.	Control Biológico	12
2.2.2.1.	Hongos entomopatógenos	14
2.2.3.	Control Químico	15
2.3.	Variación Genética de <i>B. cockerelli</i> Sulc	16
2.4.	Genómica en insectos.	17
2.5	Vitelogénesis en insectos	19
2.5.1.	Receptor de Vitelogenina	21
2.5.2.	Receptor de vitelogenina en <i>Blatella germanica</i> L	23
2.5.3.	Receptor de vitelogenina en <i>Spodoptera litura</i> Fabricius	24
2.5.4.	Receptor de vitelogenina en <i>Aedes aegypti</i> L	24
3	JUSTIFICACIÓN	25
4	HIPÓTESIS	26
5	OBJETIVO GENERAL	27
5.1.	Objetivos Particulares	27
6	MÉTODOS	28
6.1.	Área de Estudio	28
6.2.	Recolecta de especímenes de <i>B. cockerelli</i> Sulc	29
6.3.	Dimorfismo sexual en <i>B. cockerelli</i> Sulc	30
6.4.	Secuencias de los receptores de vitelogenina	30
6.5.	Diseño de los oligonucleótidos	32
6.6.	Protocolo de extracción de RNA total	33
6.7.	Cuantificación del RNA total	34
6.8.	Síntesis de DNAc	35
6.9.	Amplificación de la secuencia nucleotídica de β -actina y el receptor de vitelogenina	36
6.10.	Visualización de los productos amplificados en geles de agarosa	36
6.11.	Secuenciación de los productos amplificados	
6.12.	Análisis de las secuencias	
6.13.	Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión del receptor de vitelogenina y β -actina	37

6.14.	Análisis de resultados	38
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1.	Recolecta de especímenes de <i>B. cockerelli</i> Sulc	40
7.2.	Dimorfismo sexual en <i>B. cockerelli</i> Sulc	40
7.3.	Diseño de los oligonucleótidos	41
7.5	Protocolo de extracción de RNA total	42
7.6.	Cuantificación de los RNA's totales y síntesis de los DNAc	43
7.7.	Amplificación de la secuencia nucleotídica de β -actina y el receptor de vitelogenina	44
7.8.	Análisis de las secuencias obtenidas	47
7.9.	Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión del receptor de vitelogenina y β -actina	49
8	CONCLUSIONES	53
9	BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Fases y tiempo de desarrollo en <i>B. cockerelli</i> Sulc	7
Tabla 2.	Principales depredadores de <i>B. cockerelli</i> Sulc	12
Tabla 3.	Modo de acción de algunos productos para el control de <i>B. cockerelli</i>	15
Tabla 4.	Secuencias nucleotídicas de los receptores de vitelogenina en insectos	31
Tabla 5.	Secuencias nucleotídicas del gen β -actina en Insectos	32
Tabla 6.	Oligonucleótidos degenerados Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para el receptor de	33
Tabla 7.	vitelogenina y los endógenos	41
Tabla 8.	Cuantificaciones de RNA total de especímenes de <i>B. cockerelli</i>	43
Tabla 9.	Sondas y Oligonucleótidos para la cuantificación relativa, Applied Biosystems 4332078	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución geográfica de <i>B. cockerelli</i> en América.	4
Figura 2.	Ciclo de desarrollo de <i>B. cockerelli</i> .	6
Figura 3.	Plantas de papa <i>Solanum tuberosum</i> (L) con síntomas de amarillamiento del psílido	9
Figura 4.	Síntomas de "punta morada" en la papa	10
Figura 5.	Enfermedad de zebra chip El proceso de endocitosis mediada por receptor durante la vitelogenesis en mosquitos	11
Figura 6.	Diagrama esquemático del receptor de vitelogenina (VgR) en <i>Spodoptera litura</i>	20
Figura 7.	Diagrama esquemático del receptor de vitelogenina (VgR) en <i>Spodoptera litura</i>	21
Figura 8.	Representación esquemática de la ubicación del municipio de Galeana, en el estado de Nuevo León	29
Figura 9.	Especímenes de <i>B. cockerelli</i> Sulc en <i>Solanum lycopersicum</i> L	30
Figura 10.	Hembras y machos de <i>B. cockerelli</i> Sulc.	31
Figura 11.	Reacción de PCR cuantitativa para la detección del receptor de vitelogenina y β -actina	38
Figura 12.	Selección de especímenes en laboratorio de <i>B. cockerelli</i>	40
Figura 13.	Muestras de <i>B. cockerelli</i> Sulc clasificadas por dimorfismo sexual	41
Figura 14.	Extracción de RNA's total en diferentes especies de insectos	42
Figura 15.	Amplificación del gen β -actina mediante PCR	44
Figura 16.	Amplificación del receptor de vitelogenina mediante PCR con oligonucleótidos degenerados y específicos Diagrama esquemático del Blast de la secuencia de <i>S. litura</i>	45
Figura 17.	Fabricius en la secuencia de <i>B. cockerelli</i> Sulc	46
Figura 18.	Amplificación del receptor de vitelogenina mediante PCR con oligonucleótidos específicos	47
Figura 19.	Programa de dominios conservados para la secuencia de β -actina en <i>B. cockerelli</i>	48
Figura 20.	Programa de dominios conservados para la secuenciación con los oligonucleótidos degenerados publicados por Ciudad et al. en el 2005	48
Figura 21.	Alineamiento de secuencias del fragmento del receptor de vitelogenina	49
Figura 22.	Cuantificación relativa del receptor de vitelogenina en hembras y machos	50
Figura 23.	Cuantificación relativa de <i>B. cockerelli</i> Sulc entre hembras y machos provenientes de campo	52
Figura 24.	Cuantificación relativa de especímenes de <i>B. cockerelli</i> Sulc donados	52

RESUMEN

El permanente del tomate, la enfermedad de la punta morada, y el “Zebra chip” son enfermedades que ocasionan daños considerables en los cultivos de tomate y papa, respectivamente. El agente causal es transmitido por injerto o por interacción con plagas de insectos de la especie *Bactericera cockerelli* Sulc. En México en años recientes, *B. cockerelli* es considerada como plaga primaria, y es común que se realicen aplicaciones de insecticidas durante la etapa de cultivo. Se ha manifestado alarma debido a que hay fallas en el control por medios químicos, aunque puede atribuirse el problema a deficiente calibración de equipos de aplicación, baja cobertura de la aspersión en el follaje o la expresión fenotípica de la resistencia a insecticidas. Esto último, hace evidente la necesidad del desarrollo de métodos de control alternativos para este tipo de plaga. Recientemente, la genética es utilizada para obtener el máximo beneficio de ella y obtener blancos específicos de regulación en muy poco tiempo, aunado a esto, la relación que existe entre la reproducción y el proceso de vitelogénesis hace de esto una alternativa potencial para el control de insectos. Así, acoplando ambos conocimientos se podría aplicar una estrategia genética adecuada a largo plazo para alterar la expresión de los transcritos codificantes en el proceso de vitelogénesis reduciendo de esta forma la población plaga y la propagación de las enfermedades. El objetivo de este trabajo estuvo encaminado a caracterizar parcialmente y cuantificar el receptor de vitelogenina en *B. cockerelli*. Para llevar a cabo este estudio, se cubrió los siguientes objetivos particulares; se buscó la secuencia del receptor de vitelogenina por dos estrategias, con secuencias publicadas de otras especies de insectos y por el transcriptoma de *B. cockerelli*. La caracterización parcial del receptor se hizo a través de las secuencias nucleotídicas obtenidas por PCR en punto final, y secuenciación por electroforesis capilar. La cuantificación relativa se realizó por la técnica de PCR en tiempo real para reportar los niveles de expresión del receptor en adultos y ninfas. El porcentaje de similitud de la secuencia de vitelogenina obtenida en el laboratorio en comparación con la secuencia del transcriptoma completo de la especie reportada en el GenBank fue de un 90%. Los análisis de expresión demostraron que el receptor de vitelogenina se encuentra

expresado tanto en hembras como en machos de *B. cockerelli*, recolectados directamente del cultivo de papa, siendo significativamente mayor en las hembras. Al analizar la expresión relativa en ninfas provenientes de confinamiento en invernadero se encontró una menor expresión del receptor en comparación con los especímenes de campo. Estudios futuros sobre el receptor de la vitelogenina son necesarios para dilucidar la secuencia completa del mismo y considerarla como un blanco potencial para el control de esta especie plaga.

ABSTRACT

The permanent of tomato, potato purple top, and "Zebra chip" are diseases causing considerable damage to tomato and potato crops. Grafting or interaction transmit the causal agent with *Bactericera cockerelli* Sulc. In Mexico, *B. cockerelli* is considered primary pest, and it is common to control mainly by insecticide applications during the growing season. Control failures by chemical means have revealed the need to explore alternative methods of suppression of the pest and diseases. Recently, genetics is used to obtain the maximum benefit from it and get specific targets of regulation in a short time. Part of this is the relationship between reproduction and the process of vitellogenesis that makes a potential alternative for pest control. In that sense, a genetic strategy to alter the expression of transcripts in the coding process of vitellogenesis could be applied reducing pest population and the spread of the disease. The aim of this study was to characterize and quantify vitellogenin receptor in *B. cockerelli*. The vitellogenin receptor sequence was obtained from published sequences of other insect species and the transcriptome of *B. cockerelli*. We obtained a partial characterization of the receptor by PCR endpoint and sequencing by capillary electrophoresis. The relative quantification was performed by PCR in real time to report the expression levels of the receptor in adults and nymphs. The similarity of vitellogenin sequence obtained in the laboratory was 90% compared with the sequence of the entire transcriptome of the species reported in GenBank. The expression analysis showed that vitellogenin receptor is expressed significantly in females compared with males of *B. cockerelli*, collected directly from the potato crops. The relative expression of the vitellogenin receptor on nymphs obtained from greenhouse was lower compared with males and females from the field. Future studies of vitellogenin receptor are needed to elucidate the complete sequence and to be considered as a potential target for the control of this pest species.

1. INTRODUCCIÓN

La punta morada (PMP) de la papa [*Solanum tuberosum* (L)] es una enfermedad asociada con la transmisión de fitoplasmas, que causa un desorden metabólico en la solanácea (Leyva-López et al. 2002). En México, es uno de los principales problemas fitopatológicos de la papa y ocurre en las zonas productoras principales, como en los Valles y Sierras del Eje Neovolcánico (Zavala Quintana 2002; Zavala et al. 1998).

Los síntomas de la PMP en el follaje se caracterizan por una disminución en el crecimiento, abultamiento del tallo en los lugares de inserción de las hojas, y una coloración purpúrea en los folíolos. Los tubérculos provenientes de plantas con síntomas de PMP desarrollan un pardeamiento interno y generalmente no brotan, o si lo hacen, sus brotes son muy delgados o ahilados (Cadena et al. 2003). Se ha demostrado que los síntomas descritos previamente están asociados con la presencia del psílido de la papa *Bactericera cockerelli* Sulc. (Hemiptera: Triozidae); también conocida como *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Tuthill 1945; Arslan, 1985).

B. cockerelli también ocasiona problemas en cultivos de tomate [*Solanum lycopersicum* (L)], Garzón en 1984 reportó la existencia de una enfermedad que causó un 60% de daños en la producción de tomate en Guanajuato, a la que nombró “Permanente del tomate”. Los síntomas se inician con una clorosis de los brotes apicales y las hojas inferiores presentan una textura quebradiza. En las flores, se manifiesta necrosis y son abortadas; la planta es pequeña y de un color verde más intenso que las normales (Garzón 1984, 1986).

Recientemente, este insecto ha demostrado ser vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, que es el agente causal de la enfermedad Zebra chip (Hansen et al. 2008; Liefting et al. 2008, 2009; Lin et al. 2009; Yang et al. 2010b; Granados-Echegoyen 2010). Esta bacteria se moviliza a través del floema, y se detecta con mayor frecuencia en las hojas del nivel medio superior; por lo que se considera que la bacteria sigue el movimiento de los carbohidratos hacia las hojas jóvenes

(SENASICA 2013). Su principal hospedante es el cultivo de papa, (Liefting et al. 2009a, 2009b) sin embargo, se han reportado daños a cultivos de tomate [*Solanum lycopersicum* (L)] y chile [*Capsicum annuum*(L)] bajo invernadero en Nueva Zelanda (Liefting et al. 2009a), y amarillamiento de zanahoria [*Daucus carota* (L)] en Finlandia (Munyanza et al. 2010).

A pesar de los avances en el manejo integrado de *B. cockerelli* (Garzón et al. 2005), el combate químico sigue siendo la herramienta principal para mantener la densidad de población por debajo del umbral económico (Lawson et al. 1999). Dada la capacidad para desarrollar resistencia a insecticidas y la exigencia del mercado para reducir el uso de productos de elevado riesgo al ambiente y salud humana, la industria se ha enfocado al desarrollo de insecticidas de alta eficacia biológica, bajo impacto sobre los agentes de control biológico y amplio margen de seguridad al ambiente (Tucuch-Haas et al. 2010).

El conocimiento de la secuencia del DNA o RNA de los organismos es la clave para entender cómo funciona cada uno de ellos (Bronner et al. 2009). A pesar de que *B. cockerelli* es una plaga muy importante en la agricultura, existen poca información genómica disponible (Nachappa et al. 2012). La secuenciación de nueva generación ha revolucionado la habilidad para monitorear la expresión génica (Sorek et al. 2010; Ibañez et al. 2014). La identificación de mensajeros de RNA en *B. cokerelli* permite encontrar blancos potenciales para el desarrollo de tecnologías para el control de este vector (Nachappa et al. 2012; Ibañez et al. 2014).

En esta investigación se estudió el receptor de la vitelogenina, debido a que es indispensable su síntesis para la reproducción en los insectos. Se ha reportado su importancia en varias especies como *Spodoptera litura* Fabricius (Shu et al. 2010), *Aedes aegypti* (L) (Sappington et al. 1996), *Blatella germanica* (L) (Ciudad et al. 2005) entre otros. Por lo que, se diseñó una estrategia para amplificar por PCR un fragmento del receptor de vitelogenina en *B. cockerelli* Sulc, encontrándose expresado en hembras, machos y ninfas de esta especie.

2. ANTECEDENTES

2.1. Taxonomía *Bactericera cockerelli* Sulc

Dominio: Eukariota

Reino: Metazoa

Filum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Familia: Triozidae

Género: *Bactericera*

Especie: *Bactericera cockerelli* [Sulc 1909] (Invasive species compendium)

B. cockerelli tiene dos nombres comunes: el psílido de la papa o el psílido del tomate. En México, se le conoce también como pulgón saltador (ESA 2011; EPPO bulletin 2013; Invasive species compendium). *B. cockerelli* fue recolectado por primera vez en una plantación de papa en Colorado por T.D. Cockerell. Fue descrito por Sulc en 1909 y subsecuentemente designado como *Trioza cockerelli*; Crawford en 1911, lo reasignó en el género *Paratrioza*.

En 1997, cuando el género *Paratrioza* fue sinonimizado con el género *Bactericera*, también hubo cambio de familia de Psyllidae a Triozidae (Burckhard et al. 1997; Abdulla 2008; Hodkinson 2009). Descripciones morfológicas de *B. cockerelli* pueden ser encontradas en Crawford (1911, 1914), Essig (1917), Ferris (1925) y Tuthill (1945).

2.1.1. Distribución de *B. cockerelli* Sulc.

B. cockerelli se distribuye nativamente en el suroeste de Estados Unidos y el Norte de México (Pletsch 1947; Wallis 1955). También se ha reportado, en las provincias de Alberta (Ver Figura 1), Columbia Británica, Ontario, Quebec, Saskatchewan, en Canadá (Ferguson et al. 2001; EPPO Bulletin 2013). En Estados Unidos: en Arizona, California, Colorado, Idaho, Kansas, Minnesota, Montana, Nebraska, Nevada, Nuevo México,

Dakota del Norte, Oklahoma, Oregon, Dakota del Sur, Texas, Utah, Washington, Wyoming (Pletsch 1947; Wallis 1995; Crashaw 1993; Al-Jabr 1999; Pavlista, 2002; Abdullah 2008; Munyaneza et al. 2009a; Crosslin et al. 2010; 2012a,b; Munyaneza 2010, 2012; Butler et al. 2012a; Munyaneza et al. 2012). En los estados de México; Baja California, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Nuevo León, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala (Tuthill 1945; Cadena et al. 2003; Rubio-Covarrubias et al. 2006; Munyaneza et al. 2007a; Trumble 2008; Munyaneza et al. 2009b,c,d; Munyaneza 2012; Butler et al. 2012a; Munyaneza et al. 2012).

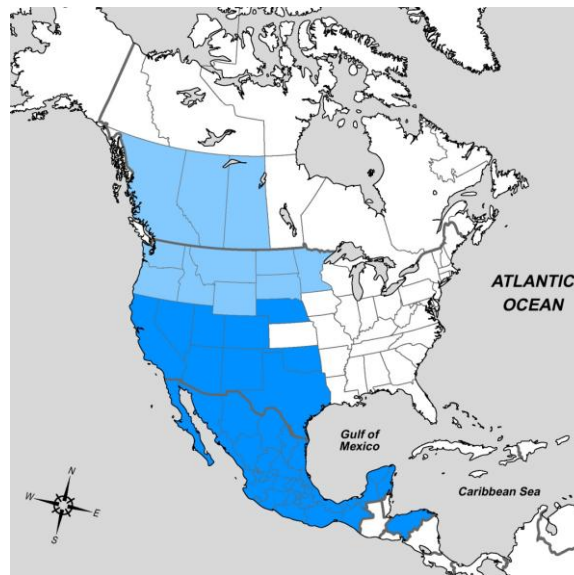


Figura 1. Distribución geográfica de *B. cockerelli* en América. El área azul claro indica que estas provincias son colonizadas intermitentemente. Noté que en la mitad de Norteamérica no se ha reportado la presencia del psílido. Mapa: Scott Burton, FDACS/Div. Plant Industry (Halbert et al. 2012).

En América central se ha reportado *B. cockerelli* en; Guatemala, Honduras y Nicaragua (Pletsch 1947; Wallis 1955; Secor et al. 2004; Molina et al. 2004; Trumble 2008, 2009; Jackson et al. 2009; Secor et al. 2009; Espinoza 2010; Munyaneza 2010, 2012; Rehman et al. 2010; Butler et al. 2012a; Munyaneza et al. 2012) . También se sospecha que éste presente en los países vecinos, incluyendo El Salvador (Munyaneza, datos no publicados). Por último, este insecto se encuentra invasivamente en Nueva Zelanda en la Isla norte y la Isla sur (Gill 2006; Teulon et al. 2009; Liefting et al. 2009a; Thomas et al. 2011).

2.1.2. Hospederos

B. cockerelli se hospeda principalmente en plantas de familia Solanaceae. Se alimenta, reproduce y desarrolla en una variedad de especies cultivadas y silvestres, como papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*), toloache (*Datura metel* y *D. stramonium*), tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerifforme*), hierba mora (*Solanum nigrum*), mala mujer (*Solanum rostratum*), cereza de suelo (*Physalis* spp.), enredadera de campo (*Convolvulus arvensis*), y camote (*Ipomoea batatas*) (Bayer CropScience 2005; Knowlton et al. 1934a; List 1939; Wallis 1955; Puketapu et al. 2011; López et al. 2003).

También se han recolectado adultos de plantas que pertenecen a las siguientes familias; Amaranthaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Violaciae, Chenopodiaceae, Malvaceae, Menthaceae, Pinaceae, Poaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Salicaceae, Scrophulariaceae y Zygophyllaceae (EPPO Bulletin 2013; Tucuch-Haas et al. 2010).

2.1.3. Bionomía de *B. cockerelli* Sulc

La biología y el ciclo de desarrollo del insecto hemimetábolo *B. cockerelli* (Figura 2) ha sido documentada desde 1930, sin embargo, hay una considerable variación en la biología del psílido reportada en la literatura. Por ejemplo, Wallis (1955) reportó que la fecundidad de una sola hembra era de 500 huevos en cultivo de papa, mientras que Abdullah (2008) mostró que las hembras de los psílicos pueden depositar en promedio 231.8 huevos en tomate.

Se ha realizado estudios independientes del ciclo de desarrollo en el psílido de la papa en varias plantas hospederas incluyendo papa, berenjena, chile y tomate (Abdullah 2008; Liu et al. 2004; Liu et al. 2006a; Yang et al. 2009; Yang et al. 2010). El tiempo promedio requerido del desarrollo de huevo a adulto es de 15 a 30 días a una

temperatura de 27°C la cual favorece el desarrollo y supervivencia; temperaturas bajo 15°C o sobre 32°C afecta adversamente. Una sola generación puede ser completada de 3-5 semanas, dependiendo de la temperatura. El número de generaciones varía considerablemente entre regiones, usualmente de tres a siete. Sin embargo, una vez que los psílidos invaden un área, la ovoposición prolongada causa que las generaciones se sobrepongan, haciendo que sea difícil distinguir entre las mismas; el ciclo completo de ovoposición ocurre en promedio durante 21.45 días (Pletsch 1947; EPPO Bulletin 2013; Pavlista 2002; Al-Jabr 1999).

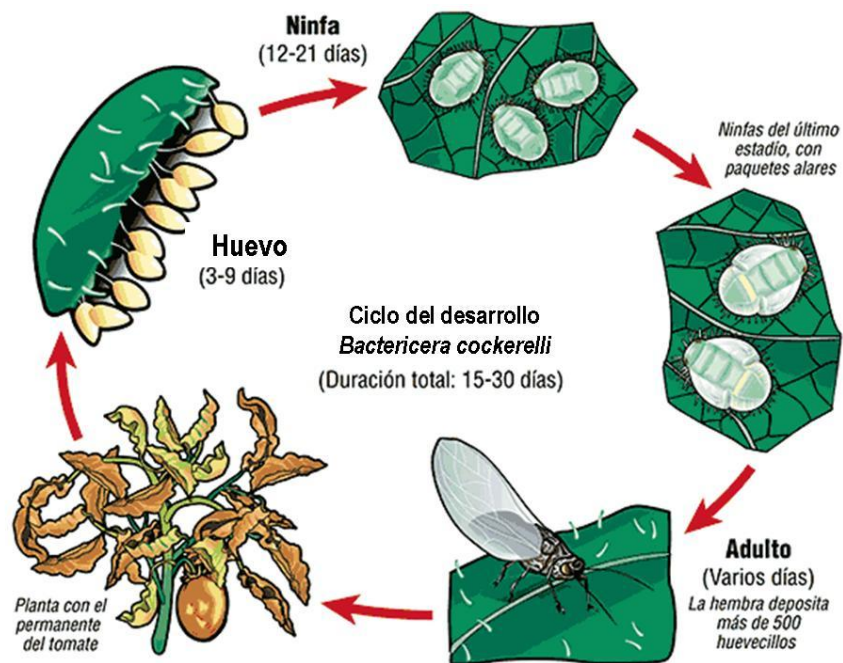


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *B. cockerelli*. Modificado de BayerCropScience 2005.

Los huevos de *B. cockerelli* se fijan en las orillas de las hojas, en la cara inferior de las venas de las hojas, y algunas veces están aislados sobre las porciones superiores de las plantas (List 1939). Son de color amarillo brillante y de forma ovalada, cambian de color a anaranjado durante el período de incubación debido al desarrollo del embrión; este período ocurre de 3 a 9 días. Los ojos rojos de las ninfas son observables cerca del extremo apical cuando están por eclosionar (Rowe et al. 1935).

Los cinco estadios ninfales tienen características morfológicas similares (Compere 1916), aunque presentan cambios estructurales como son: incremento en el tamaño del cuerpo, desarrollo de alas y un aumento en el número de glándulas de cera marginales (Rowe et al. 1935). El primer estadio ninfal es de color amarillo claro y de forma ovalada. Los cambios de color de las ninfas comienzan en el segundo estadio, y adquieren una tonalidad amarilla oscura. En el tercer estadio son de color marrón con matices verdosos, y finalmente, en el cuarto y quinto estadios son de tonalidad verdosa. El desarrollo de las alas es observado por primera vez en el tercer estadio ninfal y es notable durante el cuarto y quinto estadio (Pletch 1947).

Los adultos son descritos con detalle por Rowe et al. (1935), son pequeños, miden aproximadamente 2.5-2.75 mm., las alas son claras, parecen cigarras miniatura, su hábito es saltador y se alimentan de la savia (floema). Su color atraviesa los cambios graduales del amarillo ligero al verde cuando recién eclosionan, café o verde tres días después, hasta que llegan a ser grises o negros con marcas blancas cuando han pasado cinco días después de la eclosión. Las marcas blancas son características de los psíidos, en particular una amplia banda blanca, transversal en el primer segmento abdominal y otra en forma de V invertida en el último segmento abdominal (Wallis 1955). Las hembras pueden vivir tres veces más del tiempo que los machos, el apareamiento ocurre dos o tres días después de la eclosión. Abdullah (2008), describió periodos del desarrollo dividiéndolos en: desarrollo ninfal, etapa de incubación, etapa de pre-ovoposición, y pre-apareamiento, describiendo solamente el dimorfismo sexual en hembras y machos en la etapa adulta.

Tabla 1. Fases y tiempo de desarrollo en *B. cockerelli*

	Ciclo de vida	Periodo de desarrollo	Ninfa	Incubación	Pre-ovoposición	Pre-apareamiento
Días	34.7± 2.76	28.4±3.05	21.6±2.82	6.74±0.72	6.9±0.67	4.2±0.49

Modificado de Abdullah, 2008.

En Norteamérica, *B. cockerelli* migra anualmente con el viento y por las temperaturas elevadas; a finales de la primavera, desde sus áreas de hibernación y cría en el oeste de Texas, sur de Nuevo México, Arizona, California y Norte de México hacia las regiones septentrionales de Estados Unidos y sur de Canadá, especialmente a través de los estados del medio oeste y las provincias canadienses a lo largo de las Montañas Rocosas (Romney 1939; Pletsch 1947; Jensen 1954; Wallis 1955; Abernathy 1991).

2.1.4. Daños ocasionados por *B. cockerelli* Sulc como plaga agrícola

Las mayores pérdidas ocasionadas por el psílido *B. cockerelli* en los cultivos de papa [*Solanum tuberosum* (L)], chile [*Capsicum annuum* (L)] y tomate [*Solanum lycopersicum*(L)] han ocurrido en Ontario, Canadá (Ferguson et al. 2003), en Washington (McGuire 2002), en el centro de Estados Unidos (Zink 1998, Al-jabar 1999), en California, al sur de los EUA en la frontera con México (Liu et al. 2004; Liu et al. 2005), en Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí en México (Liu et al. 2006; Garzón 2003; Díaz et al. 2005; Rubio et al. 2011); en consecuencia, este insecto se considera una plaga primaria (Garzón et al. 1992; Garzón 2003).

B. cockerelli ocasiona en cultivos hortícolas una enfermedad conocida como “amarillamiento del psílido” (Figura 3) cuyos síntomas principales son la coloración amarilla o púrpura de las hojas hasta una disminución en el desarrollo de la planta que podría ocasionarle la muerte. Los cambios fisiológicos e histológicos en plantas enfermas incluyen desbalance proteico, reducción en los niveles de almidón y alteración en el metabolismo de carbohidratos (Cranshaw 1993). Adicionalmente, en plantas muy dañadas se observa una completa interrupción de la actividad de los cloroplastos, por lo que suelen tener una pigmentación más clara debido a la reducción de los niveles de clorofila y caroteno (García-Negro 2007).

El amarillamiento del psílido se cree que está asociado con la alimentación por las ninfas del psílido (List 1925) y puede ser causado por una toxina producida en el insecto (Carter 1939), pero la identificación de esta toxina aún permanece desconocida

(Abernathy 1991; Sengoda et al. 2010). Además, ninfas y adultos producen secreciones cerosas blanquecinas con apariencia de sal, que pueden llegar a afectar la calidad del fruto y propiciar el crecimiento de microorganismos patógenos como hongos y bacterias (Cranshaw 1993).



Figura 3. Plantas de papa *Solanum tuberosum* (L) con síntomas de “amarillamiento del psílido”. Joe Munyaneza USDA/ARS.

Por otra parte, se ha relacionado a *B. cockerelli* como el transmisor de desórdenes en el metabolismo en sus plantas hospederas, denominadas como enfermedad de la punta morada de la papa (PMP) y permanente del tomate (Figura 4). Estos desórdenes ocasionan, un pardeamiento y brotación anormal de los tubérculos o frutos, lo que disminuye el rendimiento y la calidad de cultivos (Cadena et al. 2003, Cárdenas-Valenzuela et al. 2010, García de la Rosa et al. 2002).

Almeyda et al. en el 2002b indicó que el psílido *B. cockerelli* colectado en tomate (*Solanum lycopersicum* L), en el estado de Morelos, que presentaba los síntomas del permanente fue positivo a un fitoplasma del grupo I, el cual es considerado como uno de los agentes causales de la enfermedad punta morada de la papa. Por otra parte, Maramorosch (1998), menciona que a ésta última, se le ha atribuido como agente causal, un fitoplasma. En Coahuila y Nuevo León, se encontró que son dos fitoplasmas implicados como agentes etiológicos en el síndrome de punta morada (Almeyda et al. 2008). En el 2007, en un estudio realizado en Sinaloa, se encontró que *B. cockerelli* fue capaz de transmitir tres grupos diferentes de fitoplasmas en plantas de chile, papa y tomate (García-Negroe 2007).



Figura 4. Síntomas de “punta morada” en la papa. Tomado del Folleto para productores No. 54; Garzón et al. 2007.

Finalmente, *B. cockerelli* se ha mostrado que transmite Zebra chip (ZC) al momento de alimentarse. Ésta es una enfermedad emergente y económicamente importante de cultivos de papa en el suroeste de los Estados Unidos, México, América Central y Nueva Zelanda (Munyanza et al. 2007a,b; Liefting et al. 2008; Secor et al. 2009; Crosslin et al. 2010; Munyanza 2010). Ha sido asociada con especies no completamente descritas, clasificada como “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (sinónimo *Candidatus Liberibacter psyllaerous*) (Hansen et al. 2008; Liefting et al. 2008, 2009b; Secor et al. 2009; Crosslin et al. 2010; Munyanza 2010). Recientemente, se reportó la presencia de esta bacteria en cultivos de papa y tomate de San Luis Potosí y Nuevo León, México, incluso en muestras asintomáticas (Ontiveros-Guerra 2012).

Esta enfermedad causa clorosis foliar y un subsiguiente color púrpura, internodos acortados y producción de tubérculos aéreos. La característica particular de los síntomas del Zebra chip es la producción de una coloración moteada oscura concentrada en el tejido perimedular de la papa. Este defecto, llega a ser más pronunciado cuando los tubérculos son freídos, produciendo un patrón regular rayado cuando se realizan rodajas latitudinales, lo que le da el nombre de Zebra chip (Buchman et al. 2011).

Levy et al. (2011) mencionan que *Candidatus Liberibacter solanacearum*, se moviliza a través del floema en tomate y papa. La frecuencia y dirección del desplazamiento varían

entre las dos especies y entre las variedades de papa. En ambos cultivos, se detectó a la bacteria con mayor frecuencia en las hojas del nivel medio superior, tres semanas después de la transmisión por *B. cockerelli*. Las tasas del movimiento fueron similares entre las variedades de papa con una mayor incidencia de síntomas en variedades susceptibles. Con esto, se sugiere que la bacteria sigue el movimiento de los carbohidratos hacia las hojas jóvenes (SENASICA, 2013).



Figura 5. Enfermedad de Zebra chip. Los síntomas presentes en el tubérculo (A) y en las papas fritas (B). Tomada de Buchman et al. 2011.

2.2. Control de *Bactericera cockerelli* Sulc.

2.2.1. Control Cultural.

El control cultural se refiere a la manipulación intencional de un ambiente de cultivo para reducir las tasas de incremento de las plagas y los daños provocados por ellas (Pedigo et al. 2006). En Colorado, USA, se recomendaron plantas de chile como cultivos trampa para atraer a *B. cockerelli* (Cranshaw 1994). Desde los años 30's, se recomienda la eliminación de criaderos potenciales en la primavera y verano, a través de la exclusión de las plantaciones de papa temprana y solanáceas sin importancia económica, tales como, *Lycium barbarum* L para reducir las poblaciones de *B. cockerelli* (Knowlton 1934a; Hill 1947; Cranshaw 1994). En México, se recomienda programar fechas de siembra de los cultivos (Garzón et al. 2007), así como para su detección, se utilizan trampas amarillas con pegamento para captura de adultos, también

trampas verdes fosforescentes y muestreos al follaje para detectar ninfas (Rubio et al. 2006).

2.2.2. Control Biológico.

Se reporta una considerable cantidad de insectos actuando como depredadores, sobre todo de los estadios inmaduros de *B. cockerelli* de manera presencial en el cultivo, ya que no se han utilizado de manera extensiva para controlar a la plaga. La lista de depredadores reportados se observa en la Tabla 2 (Al-Jabr 1999; Plestch 1947; Horne et al. 2001; Knowlton 1933a,b 1934b; Compere 1943; Romney 1939; Butler et al. 2012a,b; O'Connell et al. 2012; Pugh 2013; Jorgensen et al 2011; McGregor 2013; Walker et al., 2011; Tamayo-Mejía 2014).

Tabla 2. Principales depredadores de *B. cockerelli* Sulc

Orden	Familia	Especie
Neuroptera	Chrysopidae	<i>Chrysoperla carnea</i> Stephens
		<i>Chrysoperla rufilabris</i> Burmeister
	Hemerobiidae	<i>Micromus tasmaniae</i> Walker
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Hippodamia convergens</i> Guerin-Meneville
		<i>Hippodamia quinquesignata</i> Kirbi
		<i>Hippodamia tredecimpunctata</i> L
		<i>Hippodamia americana</i> Crotch
		<i>Hippodamia lecontei</i> var <i>uteana</i> Casey
		<i>Hippodamia parenthesis</i> Say
		<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> Mulsant
		<i>Cleobora mellyi</i> Mulsant
		<i>Scymnus loewii</i> Mulsant
		<i>Coccinella septempunctata</i> L
		<i>Coccinella novemnotata</i> Herbst
		<i>Coccinella undecimpunctata</i> L
		<i>Coccinella transversoguttata</i> Faldermann
		<i>Adalia bipunctata</i> L
		<i>Harmonia axyridis</i> Pallas
		<i>Cycloneda sanguinea</i> L
<i>Olla vni-grum</i> Mulsant		
<i>Scymnus loewii</i> Mulsant		
	Melyridae	<i>Collops necopinus</i> Fall
	Staphylinidae	<i>Platystethus spiculus</i> Erichson
Diptera	Syrphidae	<i>Melanostoma fasciatum</i> Macquart
		<i>Allographta</i> sp.
		<i>Sphaerophoria</i> sp.
		<i>Asyndetus</i> sp.
	Dolichopidae	<i>Chrysotus</i> sp.
		<i>Medetera</i> sp.
Hemiptera	Geocoridae	<i>Geocoris decoratus</i> Uhler
		<i>Geocoris pallens</i> Stal

	Anthocoridae	<i>Orius tristicolor</i> White
		<i>Anthocoris tomentosus</i> Pericart
		<i>Anthocoris melanocerus</i> Reuter
Memiptera	Nabidae	<i>Nabis ferus</i> L
	Miridae	<i>Deraeocoris brevis</i> Ulher
		<i>Dicyphus hesperus</i> Knight
		<i>Cyrtopeltis modesta</i> Distant
Hemiptera	Berytidae	<i>Pronotacantha annulata</i> Uhler
	Reduviidae	<i>Empicoris</i> sp.
Dermaptera	Forficulidae	<i>Forficula auriculatria</i> L
Hymenoptera	Formicidae	<i>Linepithema humile</i> Mayr

Modificado de Tamayo-Mejía 2014

Por otro lado, para *B. cockerelli* se reporta el parasitoide *Methaphycus psyllidus* (Hymenoptera: Encyrtidae) (Pletsch 1947; Compere 1943; Jensen 1957) como alternativa de control biológico. Además, en ensayos de laboratorio se ha observado a *Tamarixia radiata* parasitando a *B. cockerelli* pero en menos de un 5% (Hoddle et al. 2014).

Romney (1939) reportó el parasitismo efectuado en *B. cockerelli* por el himenóptero parásito (Eulófido) *Tamarixia triozae* Burks (Pletsch, 1947). Durante el proceso de parasitismo, las hembras de *T. triozae* paralizan temporalmente a las ninfas de cuarto y quinto estadio de *B. cockerelli* y colocan sus huevos en la parte ventral. Al eclosionar la larva, ésta se desarrolla de manera ectoparasítica debajo de la ninfa del huésped. Durante la alimentación de las larvas, el color del exoesqueleto de la ninfa pasa de color verde a marrón. Los adultos emergen de la ninfa a través de una abertura circular (Pletsch 1947; Johnson 1971).

Desde que ocurre la ovoposición hasta la emergencia de los adultos, para *T. triozae*, se necesitan alrededor de 12 días a 26°C. Los huevos, larvas y pupas tienen un tiempo de desarrollo de 1.5, 3.5 y 5.7 días; las hembras adultas viven 19.9 días y su periodo de preoviposición es de 1.9 días aproximadamente. Se ha reportado que una hembra de *T. triozae* Burks, elimina en promedio 312 ninfas de *B. cockerelli*, de las cuales el 56% son por parasitismo y el 44% por depredación (Cerón-González et al. 2014).

Johnson (1971) hizo numerosas observaciones en campo de esta especie. El concluyó que era poco probable el control biológico para *B. cockerelli* porque: 1) existía una pobre sincronización entre *B. cockerelli* y el parasitoide, debido a que aparece tardíamente en la temporada. 2) en campo, existe una alta mortalidad del parasitoide durante la etapa de pupa con un rango de 38-100% y 3) estudios en laboratorio demostraron que las hembras solo depositan huevos durante el cuarto y quinto estadio ninfal, lo que permite que la ninfa se alimente e infecte a los cultivos antes de que muera por la presencia del parásito.

Por el contrario, se han reportado parasitismo de hasta un 85% en campo (Lomelí-Flores et al. 2002; Bravo 2002), con potencial en condiciones de invernadero (Weber 2013; McGregor 2013). Asimismo, *T. triozae* fue importado a Nueva Zelanda como un posible agente potencial para controlar poblaciones de *B. cockerelli* en Chile, tomate y papa (Workman et al. 2009). Tamayo-Mejía en el 2014 realizó una investigación evaluando el parasitismo de *T. triozae* Burks sobre *B. cockerelli* Sulc, empleando al mismo tiempo, aislamientos de *Beauveria bassiana*. Él recomendó un aislado llamado Bb40 a la dosis CL₉₀ y la liberación del parasitoide 8 días antes de aplicar el patógeno, para mejorar el biocontrol de *B. cockerelli* en campo.

2.2.2.1. Hongos entomopatógenos.

Los hongos son utilizados como control natural para poblaciones de insectos, el éxito en el uso de hongos patogénicos para el control de insectos depende principalmente de condiciones ambientales apropiadas como temperatura, humedad, e intensidad de radiación ultravioleta (Feng et al. 1994; Weinzierl and Henn 1989). Las especies de hongos que se han reportado para el control de *B. cockerelli* son *Beauveria bassiana* (Balsamo), *Isaria fumosorosea* (Wize), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) y *Verticillium lecanii* (Zimmerman) (Al-Jabr 1999; Strand 2006; Sánchez-Peña et al. 2007; Lacey et al. 2009, 2011).

2.2.3. Control Químico.

Uno de los primeros insecticidas que se usó y se reportó efectividad fue con “lime sulfur” para el control de *B. cockerelli* en tomate y papa. El control fue realizado por aplicación y se observó muerte inmediata de adultos durante el tiempo de aplicación, se repelió a hembras durante la ovoposición y del efecto residual, en las ninfas que se acercaban a las superficies rociadas; sin embargo, éste es tóxico para los cultivos (List 1935).

Page-Weir et al. (2011) han reportado once insecticidas que presentaron eficiencia contra ninfas y adultos del psílido de la papa. Las aplicaciones de abamectina, aceite, y bifentrina han sido eficaces contra poblaciones de adultos después de tres días de tratamientos. La mezcla de abamectina y aceite, bifentrina y spirotetramat, spiromesifen (estos últimos inhibidores de la acetil CoA carboxilasa; son derivados del ácido tetrónico y tetrámico) han sido los compuestos que controlaron mejor a los estadios ninfales (Bujanos et al. 2005; Bravo et al. 2007; IRAC 2014).

En comunicación personal con el Ing. Roberto González (Saltillo, Coah., México en el 2013), se usan insecticidas organosintéticos para adultos de *B. cockerelli*: alfametrina, z-cipermetrina, bifentrina (piretroides); metomilo y oxamil (carbamatos); curacron, monocrotofos, diclorvos (organofosforados); y endosulfan (clorados). Para ninfas, se usan spirotetramat, imidacloprid y abamectinas. En la Tabla 3, se detalla el modo de acción de algunos productos derivados contra *B. cockerelli*.

Tabla 3. Modo de acción de algunos productos para el control de *B. cockerelli*

Nombre	Ingrediente activo	Modo de acción
Insecticidas derivados del Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss)	Azadirachtin	Efecto antialimentario, regulación en el crecimiento de los insectos de manera negativa, efectos en la reproducción (Mordue et al. 1993)
Imidacloprid	De la clase cloronicotinil nitroguanidina	Interrupción en el sistema nervioso del insecto, porque actúa como un inhibidor competitivo en los receptores de acetilcolina (Schmeer et al. 1990)

Spinosad derivado de spinosinas <i>Saccharopolyspora</i> <i>spinosa</i>	Despolariza neuronas del insecto activando receptores nicotínicos, causando hiperactividad en el sistema nervioso, que con lleva a contracciones involuntarias de los músculo y temblores. Finalmente, los insectos llegan a estar inactivos con temblores y después de una exposición prolongada, llega a presentar fatiga neuromuscular (Salgado 1997).
--	---

2.3. Variación Genética de *B. cockerelli* Sulc.

Debido a que este insecto es migratorio, Liu et al. (2006b), menciona que la localización de las poblaciones originarias de *B. cockerelli* podría ser importante; esto es porque, si el movimiento ocurre a partir de trasplantes transportados desde el oeste de Baja California en México, el control cultural y estrategias químicas podrían implementarse para romper el ciclo de transporte. En cambio, si las poblaciones de California y Baja California migran de criaderos en Arizona y Nuevo México, interferir con la migración no sería posible. Esta situación llevó a investigar la existencia de diferentes biotipos de *B. cockerelli*.

En este estudio, se encontraron dos biotipos; uno formado por las poblaciones del centro de Estados Unidos y este de México; el otro conformado por el oeste de Norteamérica. Así mismo, se reportó que existe un nuevo biotipo invasor, el cual tiene su origen en Baja California (Liu et al. 2006). De igual manera, se ha demostrado la cercanía genética entre poblaciones de *B. cockerelli* de Coahuila, México y Texas; así como, la diferencia de las poblaciones provenientes de Guatemala (Jackson et al. 2009). Finalmente, poblaciones analizadas de Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Nuevo León, Estado de México y Morelos, provenientes de México, indican que las poblaciones del noroeste, suroeste y sudeste están más alejadas genéticamente entre sí con respecto a las poblaciones del noreste y centro de México. Ninguna de ellas es del biotipo invasor; pero se sugiere un posible surgimiento de nuevos biotipos (López-Monroy et al. 2013).

2.4. Genómica en insectos.

La genómica es ahora considerada como un primer paso en muchas enfermedades de manejo complicado, así como también, la revolución tecnológica en bioquímica, biología molecular y genética ha influido en todas las áreas de las ciencias biológicas, y ha impactado, profundamente en la ciencia dirigida a los insectos (Raihkel et al. 2005). Con esta revolución tecnológica, el tamaño pequeño de los insectos ya no es una barrera para descubrir su bioquímica, clonar o caracterizar los genes o secuenciar genomas completos. Uno de los primeros ejemplos, fue el genoma de los áfidos (International Aphid Genomic Consortium 2010) que ha permitido identificar un gran número de genes a comparación de los que se habían predicho (Hail et al. 2010).

El analizar la genómica del psílido de la papa, proporcionará a los investigadores la habilidad de identificar genes viables vinculados a procesos biológicos críticos que pueden ser objetivo a través del desarrollo de métodos, como el RNAi (del inglés: “interfering RNA”). El grupo de investigación de Hail (2010) publicó la creación de dos librerías piloto de cDNA en *B. cockerelli* usando la metodología 454 de pirosecuenciación; una de esas librerías provenía de un aislado de adultos y otra librería provenía de ninfas del quinto estadio.

Las secuencias analizadas en *B. cockerelli* correspondieron a funciones relacionadas a construcción de organelos, desarrollo, procesos neurológicos, respuesta a estrés, funciones ribosomales, transporte de iones y unión de ácidos nucleicos; algunos de los genes de etapa específica probables incluyen vitelogenina, proteína precursora de yema proveniente de hembras adultas, actina II, proteínas relacionadas a desarrollo de alas (Hail et al. 2010).

Experimentos realizados por Nachappa et al. (2012), proporcionaron el primer análisis profundo del transcriptoma del psílido de la papa, poniendo énfasis en individuos de *B. cockerelli* infectados con el patógeno de plantas, *Candidatus Liberibacter solanacearum*. La abundancia de los genes encontrados en el transcriptoma; usando la técnica TruSeq

RNA de Illumina, involucraron genes del metabolismo, reproducción, desarrollo, stress y de respuesta inmune. Hay expresión diferencial de un conjunto de genes en respuesta a la infección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, en psílicos, que incluyen genes involucrados en reproducción, respuesta a estrés y varios genes que aún no se encuentran anotados.

Interesantemente y como se esperaba, varios genes de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, fueron más altamente expresados en los psílicos infectados. La RT-qPCR confirmatoria de los genes en los psílicos confirmaron los resultados observados en los análisis del transcriptoma. Además, los datos mostraron que la planta hospedera no afectó la expresión diferencial de los genes analizados en estos experimentos, sugiriendo que los resultados pueden ser aplicados a estudios del psílido de la papa y su interacción con *Candidatus Liberibacter solanacearum* en diferentes sistemas de plantas hospederas. Estos resultados, podrían ayudar a dilucidar la interacción molecular entre psílicos y el patógeno bacterial. La identificación de transcritos de insectos no infectados pueden servir como blancos potenciales del desarrollo de tecnologías transgénicas de insectos plaga y control de vectores (Nachappa et al. 2012).

Así mismo, experimentos realizados por Ibanez et al. 2014, donde los objetivos principales del estudio eran, conocer la expresión génica global de especies de *Liberibacter* en su vector (*B. cockerelli*); compilar una lista de genes potencialmente involucrados en la interacción patógeno-vector que podría ser usado como genes candidatos para interrumpir la transmisión por el insecto. Y finalmente, proporcionar evidencia de la expresión de los genes predichos, mediante la identificación de los UTR's (del inglés: "untranslated region") y los posibles genes que no han sido encontrados por predicción en los software. La metodología que se empleó fue librerías de RNA-TruSeq de Illumina, y las secuencias fueron depositadas en el NCBI GEO, con el número de acceso: GSE57808. Estos análisis permitieron indentificar un 92% de CDS expresados en el vector. Los RT-qPCR (del inglés: "Quantitative reverse transcription PCR") confirmatorios de genes expresados en diferentes niveles basados en las predicciones de RPKM (del inglés: "reads per kilobase of transcript per million mapped

reads) validaron la expresión relativa de diez genes blanco. Además, este estudio permitió identificar nuevos CDS (del inglés: “coding sequences) que no habían sido posible predecir *in silico*.

2.5. Vitelogénesis en insectos.

La reproducción es la clave para la proliferación de las poblaciones de insectos. Dentro de los mecanismos más importantes para la reproducción está el proceso de la biosíntesis de la vitelogenina y su interacción con el receptor de la vitelogenina regulada por los oocitos. El éxito reproductivo de los insectos depende en gran medida del buen funcionamiento de estos mecanismos en las células reproductivas.

La vitelogenina es sintetizada primeramente en el cuerpo graso de manera específica, es secretada en la hemolinfa y entonces captada por oocitos competentes (Figura 6). Esta captación es lograda por un receptor de unión a membrana, a través de un mecanismo endocítico regulado por receptor (Raikhel et al. 1992; Sappington et al. 1998; Snigirevskaya et al. 2005). Un elemento clave en el proceso completo de captación es el receptor de vitelogenina, que se encuentra localizado en pozos revestidos de clatrina en la superficie de los oocitos en desarrollo.

Después de la incorporación dentro de los oocitos, la vitelogenina es almacenada para ser fuente de reserva alimenticia en los futuros embriones. En insectos, la primera proteína específica fue descubierta en la hemolinfa del gusano de seda *Hyalophora cecropia* (L) y se demostró que participa en la formación de la yema por Tefler en 1954. (Shu et al. 2010). Diversos estudios han mostrado que en insectos, el cuerpo graso de las hembras presenta el mayor sitio de biogénesis de vitelogenina (Engelmann 1983; Wyatt et al. 1996). Existe evidencia que en machos de algunas especies, presentan pequeñas cantidades de vitelogeninas, por lo que se podría considerar que la síntesis de éstas no es específica de hembras (Elgelmann 1979; Tenczek et al. 1986; Valle 1993; Piulachs et al. 2003).

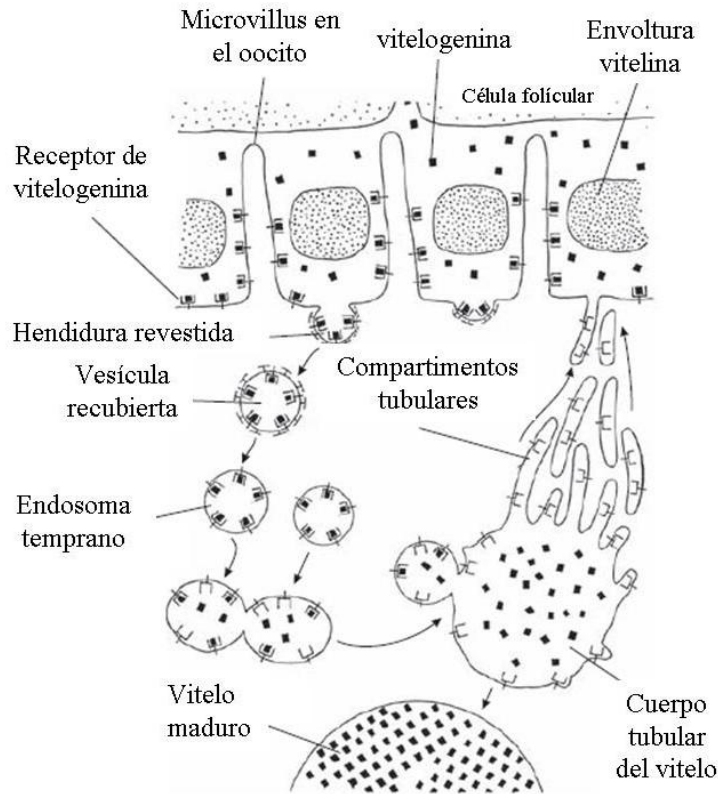


Figura 6. El proceso de endocitosis mediada por receptor durante la vitelogenesis en mosquitos. La vitelogenina entra desde la hemolinfa entre las células foliculares a través de poros dentro de la membrana vitelina. Se une a los receptores en la membrana plasmática del oocito, que se encuentran acumulados en hendiduras revestidas de clatrina que se invaginan dentro de la membrana del oocito y forman vesículas revestidas de clatrina. Cuando las vesículas pierden la clatrina, ellas llegan a ser endosomas tempranos, que se fusionan para formar un largo cuerpo tubular del vitelo. La vitelogenina es cristalizada como vitelo, formando vitelo maduro. Los receptores de vitelogenina son reciclados en la membrana plasmática por medio de los compartimentos tubulares (Modificada de *Physiological Systems in Insects*, Klöwen 2007)

Las vitelogeninas han sido estudiadas extensivamente en un amplio grupo de animales, vertebrados como invertebrados. Para los insectos, éstas han sido secuenciadas en 25 especies pertenecientes a diferentes órdenes (Tufail et al. 2008). La comparación de las vitelogeninas en insectos ha mostrado que sus estructuras son altamente conservadas y forman una superfamilia génica (Chen et al. 1997; Sappington et al. 1998; Lee et al. 2000).

El gen de la vitelogenina es largo, el transcrito es de aproximadamente 6-7 kb. El número de genes de vitelogenina varía dependiendo de las diferentes especies de insectos, pero la razón de la variación es hasta ahora completamente desconocida (Tufail et al. 2008). Las vitelogeninas son fosfolipoglicoproteínas sintetizadas a partir de

precursores de 200kDa aproximadamente. El precursor primario es sometido a corte proteolítico por proteasas, formando subunidades largas de 140-190kDa y subunidades pequeñas de 40-60kDa. (Tufail et al. 2005).

2.5.1. Receptor de Vitelogenina.

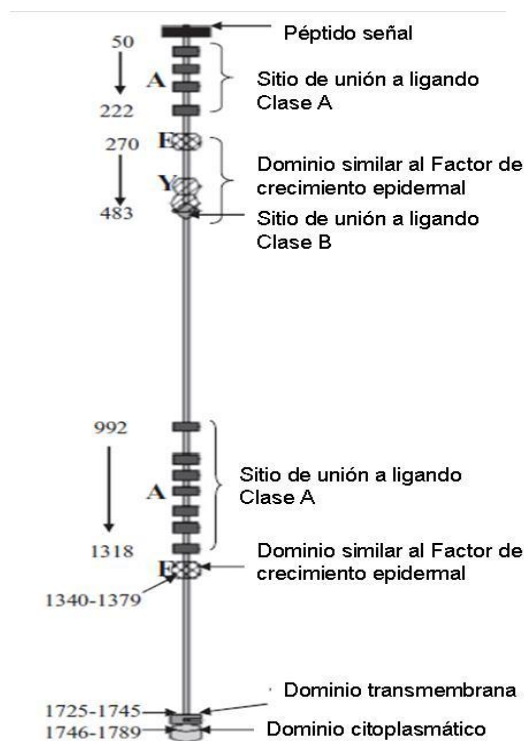


Figura 7. Diagrama esquemático del receptor de vitelogenina (VgR) en *Spodoptera litura*. La secuencia del péptido señal está mostrada. Los números que se encuentran a la izquierda son los residuos de aminoácidos y las posiciones que les corresponden en los dominios descritos en la derecha (Modificado de Shu et al. 2010).

El gen del receptor de vitelogenina en insectos codifica a una proteína específica de ovario. Análisis estructurales de las secuencias de aminoácidos deducidas del receptor en insectos revela que todos son miembros de una familia génica de receptores de lipoproteínas de baja densidad. Esta familia posee distintos tipos de dominios: un dominio rico en cisteínas clase A, el de crecimiento epidemal, un dominio rico en cisteínas clase B, repeticiones de YWXD, un dominio de unión a carbohidratos, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático (Goldstein et al. 1985; Schneider et al. 1996). Estas regiones son descritas brevemente a continuación:

Dominios de unión a ligando: esta región regula la interacción entre el receptor y el ligando, y consiste de seis repeticiones ricas en cisteínas de aproximadamente 40aa, también llamada repeticiones LDLR clase A o clase A. Mutaciones en los residuos de cisteínas en el humano ha sido relacionados en pacientes que presentan hipercolesterolemia familiar (Goldstein et al. 1974) .

Dominio de crecimiento epidermal: contiene un módulo clase B que contiene seis residuos de cisteína; y repeticiones de que contienen el motivo YWTD que forman un dominio beta. Mutaciones en este dominio no afectan la asociación pero evita la disociación ácido dependiente del ligando en los endosomas (Davis et al., 1987).

Dominio transmembrana: es un dominio de aproximadamente de 24aminoácidos. Juega un papel importante para el receptor. Tiene forma de alfa-hélice y funciona como ancla en la membrana. Mutaciones en este dominio deja receptores truncados dentro de las células (Schneider et al. 2003).

Dominio citoplasmático: el dominio citoplasmático constituye la región intracelular de los receptores y ésta involucrado en la concentración de estos receptores y los pozos de clatrina para la internalización de la señal (Davis et al. 1987). Todos los receptores tienen al menos una copia de la secuencia NPXY en los dominios citoplasmáticos (Tufail et al. 2008).

Solo han sido caracterizados molecularmente los receptores de vitelogenina en algunas especies: *Aedes aegypti* (L) (Sappington et al. 1996); *Solenopsis invicta* (Buren) (Chen et al. 2004); *Periplaneta americana* (L) (Tufail et al. 2007); *Apis mellifera* (L) (Guidugli-Lazzarini et al. 2008) *Blattella germanica* (L) (Ciudad et al. 2006); *Rhyarobia maderae* (Fabricius) (Tufail et al. 2005); *Actias selene* (Hübner) (Xu et al. 2012); *Nilaparvata lugens* (Stål) (Lu et al. 2015); *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Schonbaum et al. 1995); *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville) (Liu et al. 2011) y *Bombyx mori* (L) (Lin et al. 2013).

De manera natural, organismos que poseen mutaciones en el receptor de vitelogenina han sido identificados que causan esterilidad en las hembras. Por ejemplo, en *Drosophila melanogaster*, la esterilidad ocurre en insectos que son genéticamente deficientes en el receptor de vitelogenina (mutación llamada *yl*). (Schonbaum et al. 1995). Análisis de los oocitos producidos por las mutantes *yl*- mostraron una reducción drástica en el número de vesículas revestidas de clatrina, y muy pocas vitelogeninas (DiMario et al. 1987). Recientemente, la interrupción de la síntesis de los receptores de vitelogenina usando RNAi en *Blattella germanica* muestra un fenotipo similar al encontrado en la mutante *yl*- de *D. melanogaster* (Ciudad et al. 2005).

2.5.2. Receptor de vitelogenina en *Blattella germanica* L.

Experimentos realizados por Ciudad et al. (2007) caracterizaron el receptor tipo lipoforina (receptor de vitelogenina) en *Blattella germanica*, no solo molecularmente si no también usando técnicas de RNAi. También para conocer el contexto filogenético entre los receptores ya reportados.

Se clonó el receptor usando métodos de RT-PCR. Dos isoformas del receptor fueron encontradas y diferían unas de otras por una delección/inserción de 24 aminoácidos. Cada una fue obtenida de cuerpo graso y el ovario, pero se encontraban expresadas en cerebro, aparato digestivo, y músculo en adultos. En ovarios y cuerpo graso, las dos isoformas son expresadas de manera similar durante el primer ciclo gonadotrófico. Los niveles de mRNA en el cuerpo graso se incrementaron en paralelo durante la vitelogénesis, mientras que decayeron en los ovarios. Tratamientos con hormonas juveniles incrementaron el nivel de proteínas del receptor. Experimentos con RNAi mostraron que las hembras con baja expresión del receptor tenían menos proteínas durante el crecimiento de los oocitos con respecto a los controles, indicando que este receptor es funcional.

Un análisis filogenético de receptores de tipo lipoproteínas mostró que el receptor de *B. germanica* se agrupaba con otras secuencias anotadas como receptores en un grupo

hermano de receptores de lipoproteínas de baja densidad en vertebrados y receptores de vitelogenina mostrando que tienen un ancestro común y se diversificaron en paralelo (Ciudad et al. 2007).

2.5.3. Receptor de vitelogenina en *Spodoptera litura* Fabricius.

En investigaciones realizadas en *Spodoptera litura*, se clonó el receptor de la vitelogenina; localizándose la expresión temporal del receptor en el ovario. La expresión del mensajero codificante comenzó a partir del sexto día de la etapa de pupa, y se demostró que en el comienzo de la etapa adulta se encontraban altos niveles de expresión. Interesantemente, con la tecnología del RNA de interferencia se bloqueó el mensajero del receptor de vitelogenina en *S. litura* y se logró evitar el desove en las hembras adultas, impidiendo de esta manera la reproducción exitosa (Shu et al. 2010).

2.5.4. Receptor de vitellogenina en *Aedes aegypti* L.

El objetivo de estos experimentos realizados en *Ae. aegypti* era demostrar cómo estaba estructurado el gen del receptor de vitelogenina y sus niveles de expresión en la etapa previtelogénica y vitelogénica, previamente ya se había mostrado que el receptor era similar a la proteína “yolk” de *Drosophila melanogaster* (Sappington et al., 1996). Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que el gen del receptor de vitelogenina en *Ae. aegypti* contiene seis exones y cinco intrones. Los cinco intrones tienen un tamaño de 60pb, excepto el segundo intron que tiene 20kb de longitud. La mayoría de los intrones se localizaron dentro de las regiones codificantes en el primer dominio de la proteína. Los niveles encontrados de expresión del receptor se detectaron dramáticamente en el periodo vitelogénico que coincide con la alimentación y la mayor expresión se encontró en los ovarios de hembras de *Ae. aegypti* (Cho et al. 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

La reproducción, es la clave para la proliferación de las poblaciones de insectos. Dentro de los mecanismos más importantes para la reproducción está el proceso de la biosíntesis de la vitelogenina y su interacción con el receptor de la misma regulada por los oocitos. El éxito reproductivo de los insectos, depende en gran medida del buen funcionamiento de estos mecanismos en las células reproductivas, se ha reportado que mutaciones en el receptor impiden la ovoposición. Así que este mecanismo de interacción vitelogenina-receptor lo hace a su vez un candidato potencial para el control de insectos. A largo plazo, el estudio de esta interacción nos permitirá diseñar métodos para impedir la síntesis del receptor evitando así la reproducción de *B. cockerelli* Sulc.

4. HIPÓTESIS

La secuencia codificante parcial del receptor de vitelogenina en *B. cockerelli* Sulc es homóloga con la secuencia codificante para los receptores en *Aedes aegypti* L y *Blatella germanica* L; así también la expresión relativa del receptor de vitelogenina es más alta en hembras adultas de *B. cockerelli* Sulc. a diferencia de los estadios ninfales.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar molecularmente la secuencia parcial del receptor de vitelogenina y determinar la expresión del mismo en *B. cockerelli* Sulc.

5.1. Objetivos Particulares

- 5.1.1. Análisis de secuencias de receptores de vitelogenina y de β -actina de *Ae. aegypti* y *B. germanica* L para la localización de secuencias consenso para el diseño de oligonucleótidos degenerados y específicos.
- 5.1.2. Estandarización de las PCR's para la amplificación de las secuencias consenso en *B. cockerelli* Sulc empleando oligonucleótidos degenerados y específicos.
- 5.1.3. Determinación de la secuencia nucleotídica parcial del receptor de vitelogenina y b-actina en *B. cockerelli* Sulc.
- 5.1.4. Identificación de la expresión relativa del receptor de vitelogenina en especímenes adultos de *B. cockerelli* Sulc y estadios ninfales.

6. MÉTODOS.

6.1. Área de Estudio.

Los especímenes de *Bactericera cockerelli* Sulc se obtuvieron de la solanácea hospedera [tomate (*Solanum lycopersicum* L)] bajo condiciones de invernadero, los cuales fueron donados por el laboratorio del Dr. Refugio Lomelí Flores, del Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas Campus Montecillo, que se encuentra en la Carretera México- Texcoco km 36.5, en el Estado de México.

Los especímenes de campo en cultivos de papa de *B. cockerelli*, fueron recolectados en Galeana, Nuevo León el 12 de Junio de 2014. Galeana se encuentra ubicado en la parte central del Estado de Nuevo León, en las coordenadas 24°50' latitud norte y 100°04' longitud oeste, a una altura de 1,655 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Rayones, y con el estado de Coahuila; al sur con Aramberri y Doctor Arroyo; al este con Rayones, Montemorelos, Linares e Iturbide, y al oeste con los estados de Coahuila y San Luis Potosí (Ver Figura 9). Su extensión es de 7,154.6 kilómetros cuadrados.

El clima es seco estepario frío (BSK) y templado con lluvias de verano (CW), su temperatura media anual es de 19°C y su precipitación media es de 393 mm. Los vientos dominantes son del norte. La flora se compone de pino, encino, oyamel, cedro, mezquite, palma, lechuguilla, maguey, nopal, carrizo y nogal. Por otro lado, la fauna está conformada por conejos, leoncillo, armadillo, venado, coyote, oso, lobo, zorro, águila, ceniztonle, gorrión, perro de la pradera, etc.

En este municipio el suelo está compuesto de los tipos de castañozem, rendzina, fozem y en mayor escala por litosol y fluvisol. El uso potencial del suelo está distribuido como sigue: agricultura 49,523 hectáreas, ganadería 587,160 hectáreas, al uso forestal 68,668 hectáreas y al área urbana 150 hectáreas.



Figura 8. Representación esquemática de la ubicación del municipio de Galeana, en el estado de Nuevo León. Tomado de:
<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM19nuevoleon/index.html>

6.2. Recolecta de especímenes de *B. cockerelli* Sulc.

Las plantas con presencia de la plaga agrícola se trasladaron al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León (Figura 10). La recolecta de los insectos adultos se realizó con aspirador bucal y se colocaron vivos en tubos Axygen (Corning, MA, USA) de 15mL libres de DNA'sas y RNA'sas, debidamente rotulados, que contenían RNA later Tissue Collection (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las ninfas se colectaron con un pincel tratado con RnaseZap (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se colocaron en refrigeración a 4°C durante toda la noche, para permitir que la solución penetrara en el tejido. Pasado este tiempo, las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento. También, se preservaron muestras de las especies *Ae. aegypti* L y *Spodoptera sp* para usarlas como controles para los experimentos de laboratorio.

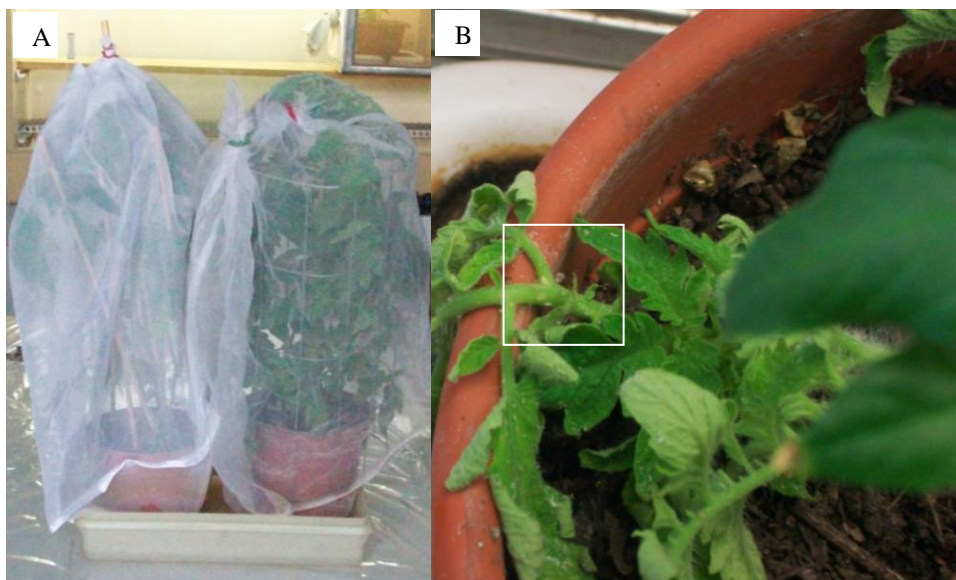


Figura 9. Especímenes de *B. cockerelli* Sulc en *Solanum lycopersicum* L. Los adultos se protegieron con tela de organza (A) durante el trayecto desde Texcoco Estado de México, hacia el Laboratorio de Toxicología y Fisiología, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Las ninfas (B) están señalizadas en el recuadro.

6.3. Dimorfismo sexual en *B. cockerelli* Sulc.

Los machos y las hembras pueden ser diferenciados por la forma del ápice del abdomen (Figura 11). El abdomen femenino maduro, termina con un ovopositor corto, es redondeado y más robusto a comparación con el abdomen masculino. Los genitales masculinos presentan una apariencia más angosta en la punta (Abullah, 2008).

6.4. Secuencias de los receptores de vitelogenina

La selección del receptor de vitelogenina se realizó debido a antecedentes publicados con especies donde ya se han reportado secuencias de proteínas o de DNA complementario y se ha demostrado su papel clave para la reproducción. Las secuencias nucleotídicas que han sido reportadas, en insectos, del receptor de vitelogenina se muestran en la Tabla 4.



Figura 10. Hembras y machos de *B. cockerelli* Sulc. La hembra (A) presenta 5 segmentos abdominales, además del genital. El macho (B) presenta seis segmentos abdominales y el órgano de apareamiento externo. Modificado de Bugwood.org y Abdullah 2008.

La selección del gen de β -actina se realizó porque es el control interno que se ha demostrado se expresa basalmente en todas las células y además, se ha empleado en estudios comparativos con el receptor de vitelogenina en otros insectos (Cho et al. 2001; Ciudad et al. 2006; Lu et al. 2015; Shu et al. 2010; Staley et al. 2010; Tufail et al. 2008). Las secuencias del gen β -actina utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. Secuencias nucleotídicas de los receptores de vitelogeninas en insectos

Especie	Número de acceso GenBank	Autor
<i>Nilaparvata lugens</i> Stal	GU723297.1	Lu et al. 2015
<i>Periplaneta americana</i> L	AB077047.2	Tufail et al. 2005
<i>Blatella germanica</i> L	AM050637.1	Ciudad et al. 2006
<i>Rhyarobia maderae</i> Fabricius	AB255883.1	Tufail et al. 2005
<i>Aedes aegypti</i> L	AY027888.1	Cho et al. 2001
<i>Drosophila melanogaster</i> Meigen	U13637.1	Schonbaum et al. 1995
<i>Solenopsis invicta</i> Buren	AY262832.1	Chen et al. 2004
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	GU983858.1	Shu et al. 2011
<i>Bombyx mori</i> L	AB201471.1	Gopalapillai et al. 2006
<i>Actias selene</i> Hubner	JQ809472.1	Xu et al. 2012
<i>Antheraea pernyi</i> Guérin-Ménéville	JN003583.1	Liu et al. 2011

Tabla 5. Secuencias nucleotídicas del gen β -actina en Insectos

Especie	Número de acceso GenBank	Autor
<i>Periplaneta americana</i> L	AY116670.1	Sehadova et al. 2005
<i>Blatella germanica</i> L	AJ862721.1	Maestro et al. 2005
<i>Aedes aegypti</i> L	XM_001659913.1	Nene et al. 2007
<i>Drosophila melanogaster</i> Meigen	NM_079643.2	Hoskins et al. 2007
<i>Drosophila simulans</i> Sturtevant	XM_002103274.1	<i>Drosophila</i> 12 genomes consortium, 2007
<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris	NM_001142636.1	NCBI
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	DQ494753.1	Huang et al. 2006
<i>Bombyx mori</i> L	NM_001126252.1	Mounier et al. 1987

Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas con programas de acceso libre en internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI) Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y EMBL-EBI ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), para la búsqueda de secuencias consenso para el diseño de los oligonucleótidos.

6.5. Diseño de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados utilizando el programa computacional: Primer3 v.0.4.0 (Rozen et al. 2000) disponible en línea (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Posteriormente, se realizaron las amplificaciones virtuales con el programa AmplifX v.1.5.4, para corroborar el peso molecular de los productos amplificados y la presencia de interacciones entre oligonucleótidos (primer's dimers) y finalmente se realizó una búsqueda en el programa Blast para descartar aquellos oligonucleótidos que amplificarán DNA's no deseados.

Los valores de temperatura media (T_m) de los oligonucleótidos, T_m del producto amplificado así como la temperatura de alineamiento teórica de la PCR fueron calculadas con el programa IDT disponible en línea (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y siguiendo las fórmulas descritas por Sambrook et al. 2001.

Además, se utilizaron oligonucleótidos degenerados previamente probados en la literatura como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos degenerados

Nombre	Secuencia	Fragmento	Autor
FW	GAYGGNDTNGAYGAYTGYGG	980 pb	Ciudad et al. 2005
RV	ARYTTRGCATCBACCCARTA		
VgR-S3	GGHVAATGYATCKMGTTG	505 pb	Shu et al. 2010
VgR-R3	TTVCSMGTVAYCCARTCCAC		

6.6. Protocolo de extracción de RNA total.

La extracción de los RNA's totales se realizó con material libre de RNA'sas, como tubos para microcentrífuga certificados (Scientific Specialties, Inc., CA, USA); agua DEPC [(dietilpirocarbonato), Life Technologies, Carlsbad, CA, USA]; soluciones disueltas en agua DEPC; micropipetas y material plástico tratados con RnaseZap (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Se usaron guantes para evitar la contaminación con las RNA'sas y se trató el área de trabajo previamente con RnaseZap.

La extracción de los RNA's totales se realizó utilizando el método de "Aislamiento de RNA con trizol" descrito por Chomczynski (1993), donde mediante maceración con pistilo de plástico, se homogeneizaron los tejidos de insectos con Trizol [500µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 15 individuos de *B. cockerelli* Sulc.] en tubos de microcentrífuga de 1.5mL. Posteriormente, se incubó la solución homogenizada durante 5 minutos a 25°C, para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió a la solución 0.2mL de cloroformo a cada tubo por 1mL de Trizol utilizado para la homogenización, se mezcló en vórtex vigorosamente durante 15 segundos, la mezcla resultante se incubó a 25°C durante 3 minutos y se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C. Una vez terminada la centrifugación se retiró el tubo gentilmente observando dos fases, la fase orgánica de color rojo (inferior) es fenol:cloroformo, una interfase y la fase acuosa (superior) donde se encuentran los RNA's totales (en el caso de individuos de *B. cockerelli* Sulc se observó la fase acuosa de color amarillo).

Para la precipitación de los RNA's, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 0.5mL de isopropanol por cada 1mL de Trizol utilizado en la homogenización inicial. Se incubaron las muestras a 25°C por 10 minutos y se centrifugaron a 12000g por 10 minutos a 4°C y se procedió al lavado de la pastilla de los RNA's, donde se removió el sobrenadante y se mezcló en vórtex con 1mL de etanol 75% por cada 1mL de Trizol empleado en la homogenización inicial. Se centrifugó a 7500g por 5 minutos a 4°C. Una vez obtenida la pastilla de RNA's, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de los RNA's a 25°C de 20 a 25 minutos, el tubo estaba invertido colocado en una kimwipe (Kimberly-Clark, Texas, USA) sin permitir que se secará totalmente. Por último, se resuspendió la pastilla en 50µl de agua DEPC.

La visualización de los RNA's se realizó en geles de agarosa (Bioline, Tauton, MA, USA) al 0.8% colocados en una cámara de electroforesis horizontal (Owl, EasyCast B1A MiniGel; ThermoScientific, Waltham, MA, USA) sumergidos en buffer SB 1X (Brody et al. 2004). Las muestras de los RNA's fueron mezcladas con 4µl de buffer de corrida [500µl de Jugo Azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y 1µl de gel Red nucleic acid stain 10000X in DMSO (Biotium, Hayward, CA, USA)] y fueron depositadas en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 40 minutos con una fuente de poder (Owl EC-105 Compac Powe Supply, ThermoScientific, Waltham, MA, USA). La fotodocumentación de los geles con los RNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV (Uvitec, Cambridge, United Kingdom).

6.7. Cuantificación del RNA total.

La cuantificación de la concentración (ng/µl) y la pureza (26nm-vs-280nm) del RNA total extraído, se realizó utilizando el equipo Nanodrop 2000/2000c (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

6.8. Síntesis de DNAc.

Posterior a la extracción de los RNA's, se llevó a cabo la síntesis de los cDNA mediante la técnica de "transcripción reversa" (RT) descrita por Gerard et al. (1994). Se realizaron las mismas condiciones utilizadas en la extracción de RNA's para evitar la contaminación por RNAsas. Se utilizaron dos enzimas para las RT-PCR's; la SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsband CA, USA), y la enzima High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

El estuche comercial SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR está optimizado para sintetizar cDNA de una cadena de RNA poli A (+) o RNA total, se tomaron hasta 5µg de RNA total, 1µl de dNTP's 10mM, 1µl de random hexamers 50ng/µl, y se llevó a un volumen final de 10µl con H₂O DEPC. Se incubó a 65°C por 5 min en el termociclador (Multigene OptiMax, Labnet Intenational, Edison, NJ, USA) y se colocó en una plancha fría (Laboratory chill table 1431, Bioquip, Rancho Dominguez, CA, USA) por al menos 1 minuto. A continuación, se preparó la mezcla de síntesis de cDNA, siguiendo este orden indicado 2µl de buffer de reacción 10X, 4µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de DTT 0.1M, 1µl de RNaseOUT (40U/µl) y 1µl de enzima SuperScriptIII RT (200U/µl). Se agregó 10µl de mezcla de síntesis de cDNA a cada mezcla de RNA/oligonucleótido. Posteriormente, se incubó 10min a 25°C seguido de 50min a 50°C; la reacción se terminó a 85°C por 5min, el producto obtenido se colocó en la plancha fría. Cada reacción, se centrifugó brevemente y se agregó 1µl de Rnase H; se incubó nuevamente por 20min a 37°C. Finalmente, cada cDNA sintetizado se guardó a -20°C hasta su uso.

El estuche High-Capacity cDNA Reverse Transcription usa el esquema de oligonucleótidos al azar para iniciar la síntesis de cDNA, esto asegura, que la síntesis ocurra eficientemente con todas las especies de RNA presentes, incluyendo mRNA y rRNA. Se tomaron hasta 2µg de RNA total, en un volumen de 10µl, se agregó por reacción 2µl de RT Buffer 10X, 0.8µl de mezcla de dNTP's 100mM, 2µl de random

primers, 1µl de MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl), 4.2µl de H₂O DEPC, obteniendo un volumen final de 20µl. A continuación se colocó en un termociclador (Biorad, T100 Thermal Cycler, Hercules, CA, USA) siguiendo las condiciones que han sido optimizadas para este estuche, 25°C por 10min, 37°C por 120min, 85°C 5min, 4°C durante una hora. El cDNA obtenido se almacenó, posteriormente, a -20°C.

6.9. Amplificación de la secuencia nucleotídica de β-actina y el receptor de vitelogenina.

La amplificación del fragmento de β-actina y el receptor de vitelogenina en los cDNA's se llevó a cabo mediante la metodología modificada de Sambrook et al. (2001). Todas las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes finales de 25µl, con 1µl de dilución 1 a 5 de cDNA obtenido con la enzima SuperScriptIII, 12.5µl de Gotaq colorless 2X (Madison, WI, USA), 2µl de oligonucleótidos 5µM, en tubos de microcentrífuga de 0.2mL. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador (Biorad T100 Thermal Cycler, CA, USA)

Para estandarizar la reacción de amplificación, se utilizaron gradientes de temperatura a partir de las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos empleados buscando la banda de amplificación más intensa.

6.10. Visualización de los productos amplificados en geles de agarosa.

Los productos amplificados obtenidos fueron analizados de la siguiente manera (Mar-Aguilar, 2006). Cinco µL del producto amplificado fueron mezclados con 4µl de buffer de corrida [500µl de Jugo Azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y 1µl de gel "Red nucleic acid stain" 10000X in DMSO (Biotium, Hayward, CA, USA)de jugo azul 6X]. La mezcla fue colocada en un gel de agarosa al 2% y se realizó la electroforesis a 200 V por aproximadamente 25 min. La fotodocumentación de los geles se realizó utilizando un transiluminador de luz UV (Uvitec, Cambridge, United Kingdom).

6.11. Secuenciación de los productos amplificados.

Los productos amplificados fueron secuenciados en el Departamento de Genética, en la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de la colaboración con el M.C. Iram Pablo Rodríguez Sánchez, utilizando un equipo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer y con el software del mismo (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Así como también, en la compañía MacroGen USA con el método de electroforesis capilar usando el equipo Applied Biosystems 3730XL.

6.12. Análisis de las secuencias.

Los datos obtenidos de las secuenciación fueron analizados con BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), ClustalW (EMBL-EBI, Cambridgeshire, United Kingdom), y GeneStudio (Profesional Edition, Version 2.2.0.0, genestudio.com).

6.13. Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión del receptor de vitelogenina y β -actina.

La PCR cuantitativa es un método que permite la cuantificación de manera absoluta o relativa de ácidos nucleicos con gran exactitud. Está basada en la monitorización de las PCR empleando fluorocromos.

Primeramente, el RNA total fue extraído de hembras, ninfas y machos de *B. cockerelli* como se describió previamente. El cDNA fue sintetizado a partir de 2 μ g de RNA en una reacción de 20 μ l usando la enzima High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los cDNA's fueron diluido a ~850ng/ μ l con H₂O DEPC (Price et al., 2009, Cuaranta-Monroy, 2008).

La mezcla de reacción para la PCR cuantitativa constó de 8 μ l de DNAC (~ 320ng), 1 μ l de la mezcla de ambos oligonucleótidos y sonda (Taqman GeneExpression Assay), 10 μ l de 2X PCR Master Mix y 1 μ l de H₂O. La mezcla de reacción se incubó a 50°C por 2 min y 95°C por 10 min 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1

min; esto en un StepOnePlus (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Ver Figura 12).

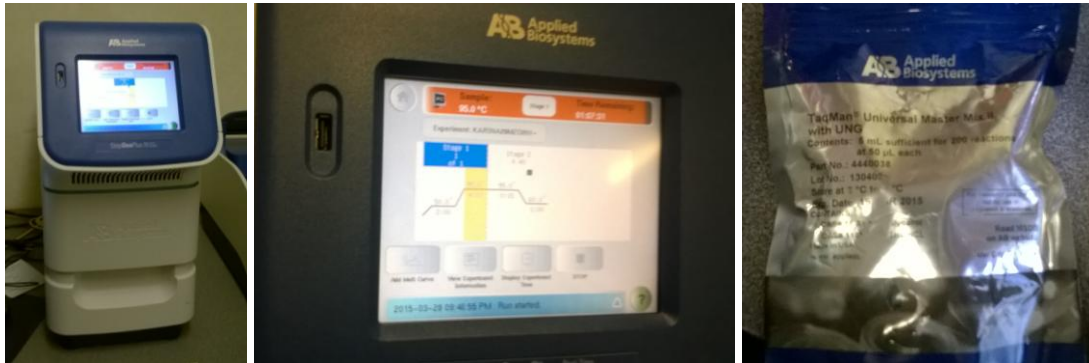


Figura 11. Reacción de PCR cuantitativa para la detección del receptor de vitelogenina y β -actina.

Las sondas taqman empleadas fueron diseñadas con base a las secuencias que se obtuvieron, y fueron marcadas con el fluorocromo FAM (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

El análisis de la cuantificación de los transcritos se realizó por el método de $\Delta\Delta C_t$, el cual consiste en determinar el valor del transcrito experimental (C_t) restando la constante de un transcrito control endógeno ($1^a\Delta$) y a esto restándole nuevamente la constante de referencia ($2^a\Delta$) (Rodríguez-Sánchez, 2011; <http://www.coloss.org/beebook/II/virus/12/2/3>)

Para la validación del ensayo se tiene que demostrar que el ΔC_t no varía por la concentración de los RNA's y esto se obtiene con la gráfica del rango dinámico y debe tener una pendiente de 0.1. Una vez validado el ensayo se comparó la expresión del receptor entre hembras, machos y ninfas en *B. cockerelli* (Rodríguez-Sánchez 2012; Schefe et al. 2006)

6.14. Análisis de resultados.

Los resultados obtenidos de los experimentos de cuantificación, fueron exportados a un archivo de Excel, y se calculó el $\Delta\Delta C_t$, para las hembras, machos y ninfas.

Posteriormente, se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$), para la determinación de la significancia de los resultados.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Recolecta de especímenes de *B. cockerelli* Sulc.

En cada sitio de recolecta se obtuvieron un promedio de 200 insectos de *B. cockerelli* Sulc, de los cuales un 10% fueron estadios ninfales. Los adultos y ninfas fueron preservados en RNA later, hasta que fue realizada la extracción de RNA total. La Figura 13 muestra los especímenes donados por el Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo.



Figura 12. Selección de especímenes en laboratorio de *B. cockerelli* (A) La planta de tomate *Solanum lycopersicum* (L), está protegida con tela de organza por la presencia de *B. cockerelli*. (B) Los especímenes fueron recolectados con aspirador bucal. (C) Adulto y (D) Ninfa de *B. cockerelli*.

7.2. Dimorfismo sexual en *B. cockerelli* Sulc.

La diferenciación sexual en adultos se determinó de acuerdo a lo reportado por Abdullah (2008). Posteriormente, éstos fueron colocados en tubos de 1.5mL en grupos de 15 individuos; las ninfas se agruparon igualmente, con 15 individuos sin diferenciar estadio. Los adultos que se recolectaron en campo fueron puestos en grupos de 8 hembras y 10 machos por tubo, debido al número de muestra.



Figura 13. Muestras de *B. cockerelli* Sulc clasificadas por dimorfismo sexual

7.3. Diseño de los oligonucleótidos.

En la tabla 7 se resumen las características de los oligonucleótidos diseñados que se utilizaron para encontrar el receptor de vitelogenina, así como también para amplificar el gen endógeno.

Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para el receptor de vitelogenina y los endógenos

Oligonucleótidos para β -actina			
Nombre	b-actin53	b-actin32	Genbank
Secuencia	GATCTGGCACCCACACCTTCT	ATTGGGACAGTGTGGGAGAC	NW_001811118.1
Tm (°C)	56.3	55.9	
TA (°C)	61.4	61.4	
Fragmento	243 pb		
Oligonucleótidos para receptor de vitelogenina			
Nombre	Nose5'	Nose3'	GenBank
Secuencia	TGTATGGATATGCAACAACAA CATAA	ACTTGATCAACCCAATAGAC CA	XM_001944117.2
Tm (°C)	53.7	53.4	
Ta(°C)	61.5	61.3	
Fragmento	386 pb		
Oligonucleótidos para receptor de vitelogenina			
Nombre	Left Fer4F	RightFer4R	GenBank
	CGACCGCCTGTAGAAGAGAC	TCCATTTTCGACAGCAATGA	SRX583042
Tm (°C)	64	56	
TA (°C)	62.1	59.6	
Fragmento	245 pb		
Oligonucleótidos para RNA ribosomal			
Nombre	4-FW	4-RV	GenBank
	ACGTGTGGAAGAACCCAAGT	GGAATGCGTTCACAACACAC	GQ249868.1
Tm (°C)	60	60	
TA (°C)	60.1	60.1	
Fragmento	177 pb		

Para estandarizar la amplificación de las PCR's utilizamos las condiciones de reacción sugeridas por la compañía comercial Promega con la enzima Gotaq(R) Colorless

(Madison WI, USA). También se utilizaron oligonucleótidos degenerados publicados en la literatura (Ciudad et al. 2005; Shu et al. 2010), pero ninguno de estos dio resultado positivo.

7.5. Protocolo de extracción de RNA total.

El aislamiento de los RNA's totales de los especímenes de las especies *B. cockerelli* Sulc, *Ae. aegypti* (L) y *Spodoptera sp.* que se encontraban preservados en RNA later se llevó a cabo mediante el método de Trizol descrito previamente en la metodología.

Winnebeck et al. (2010) reporta que el RNA proveniente de insectos presenta degradación debido a que si la muestra se calienta previamente a la electroforesis solo se presenta la banda del 18S. Pero, si la muestra no se calienta, las dos bandas esperadas son observables. Por lo que en este protocolo, las muestras no fueron desnaturalizadas por calor.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos en la extracción del RNA. Se puede observar las bandas de los RNA ribosomales 28S y 18S que indican la obtención del mismo.

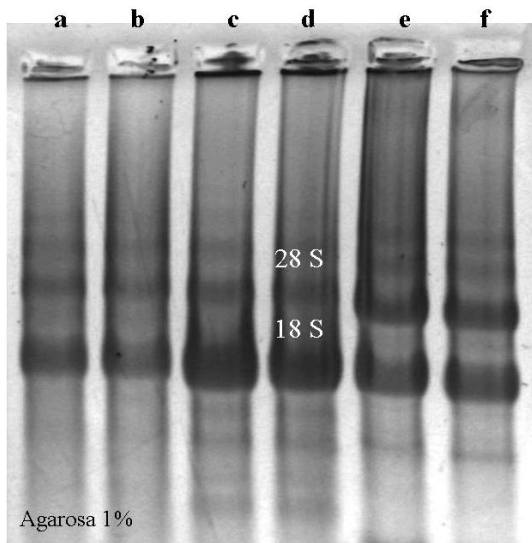


Figura 15. Extracción de RNA's total en diferentes especies de insectos. Los RNA's totales obtenidos por el método de Trizol se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Se puede observar las bandas 28S y 18S de los RNA's ribosomales. Cada carril contiene aproximadamente 1µg de RNA total. Las muestras en el gel corresponden a *B. cockerelli* Sulc (a y b), *Ae. aegypti* (L) (c y d), *Spodoptera sp.* (e y f).

7.6. Cuantificación de los RNA's totales y síntesis de los DNAc.

La concentración de los RNA's obtenidos en los grupos de *B. cockerelli* Sulc osciló entre 8200 ng totales hasta 14200 ng totales. La relación de absorbancia a las longitudes de onda 260/280 correspondió entre 1.48 hasta 1.96. Rodríguez-Sánchez en el 2012, menciona que obtener una relación < 1.80 en la longitud de onda 260/280 es originada por contaminación de proteínas; en cambio, en la ficha técnica del reactivo Trizol menciona que puede deberse a una incompleta disolución de la pastilla de RNA. Debido a ello, las muestras fueron sometidas a PCR con un gen endógeno para corroborar la calidad de las mismas, así como para analizar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción (Cuaranta-Monroy 2008).

Tabla 8. Cuantificaciones de RNA total de especímenes de *B. cockerelli*

Especie	Muestra	Variable	Concentración	260/280
<i>B. cockerelli</i> Sulc	1	Hembra	791	1.87
	2	Hembra	330.3	1.83
	3	Hembra	456.9	1.86
	4	Machos	347.3	1.92
	5	Machos	611	1.91
	6	Machos	1284.1	1.91
	7	Machos	327.9	1.94
	8	Machos	434.5	1.62
	9	Machos	226.1	1.54
	10	Machos	282.3	1.48
	11	Hembras	275.8	1.63
	12	Hembras	252	1.68
	13	Hembras	538.1	1.72
	14	Machos	347.7	1.84
	15	Machos	329.4	1.61
	16	Hembras (Galeana)	240.6	1.85
	17	Machos (Galeana)	517	1.68
	18	Ninfas	324.1	1.96
	19	Ninfas	306.9	1.93
	20	Ninfas	290.6	1.96
<i>Ae. aegypti</i> L	1	Hembras adultas sin alimentación sanguínea	3287	2.05
<i>Spodoptera</i> sp Guenée	1	adultos	2670.5	1.62

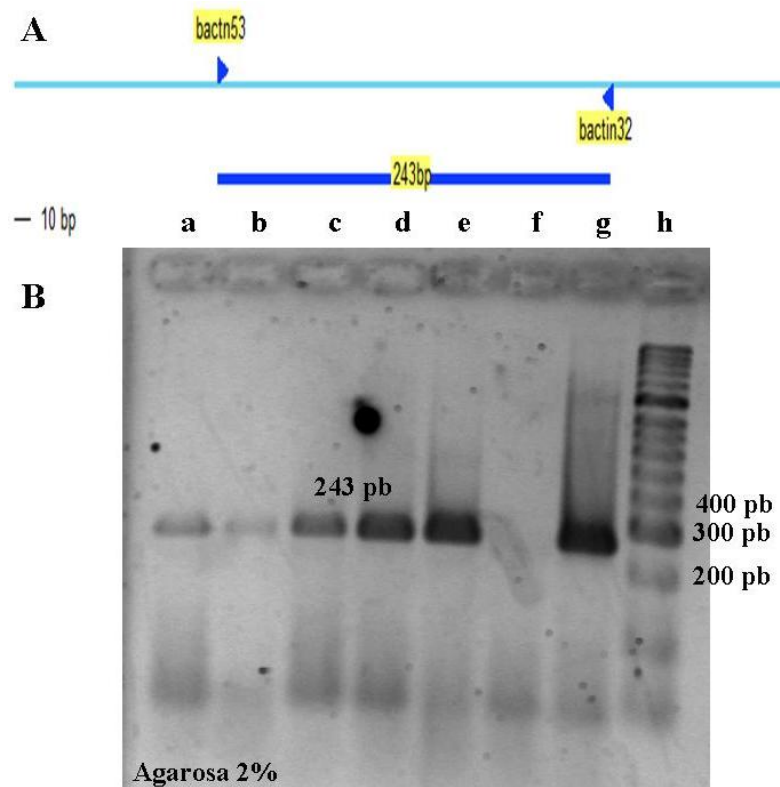


Figura 16. Amplificación del gen β -actina mediante PCR. La electroforesis en gel de agarosa al 2% muestra la amplificación de la banda de 243 pb que corresponde a β -actina de *B. cockerelli* Sulc (carriles a, d), *Ae. aegypti* L (b, e), *Spodoptera* sp. Guenée (carriles c,g). El carril f es una muestra de *Ae. aegypti* L que fue procesada sin enzima superscriptIII, para descartar contaminación por DNA genómico al realizar la extracción de RNA total. El carril h es el marcador de peso molecular Hyperladder II 50pb bioline.

7.7. Amplificación de la secuencia nucleotídica de β -actina y el receptor de vitelogenina.

Los RNA's totales obtenidos fueron utilizados para la síntesis de DNAc's mediante retrotranscripción reversa como se especifica en métodos y se realizó la amplificación del gen constitutivo β -actina.

El fragmento obtenido de 243pb corresponde al tamaño esperado para β -actina de acuerdo a las amplificaciones virtuales usando el programa AmplifX v.1.5.4 (Figura 16A). Además, como la amplificación de β -actina en los DNAc's mostró una buena intensidad en la banda, esto sugiere una calidad óptima de las extracciones de RNA.

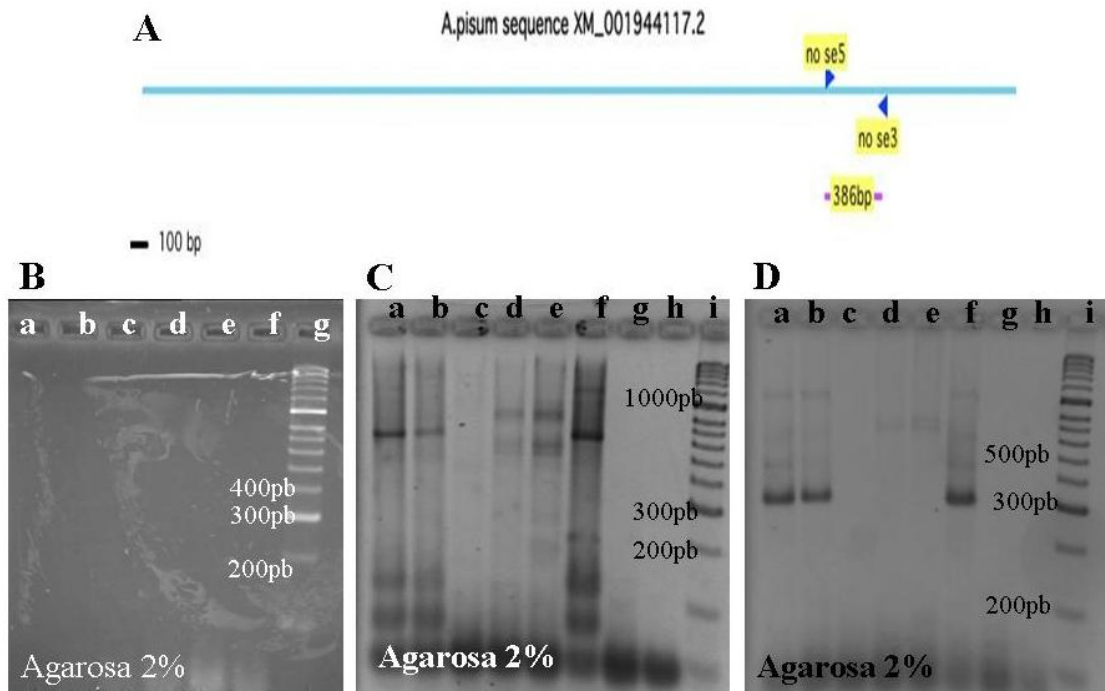


Figura 16. Amplificación del receptor de vitelogenina mediante PCR con oligonucleótidos degenerados y específicos. Los geles de agarosa muestran el patrón electroforético de las bandas obtenidas, las muestras de *B. cockerelli* (Sulc) (carriles a, b, c) y *Ae. aegypti* (L) (carriles d, e, f), controles negativos (sólo en las fotografías C, D; carriles g y h), marcador de peso molecular Hyperladder II 50pb bioline (fotografías B, C, D; carriles i, g) ninguna corresponde con las bandas esperadas y/o reportadas en la literatura.

Por otro lado, para el receptor de vitelogenina se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos; dos degenerados reportados en la literatura y dos específicos. Los primeros fueron diseñados para especímenes de *B. germanica* (L) y *S. litura* (Fabricius) y se utilizaron para *B. cockerelli* (Sulc), como se observa en la Figura 17C y 17D. Se observó amplificación en la electroforesis en gel, pero las bandas obtenidas no tenían el peso reportado para las especies de *B. germanica* (L) (980pb) y *S. litura* Fabricius (505pb), lo cual era esperado debido a que las secuencias de los receptores de vitelogenina en las especies de insectos es variable (Ciudad et al. 2005; Shu et al. 2010).

El primer par de oligonucleótidos específicos diseñados para el receptor de vitelogenina, se basó en la secuencia reportada para *Acyrtosiphon pisum* Harris en el GenBank con el número de acceso: NM_001142636.1. El fragmento esperado con base a las amplificaciones virtuales era de 386pb (Figura 17A), pero al realizar el experimento con las muestras de *B. cockerelli* Sulc no se observó banda en la electroforesis (Figura 17B),

esto es probablemente debido a que si no hay unión en el extremo 3' del oligonucleótido no empieza la síntesis de nuevas cadenas de DNA, como ocurre en los ensayos para detección de mutaciones o polimorfismos (Saavedra-Rodríguez et al. 2007; Yanola et al. 2011).

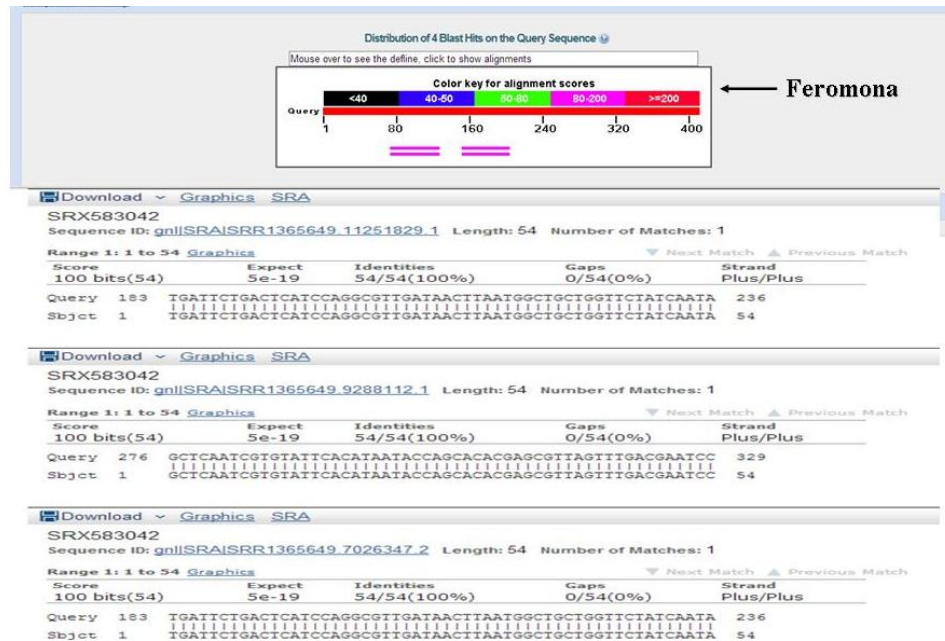


Figura 17. Diagrama esquemático del Blast de la secuencia de *S. litura* Fabricius en la secuencia de *B. cockerelli* Sulc. La flecha indica donde se sugiere la homología de la feromona.

El segundo par de oligonucleótidos específicos para el receptor de vitelogenina, fue diseñado con base a lo publicado por Ibanez et al. (2014). Estos investigadores hicieron el análisis del transcriptoma de la bacteria Candidatus *Liberibacter solanacearum* con su vector *B. cockerelli* Sulc, y reportaron en el GenBank el número de acceso de las secuencias obtenidas: GSE57808. Por lo que, realizamos una búsqueda por Blast del receptor de *S. litura* Fabricius (Shu et al. 2010) en las secuencias de *B. cockerelli* (Figura 18), encontrando homología en un fragmento aproximado de 80 a 200pb, esa secuencia se usó para el diseño de oligonucleótidos (Tabla 7).

El fragmento esperado mediante la PCR virtual era de 243 pb como se indica en la Figura 19A. Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa al 2% se obtuvo la banda esperada (Figura 19B) indicando la amplificación del receptor de vitelogenina.

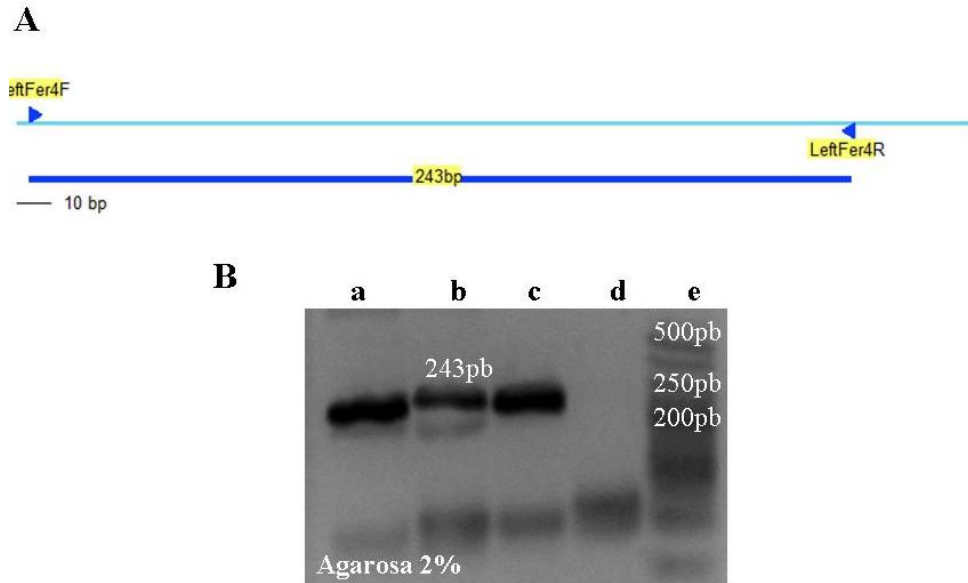


Figura 18. Amplificación del receptor de vitelogenina mediante PCR con oligonucleótidos específicos. El gel de agarosa al 2% muestra el patrón electroforético de la banda de 243pb. Muestras de *B. cockerelli* Sulc (carriles a, b, c), control negativo (carril d), marcador de peso molecular Hyperladder V, 25 pb bioline (carril e).

7.8. Análisis de las secuencias obtenidas.

Los productos amplificados obtenidos en el punto 7.7 fueron secuenciados por la compañía MacroGen USA, así como en Departamento de Genética, de la Facultad de Medicina de la UANL. Las secuencias obtenidas para el producto de PCR de β -actina para las especies *B. cockerelli* Sulc y *Ae. aegypti* (L) fueron sometidas al análisis de dominios conservados para corroborar que correspondía al fragmento de ese gen (Marchler-Bauer et al. 2011). La figura 20 muestra el resultado obtenido del análisis de dominios conservados en la página del NCBI para *B. cockerelli* Sulc.

Los productos de PCR de los oligonucleótidos degenerados fueron secuenciados directamente, sin pasar por clonación molecular, para verificar si se obtuvo una amplificación del receptor de vitelogenina. La figura 21 muestra que el electroferograma no tenía una buena eficiencia debido a la presencia de picos dobles en los nucleótidos, además, el análisis de dominios conservados dio como resultado un fragmento que contiene una secuencia codificante a una inmunoglobulina.

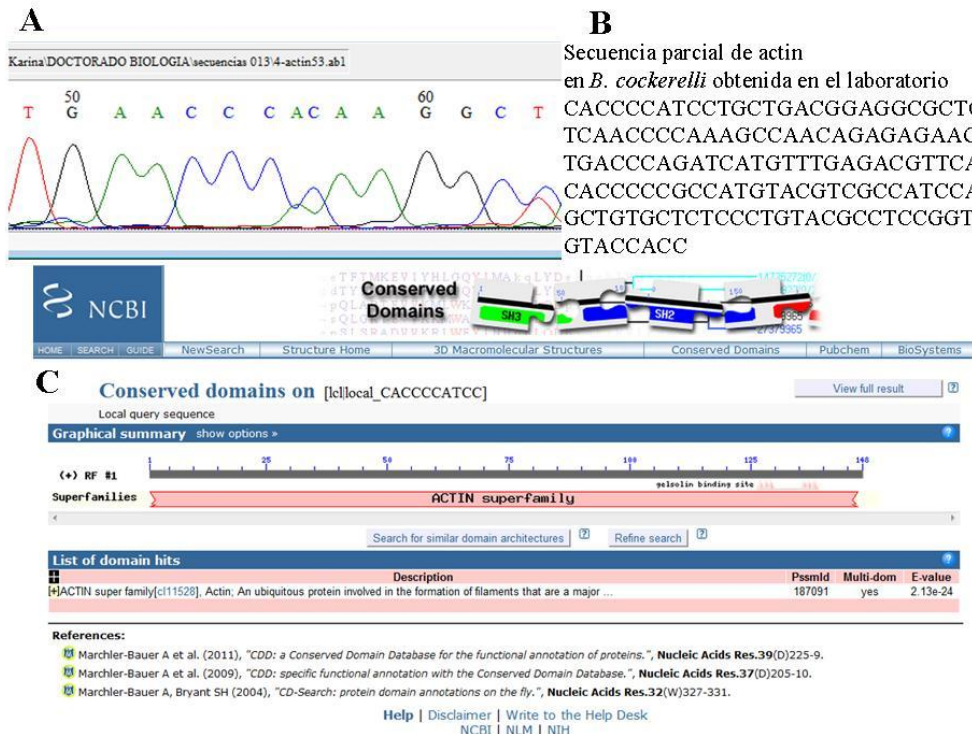


Figura 19. Programa de dominios conservados para la secuencia de β -actina en *B. cockerelli* Sulc. El electroferograma se muestra en A. El resultado demuestra que la secuencia obtenida de *B. cockerelli* Sulc (B) corresponde a la superfamilia de las actinas (C).

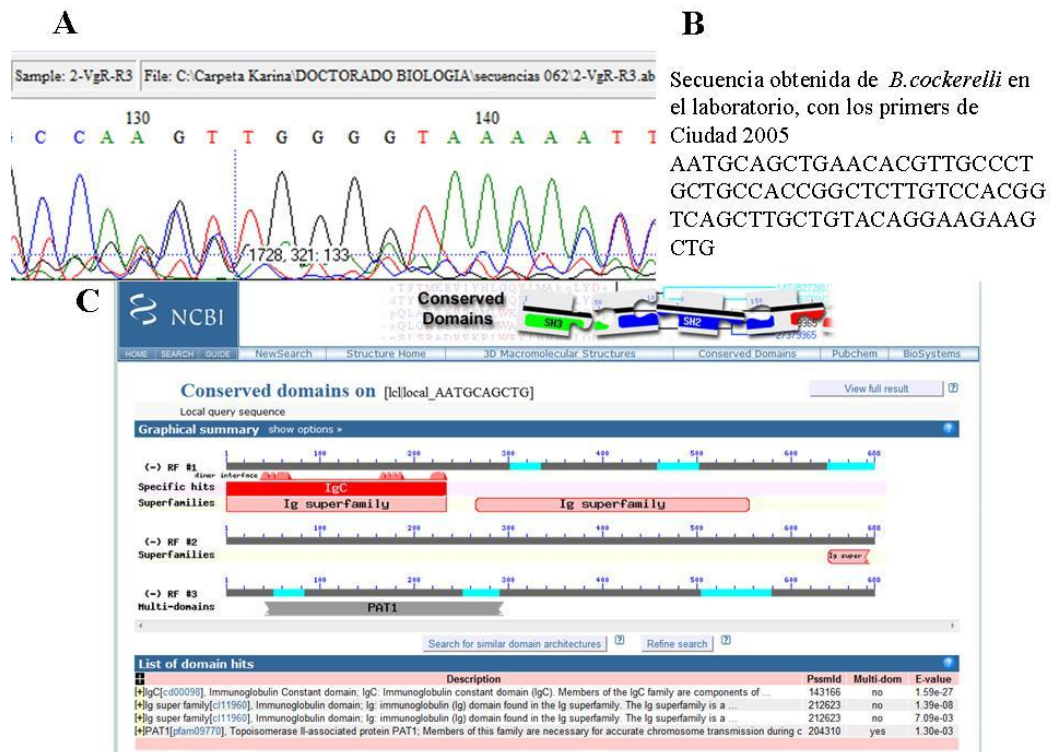


Figura 20. Programa de dominios conservados para la secuenciación con los oligonucleótidos degenerados publicados por Ciudad et al. en el 2005. El electroferograma de la secuencia se observa en A. La secuencia amplificada para *B. cockerelli* se observa en B. El análisis de dominios conservados se muestra en C.

Finalmente, el producto amplificado obtenido de los oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencias publicadas por Ibanez (2014), fue secuenciado. El análisis de dominios conservados para este fragmento no despliega resultados, a diferencia al utilizar la secuencia de *S. litura*. Esto se debe a que teniendo la secuencia completa, el programa localiza fragmentos homólogos en una región dada y posiblemente la secuencia en *B. cockerelli* este incompleta impidiendo encontrar homología (Marchler-Bauer et al. 2011).

El siguiente análisis que se realizó, fue comparar la secuencia, con la utilizada para el diseño de los oligonucleótidos. Como se observa en la Figura 22, el fragmento obtenido de 113 pb contiene homología en un 90% de la secuencia original reportada por Ibanez et al (2014).

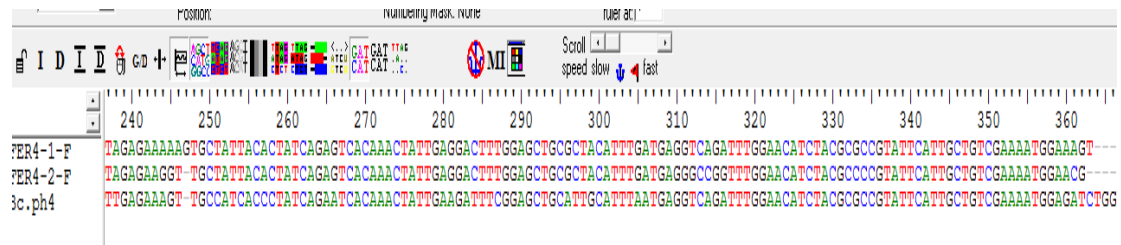


Figura 21. Alineamiento de secuencias del fragmento del receptor de vitelogenina. El alineamiento con el programa Bioedit muestra los nucleótidos donde hay homología de las secuencias obtenidas en el laboratorio, con las secuencias reportadas en el 2014.

7.9. Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión del receptor de vitelogenina y β -actina.

Los análisis de cuantificación relativa se realizaron con sondas diseñados en el laboratorio; para esto, se utilizaron las secuencias obtenidas en el punto 7.10, pero algunos nucleótidos tuvieron que ser enmascarados cuando había discrepancias en los alineamientos con la secuencia original publicada en el 2014. En la Tabla 9, se muestran los oligonucleótidos y sondas. Éstas últimas fueron marcadas con FAM y MGB (Rodríguez-Sánchez 2012).

Tabla 9. Sondas y Oligonucleótidos para la Cuantificación relativa, Applied Biosystems 4332078

Identificación del ensayo	Nombre	Secuencia
AIS09BH	Forward Primer A	GACGGAGGCGCTCTTCAAC
	Reverse Primer A	TCTCAAACATGATCTGGGTCATCT
	Probe A	CCAAAGCCAACAGAGAG
AIT97HP	Forward Primer F	TTCACACTATCAGAGTCACAACTATTGA
	Reverse Primer F	GATGTTCCAAATCTGACCTCATCA
	Probe F	ACTTTGGAGCTGCGCTA
AIVI5NX	Forward Primer R	CGAGGCACGCGAAAGC
	Reverse Primer R	CCGGGTCCATGTGTGAACTT
	Probe R	CGTGTGGAAGAACC

Las muestras de RNA aisladas de *B. cockerelli* Sulc provenientes de hembras, machos y ninfas fueron ajustadas para realizar las reacciones de retrotranscripción con la misma cantidad, con la finalidad de igualar todas las concentraciones de RNA a ~2000 ng. Una vez hecho las rt, se cuantificaron con Nanodrop y se ajustaron a ~850ng/μl.

Posteriormente, se realizó la validación de las PCR en tiempo real, la eficiencia de cada reacción fue de 90% para el receptor de vitelogenina y 98% para actina. El endógeno que utilizamos se eligió con base a las publicaciones de Lu et al. (2015), Shu et al. (2010) y Ciudad et al. (2005). Ibanez et al. (2014) utilizó el ribosomal, y nosotros probamos su eficiencia en el laboratorio, pero los Ct no estaban cercanos a los del receptor de vitelogenina (datos no mostrados). Los análisis por Kruskal-Wallis muestran que no hay diferencia significativa entre las muestras comparadas (0.406).

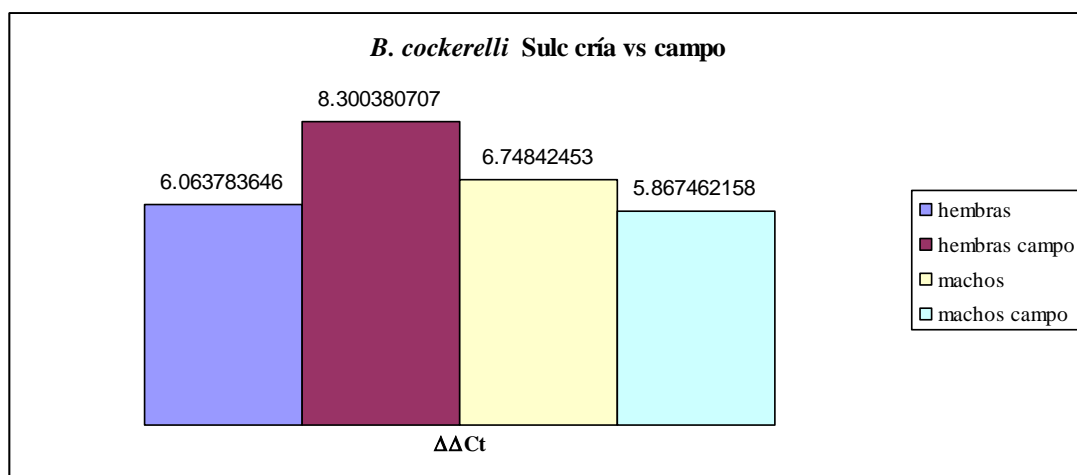


Figura 22. Cuantificación relativa del receptor de vitelogenina en hembras y machos. Las gráficas representan los $\Delta\Delta Ct$ provenientes de hembras y machos en cría, y especímenes de campo. Como se observa, las hembras de campo presentan mayor expresión del receptor de vitelogenina a comparación de las provenientes de cría. Los machos también presentan expresión del receptor.

Los resultados de los análisis de expresión, Figura 22, muestran interesantemente, que los machos de *B. cockerelli* Sulc presentan expresión del receptor de vitelogenina, en menor proporción que las hembras, tal como ocurre en especies de vertebrados analizados por Hiramatsu et al. (2004) y Perazzolo et al. (1999); pero a diferencia de lo que reporta Lu et al. en el 2015 con *Nilaparvata lugens*.

Las hembras presentaron como se esperaba expresión del receptor; se destaca que en el caso de las hembras provenientes de cría, la expresión parecería que fuera menor a la de los machos, es importante mencionar que los grupos de individuos donde se realizó la extracción de RNA total fue sin diferenciar que las hembras fueran tenerales, o tuvieran diferencia en la edad, por lo que la expresión relativa en esos casos no puede ser evaluada. Cho et al. (2001), o Ciudad et al. (2005) mostraron resultados de expresión a diferentes etapas del desarrollo en *Ae. aegypti* y *B. germanica* desde ninfas hasta hembras adultas en los diferentes ciclos gonadotróficos.

La Figura 23, muestra los $\Delta\Delta C_t$ de las muestras provenientes de campo, se hace la comparación entre hembras, machos y ninfas. Se puede observar, que en las hembras de campo, la expresión es dos veces más alta a comparación de los machos. Así como 0.6 veces mayor que las ninfas, esto es similar en cuanto a expresión a lo reportado a *N. lugens* Stal et al. (2015). En el 2008, Almeyda et al. reportaron que las poblaciones de *B. cockerelli* aumentaron considerablemente en los meses de junio-septiembre de ese año sobre cultivos de papa en Nuevo León, lo que podría indicar que hay fuente de alimento para *B. cockerelli* y ésta puede reproducirse. Por otro lado, es posible que la síntesis de vitelogenina en los machos se deba a la presencia de químicos en el ambiente, como ocurre en los peces macho que sintetizan vitelogenina por químicos disueltos en agua (Sumpter 1995).

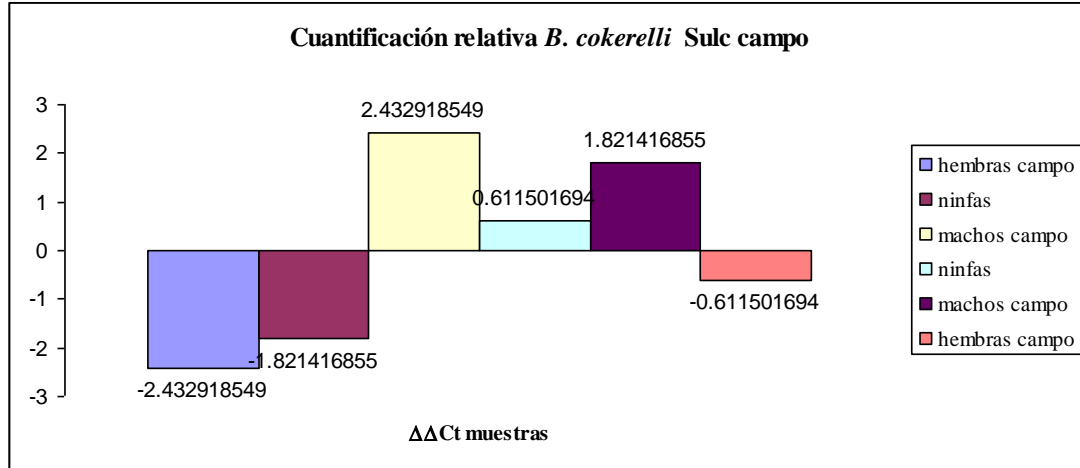


Figura 23. Cuantificación relativa de *B. cockerelli* Sulc entre hembras y machos provenientes de campo. La gráfica representa la diferencia de expresión entre machos y hembras provenientes de Galeana, Nuevo León.

Los especímenes de *B. cockerelli* Sulc donados por el Colegio de Posgraduados (COLPOS) a su vez fueron evaluados por cuantificación relativa. Como se observa en la Figura 24, las hembras tuvieron menor expresión a comparación de los machos, e incluso que las ninfas. Esto ocurrió, debido a que las muestras fueron agrupadas sin determinar la edad de los individuos procesados, o el ciclo gonadotrófico en el que se encontrarán, como se evaluó en *S. litura* (Shu et al. 2010) o *Ae. aegypti* (Cho et al. 2001).

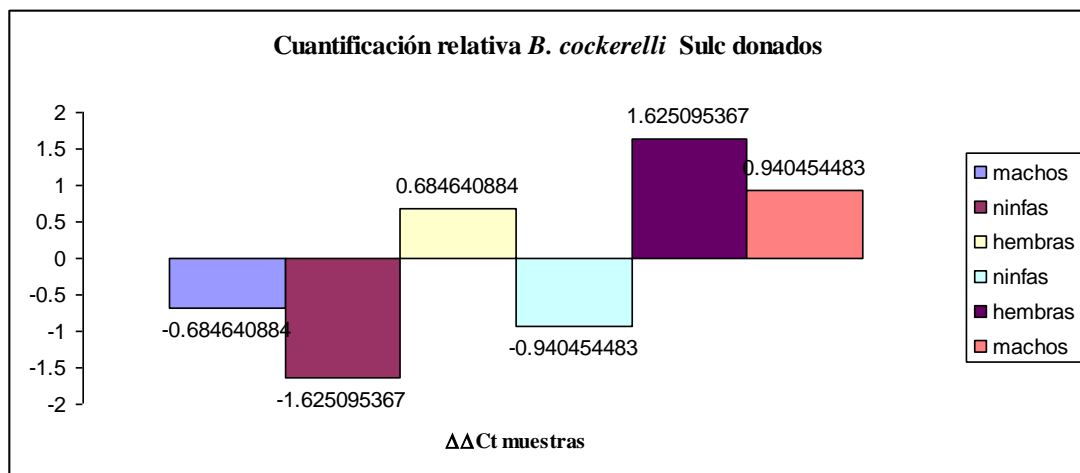


Figura 24. Cuantificación relativa de especímenes de *B. cockerelli* Sulc donados. Se observa la comparación entre hembras, machos y ninfas de la especie de interés.

8. CONCLUSIONES

En la presente investigación se determinó la presencia del receptor de la vitelogenina en *B. cockerelli* Sulc. Con la estrategia experimental, se encontró la secuencia parcial del receptor, observándose que en la anotación en GSE57808 se encuentra nombrada como una feromona. El porcentaje de similitud de la secuencia obtenida en el laboratorio con la reportada en la anotación es de un 90%. Así como, las secuencias de β -actina usada como endógeno para los ensayos realizados, presentan un 100% de similitud con las reportadas en el GenBank.

Los análisis de expresión demuestran que el receptor de vitelogenina se encuentra expresado en hembras y machos, a diferencia de las ninfas donde su expresión es baja, específicamente en los especímenes provenientes de Galeana, Nuevo León. En cambio, los donados por el Colegio de Posgraduados presentan diferencia de expresión, pero es debida a la edad de los especímenes recolectados.

Estudios a futuro sobre el receptor de la vitelogenina son necesarios para dilucidar la secuencia completa del mismo, así como también proponer estrategias encaminadas a encontrar isoformas de la proteína, mutaciones en la secuencia codificante o emplear la técnica de RNA de interferencia como método de control para esta especie plaga.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah NMM. 2008. Life history of the potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in controlled environment agriculture in Arizona. *Afr. J. Agric. Res.* 3:60-67

Abernathy R. 1991. Investigations into the nature of the potato psyllid *Paratrioza cockerelli* Sulc. M.Sc. Thesis, Colorado State University, Fort Collins CO. pp. 54.

Al-Jabr A M. 1999. Integrated Pest Management of Tomato/Potato Psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae) with Emphasis on its Importance in Greenhouse Grown Tomatoes. Department of Bioagricultural Sciences and Pest Management. In partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy Colorado State University Fort Collins. pp. 69.

Almeyda IH, Sánchez JA, Rubio CO, Ramos VO, Rocha MA. 2002. Detección molecular de fitoplasmas en insectos y maleza asociados al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). En: Fuentes G (eds). Memorias del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resumen F-141.

Almeyda-León IH, Sánchez-Salas JA, Garzón-Tiznado JA. 2008. Vectors casual of potato purple top in Coahuila and Nuevo León, México. *Agricultura Técnica en México.* 34(2): 141-150.

Arslan, A., Bessey, P.M., Matsuda, K., and Oebker, N.F. 1985. Physiological effects of psyllid (*Paratrioza cockerelli*) on potato. *American Potato Journal* 62:9-22.

Bayer CropScience 2005. Boletín técnico de la *Paratrioza cockerelli* o pulgón saltador del tomate y la papa.

Bravo ME. 2002. Reduced insecticide use and biological control of tomato pests in Oaxaca. *Agric Téc Mex* 28(2): 137-149.

Brody JR, Kern SE. 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36: 214-216.

Bronner I, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. 2009. Improved protocols for Illumina genome analyzer sequencig system. *Current Protocols in Human Genetics.* 62:18.2:18.2.1-18.2.27. DOI: 10.1002/0471142905.hg1802s62.

Buchman JL, Sengoda VG, Muyaneza JE. 2011. Vector transmission efficiency of *Liberibacter* by *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in zebra chip potato disease: effects of psyllid life stage and inoculation access period. *J. Econ. Entomol.* 104(5): 1486-1495. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC11123>.

- Bujanos R, Garzón JA, Marín A. 2005. Manejo Integrado del pulgón saltador *Bactericera* (=Paratrioza) *cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) en los cultivos de solánaceas en México. Second World Pepper Convention. pp 93-99.
- Burckhardt D, Lauterer P. 1997. A taxonomic reassessment of the triozid genus *Bactericera* (Hemiptera:Psylloidea). Journal of Natural History 31:99-153. DOI: 10.1080/00222939700770081.
- Butler CD, Trumble JT. 2012a. The potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae): life history, relationship to plant diseases, and management strategies. Terrestrial Arthropod Reviews 5: 87–111.
- Butler CD, Trumble JT. 2012b. Identification and impact of natural enemies of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in Southern California. J. Econ. Entomol. 105(5): 1509-1519.
- Carter W. 1939. Injuries to plants caused by insects toxins. Bot. Rev. 5: 273-326.
- Cadena HM, Guzmán PR, Díaz VM, Zavala QT, Magaña TO, Almeyda LI, López DH, Rivera PA, Rubio CO. 2003. Distribución, Incidencia y Severidad del Pardeamiento y la Brotación Anormal en los Tubérculos de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles Altos y Sierras de los Estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 248-259.
- Cerón-González C, Lomelí-Flores JR, Rodríguez-Leyva E, Torres-Ruiz A. 2014. Fecundidad y alimentación de Tamarixia triozae (Hymenoptera:Eulophidae) sobre el psílido de la papa *Bactericera cockerelli*. Rev Mex Cienc Agr 5(5): 893-899.
- Chen ME, Lewis DK, Keeley LL, Pietrantonio PV. 2004. cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). Insect Mol Biol 13: 195–204.
- Chen JS, Sappington TW, Raihkel AS. 1997. Extensive sequence conservation among insects, nematode and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. Journal Molecular Evolution 44:440-451.
- Cho KH, Raikhel AS. 2001. Organization and development expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. Insect Mol Biol. 10:465-474.
- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques. 15(3): 532-537.
- Ciudad L, Piulachs MD, Bellés X. 2006. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. FEBS J. 273: 325–335.

- Compere H. 1943. A new species of *Metaphycus* parasite on Psyllids. Pan-Pacific Entomologist. 19: 71-73.
- Cranshaw WS. 1993. An annotated bibliography of potato/tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae). Colorado State University Agricultural Experiment Station Bulletin TB93-95.
- Cranshaw W.S. 1994. The potato (tomato) psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc), as a pest of potatoes. pp 83-95. En Zehnder GW, Powelson ML, Hansson RK, Raman KW (eds). Advances in Potato Pest Biology and Management, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Crawford DL. 1911. American Psyllidae III (Triozinae). Pomona Journal of Entomology 3: 421-453.
- Crawford DL. 1914. A monograph on the jumping plant-loce of the new world. United States National Museum Bulletin 85: 186 pp.
- Crosslin JM, Munyaneza JE, Brown JK, Liefting LW. 2010. Potato zebra chip disease: a phytopathological tale. Online. Plant Health Progress. doi: 10.1094/PHP-2010-0317-01-RV.
- Crosslin JM, Hamm PB, Eggers JE, Rondon SI, Sengoda VG, Munyaneza JE. 2012a. First report of zebra chip disease and “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on potatoes in Oregon and Washington State. Plant Disease 96: 452.
- Crosslin JM, Olsen N, Nolte P. 2012b. First report of zebra chip disease and “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on potatoes in Idaho. Plant Disease 96: 453.
- Ciudad L, Piulachs MD, Bellés X. 2005. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. FEBS J 273: 325–335.
- Ciudad L, Bellés X, Piulachs MD. 2007. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. BMC Molecular Biology 8:53 doi:10.1186/1471-2199-8-53
- Compere H. 1916. Notes on the potato psylla. Monthly Bull. Calif. State Commiss. Hort. 5: 71-73.
- Cuaranta-Monroy I. 2008. Sobreexpresión de los genes HoxA10, transcrito 2, A11 y B13 en tejidos ováricos con patología maligna. Tesis de Maestría. FCB, UANL.
- Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RG, Rusell DW, Brown MS. 1987. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. Nature 326: 497-505.

Davis CG, van Driel IR, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. 1987. The low density lipoprotein receptor identification of amino acids in cytoplasmatic domain required for rapid endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 262: 4075-4082.

Díaz G, Tejada E, Avalos A. 2005. Efecto de insecticidas biorracionales y mezclas de hongos sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae). *Entomología Mexicana* 5: 539-541.

DiMario PJ, Mahowald AP. 1987. Female sterile (1)yolkless: a recessive female sterile mutation in *Drosophila melanogaster* with depressed numbers of coated pits and coated vesicles within the developing oocytes. *J Cell Biol* 105: 199–206.

Drosophila 12 genomes consortium. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203-218.

Engelmann F. 1979. Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and the role in vitellogenesis. *Advances in Insect Physiology* 14: 49-108.

Engelmann F. 1983. Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. In: Downer RGH, Laufer H. (Eds). *Endocrinology of Insects*. Alan R. Liss, New York p 259-270.

EPPO Bulletin. 2013. *Bactericera cockerelli*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 43(2): 202-208. DOI: 10.1111/epp.12044.

(ESA) Entomological Society of America. 2011. Common names of insects database. Entomological Society of America at: <http://www.entsoc.org/common-names>

Espinoza HR. 2010. Facing the *Bactericera cockerelli/Candidatus Liberibacter* complex in Honduras. In: Proceedings of the 10th Annual Zebra Chip Reporting Session, pp. 47–49. Dallas, TX, USA.

Essig EO. 1917. The tomato and laurel psyllid. *Journal of Economic Entomology* 10: 433-444.

Feng MG, Poprawsky TJ, Khachatourians GG. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Technol.* 4:3-34.

Ferguson G, Banks E, Fraser H. 2003. Potato Psyllid - A New Pest in Greenhouse Tomatoes and Peppers. Ontario Ministry of Agriculture, Foods and Rural Affairs fact sheet. Ontario, Canada: Ontario Ministry of Agriculture and Food (online). http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/potato_psyllid.htm

Ferris GF. 1925. Observations on the Chermidae (Hemiptera; Homoptera). Part II. *Canadian Entomologist* 57: 46-50

García de la Rosa J, Flores A. 2002. Potato Purple Top. Pfizer, México.

García-Negroe CB. 2007. Transmisión de fitoplasmas por *Bactericera cockerelli* (Sulc) a plantas de chile, papa y tomate. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. México. pp 160.

Garzón TJA. 1984. Enfermedad del “permanente” del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Gto. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, SLP. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 138.

Garzón TJA, Garza CA y Bujanos MR. 1986. Determinación del insecto vector de la enfermedad de tipo viral “permanente del tomate” (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la región del Bajío, In: XIII Congreso Nacional de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chis. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 30.

Garzón J, Becerra F, Marín A, Mejía A, Byerly M. 1992. Manejo integrado de la enfermedad “permanente del tomate” (*Lycopersicon lycopersicum* Karst ex Fawll Mill.) en el Bajío. En: Urías C, Rodríguez R, Alejandre T. (eds). Áfidos como vectores de virus en México. Colegio de Posgraduados. Centro de Fitopatología. pp. 116-129.

Garzon JA. 2003. El pulgón saltador o la Paratrioza, una amenaza para la horticultura de Sinaloa. En: Memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México. pp 9-12.

Garzón JA, Garzón-Ceballos JA, Velarde SF, Marín AJ, Cárdenas OG. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al “permanente del tomate” por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc, en México. Entomol Mex 4: 672-675.

Garzón-Tiznado JA, Bujanos-Muñiz R, Marín-Jarillo A. 2007. Manejo Integrado de Paratrioza *Bactericera cockerelli* Sulc. Folleto para productores No. 54. Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Valle de Culiacán. Culiacán, Sinaloa, México.

Gerard GF. 1994. Inhibition of supercript II Reverse Transcriptase by common laboratory chemicals. Focus 16(4): 102.

Gill G. 2006. Tomato psyllid detected in New Zealand. Biosecurity New Zealand 69: 10–11.

Goldstein JL, Brown MS. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem. 249: 5153–5162.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW, Schneider WJ. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 1–39.

Gopalapillai R, Kadono-Okuda K, Tsuchida K, Yamamoto K, Nohata J, Ajimura M, Mita K. 2006. Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternative splicing, and isolation of a new isoform. *Journal of Lipid Research.* 47: 1005-1013.

Granados-Echegoyen CA. 2010. Alternativas biorracionales para el control de paratíroza *Bactericera cockerelli* Sulzer (Hemiptera:Psyllidae) en laboratorio. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. IPN.CIIDIR. Oaxaca. Pp 95.

Guidugli-Lazzarini KR, Mendes-do-Nascimento A, Donato-Tanaka E, Piulachs MD, Hartfelder K, Gentile-Bitondi M, Paulino-Simões ZL. 2008. Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L) queen and workers. *Journal of Insect Physiology.* 54: 1138-1147.

Hail D, Hunter WB, Dowd SE, Bextine B. 2010. Expressed sequence tag (EST) survey of life stages of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, using 454 pyrosequencing. *Southwestern Entomol.* 35(3):463-466. doi: 10.3958/059.035.0333.

Halbert SE, Munyaneza JE. 2012. The potato psyllid and its associated pathogens. Accessed (13 may 2015) – <http://www.protectingusnow.org/>.

Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R, Paine TD. 2008. A new Huanglongbing species, “*Candidatus Liberibacter psyllaurosus*”, found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc.) *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5862-5865.

Hill RE. 1947. An unusual weather sequence accompanying the severe potato psyllid outbreak of 1938 in Nebraska. *J. Kansas Entomol. Soc.* 20: 88-92.

Hiramatsu N, Chapman RW, Lindzey JK, Haynes MR, Sullivan CV. 2004. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*). *Biol. Reprod.* 70: 1720-1730.

Hodkinson ID. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta:Hemiptera:Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History* 43:65-179.

Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, Frise E, Wan KH, Park S, Mendez-Lago M, Rossi F, Villasante A, Dimitri P, Karpen GH, Celniker SE. 2007. Sequence Finishing and Mapping of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin. *Science.* 316: 1625-1628.

Horne PA, Ridland PM, New TR. 2001. *Micromus tasmaniae*: a key predator on aphids on field crops on Australasia? En: McEwen PK, New TR, Whittington AE (eds). *Lacewings in the Crop Environment*. Cambridge University Press. pp: 338-394.

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch
&LINK_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/index.html>

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM19nuevoleon/index.html>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001142636.1

<http://www.siap.gob.mx/>

Huang S, Han Z. 2006. Molecular analysis of a novel cytochrome P450 gene involved in metabolism of deltamethrin in *Spodoptera litura*. Unpublished.

Ibanez F, Levy J, Tamborindeguy C. 2014. Transcriptome analysis of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in its Psyllid vector, *Bactericera cockerelli*. *PLoS ONE* 9(7): e100955. doi: 10.1371/journal.pone.0100955.

Invasive Species Compendium. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/45643>

IRAC, Insecticide Resistance Action Committee. 2014. Mode of action classification Brochure. 4th Edition.

Jackson BC, Goolsby J, Wzykowski A, Vitovksy N, Bextine B. 2009. Analysis of genetic relationship between potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) populations in the United States, Mexico, and Guatemala using ITS2 and inter simple sequence repeat (ISSR) data. *Subtropical Plant Science* 61: 1–5.

Jensen DD. 1954. Notes on the potato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Psyllidae). *Pan-Pacific Entomologist* 30: 161–165.

Johnson SA. 1971. The effectiveness of *Tetrastichus triozae* Burks (Hymenoptera:Eulophidae) as a biological control agent of *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Homoptera:Psyllidae) in north central Colorado. M.S. Thesis, CO. State. Univ. Fort Collins 45 pp

Jorgensen N, Taylor N, Berry N, Butler R. 2011. Seasonal abundance of *Bactericera cockerelli* and beneficial insects in a potato crop in Canterbury. *N. Z. Plant Prot.* 64: 292.

- Klowden MJ. 2007. Physiological systems in Insects. Elsevier. USA. pp. 181-238.
- Knowlton GF. 1933a. *Aphis lion* predator of the potato psyllid. J. Econ. Entomol. 26: 997.
- Knowlton GF. 1933b. Ladybird beetles as predators of the potato psyllid. Can. Entomol. 65:241-243.
- Knowlton GF, Thomas WL. 1934a. Host plants of the potato psyllid. Journal of Economic Entomology 27: 547.
- Knowlton GF. 1934. A big-eyed predator of the potato psyllid. Florida Entomol. 18: 40-43.
- Lacey LA, de la Rosa F, Horton DR. 2009. Insecticidal activity of entomopathogenic fungi (Hypocreales) for potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae): development of bioassay techniques, effect of fungal species and stage of the psyllid. Biocontrol Sci. Tech. 19: 957-970.
- Lacey LA, Liu TX, Buchman JL, Munyaneza JE, Goolsby JA, Horton DR. 2011. Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. Biol. Control 56: 271-278.
- Lawson DS, Dumbar DM, White SM. 1999. Actara 25 WG: Control of cotton pest with a new neonicotinoid insecticide, thiametoxan. Proc Beltwide Cotton Conference, Memphis 2:1106-1109.
- Lee JM, Nishimori Y, Hatakeyama M, Bae TW, Oishi K. 2000. Vitellogenin of the cicada *Graptosaltria nigrofuscata* (Homoptera): analysis of its primary structure. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 30: 1-7.
- Leyva-López NE, Ochoa-Sánchez JC, Leal-Klevezas DS, Martínez-Soriano JP. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. Can. J. Microbiol 48:1062-1068. DOI: 10.1139/W02-109.
- Liefting LW, Perez-Egusquiza XC, Clover GRG. 2008. A new “*Candidatus Liberibacter*” species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. Plant Dis. 92: 1474.
- Liefting LW, Southerland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS, Clover GRG. 2009a. A new “*Candidatus Liberibacter*” species associated with diseases of solanaceous crops. Plant. Dis. 93: 208-214.
- Liefting LW, Weir BS, Pennycook SR, Clover GRG. 2009b. “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” a liberibacter associated with plants in the family Solanaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2274-2276.

Lin H, Doddapaneni H, Munyaneza JE, Civerolo EL, Sengoda VG, Buchman JL, Stenger DC. 2009. Molecular characterization and phylogenetic analysis of 16S rRNA from a new “Candidatus Liberibacter” strain associated with Zebra Chip disease of potato (*Solanum tuberosum* L) and the potato psyllid (*Bactericera cockerelli* Sulc. J Plant Pathol 91:215-219.

Lin Y, Meng Y, Wang YX, Luo J, Katsuma S, Yang CW, Banno Y, Kusakabe T, Shimada T, Xia QY. 2013. Vitellogenin Receptor mutation leads to the oogenesis mutant phenotype “scanty vitellin” of the silkworm *Bombix mori*. The Journal of Biological chemistry. 288(19): 13345-13355.

List GM. 1925. The tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli* Sulc. Colo. State Entomol. Circ. 47.

List GM. 1935. Psyllid yellows of tomatoes and control of the psyllid, *Paratrioza cockerelli* Sulc, by use of sulphur. J. Econ. Entomol. 28: 431-436.

List GM. 1939. The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch, and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Journal of Economic Entomology. 32:30-36.

Liu D, Trumble JT. 2004. Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. J Econ Entomol 97:1078-1085.

Liu D, Trumble JT. 2005. Interactions of plants resistance and insecticides on the development and survival of *Bactericera cockerelli*.

Liu D, Trumble JT. 2006a. Ovipositional preferences, damage thresholds, and detection of the tomato–potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) on selected tomato accessions. Bull Entomol Res 96:197-204.

Liu D, Trumble JT, Stouthamer R. 2006b. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. Entomologia Experimentalis et Applicata. 118: 177-183.

Liu QN, Zhu BJ, Liu CL, Wei GQ, Wang ZG. 2011. Characterization of vitellogenin receptor (VgR) from the chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. Bulletin of Insectology. 64(2): 167-174.

Lomelí-Flores JR, Bueno-Partida R. 2002. Nuevo registro de Tamarixia trioza (Burks) parasitoide del psílido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllida) en México. Folia Entomol. Mex 41(3): 375-376.

López MM, R. Gastélum Luque R, Olivas MC, Corrales JL. 2003. “Experiencia con *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Homoptera:Psyllidae) en tomate grape variedad ‘Santa’ y berenjena *Solanum melongena*”. En: Memorias VI Congreso Internacional en Ciencias

Agrícolas. UABC-ICA, CESVBC, FUNDACIÓN PRODUCE BC, SAGARPA. Mexicali, B.C. Pp. 670-675.

López B, Favela S, Ponce G, Foroughbakhch R, Flores AE. 2013. Genetic variation in *Bactericera cockerelli* (Hemipter:Triozidae) from Mexico. J. Econ. Entomol. 106 (2): 1004-1010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC12258>.

Lu K, Shu Y, Zhou J, Zhang X, Zhang X, Chen M, Yao Q, Zhou Q, Zhang W. 2015. Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stal). Journal of Insect Physiology. 73: 20-29.

Maestro O, Cruz J, Pascual N, Martín D, Bellés X. 2005. Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). Molecular and Cellular Endocrinology. 238 (1-2): 27-37.

Mar-Aguilar F. 2006. Caracterización molecular de los genes que codifican para los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. Tesis de Doctorado. F.C.B., U.A.N.L.

Maramorosch K. 1998. Potato purple top wilt. Segundo Simposium Internacional de Papa. Toluca, Estado de México. p. 13-15.

Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. Nucleic Acids Research. 39(D)225-9.

McGuire A. 2002. Agri-Focus septiembre 2002. Cooperative Extension, Washington State University, Pullman, WA, USA.

McGregor RR. 2013. *Bactericera cockerelli* (Sulc.), Tomato/Potato Psyllid (Hemiptera:Triozidae). En: Mason PG, Gillespie DR. (eds). Biological Control programmes in Canada 2001-2012. CAB International. Oxfordshire, UK. pp:107-112.

Molina JD, Mairena B S, Aguilar L B. 2004. Guía MIP en el Cultivo de la Papa. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Mordue AJ, Blackwell A. 1993. Azardirachtin: an update. J. Insect Physiol. 39:903-924.

Mounier N, Gaillard J, Prudhomme JC. 1987. Nucleotide sequence of the coding region of two actin genes in *Bombyx mori*. Nucleid Acids Research. 15(6): 2781.

Munyaneza JE, Crosslin JM & Upton JE. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100: 656–663.

Munyaneza JE, Buchman JL, Crosslin JM. 2009a. Seasonal occurrence and abundance of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, in South Central Washington. *American Journal for Potato Research* 86: 513-518.

Munyaneza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, De la Rosa-Lozano G, Sanchez A. 2009b. First report of ‘*Candidatus Liberibacter psyllaourous*’ in potato tubers with zebra chip disease in Mexico. *Plant Disease* 93: 552.

Munyaneza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, Garzon-Tiznado J, Cardenas-Valenzuela O. 2009c. First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in tomato plants in Mexico. *Plant Disease* 93: 1076.

Munyaneza JE, Sengoda VG, Crosslin JM, Garzon-Tiznado J, Cardenas-Valenzuela O. 2009d. First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in pepper in Mexico. *Plant Disease* 93: 1076.

Munyaneza JE, Fisher TW, Sengoda VG, Garczynski SF, Nissinen A, Lemmetty A. 2010. Association of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” with the psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *J. of Economic Entomol.* 103(4): 1060-1070.

Munyaneza JE. 2010. Psyllids as vectors of emerging bacterial diseases of annual crops. *Southwestern Entomologist* 35: 417–477.

Munyaneza JE. 2012. Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research* 89: 329–350.

Munyaneza JE, Henne DC. 2012. Leafhopper and psyllid pests of potato. En: *Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management* Giordanengo P, Vincent C, Alyokhin A (Eds.), pp. 65–102. Academic Press, San Diego, CA.

Nachappa P, Levy J, Tamborindéguy C. 2012. Transcriptome analyses of *Bactericera cockerelli* adults in response to “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection. *Mol Genet Genomics* 287:803-817. DOI: 10.1007/s00438-012-0713-9.

Nene V, Wortman J, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu Z, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, deBruyn B, DeCaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El-Dorry H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannik LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston S, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva EV, Kulp D, LaButti K, Lee E, Li Song, Lovin DD,

Mao Ch, Mauceli E, Menck CFM, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum Ch, O'Leary S, Orvis J, Perteau M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers YH, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JMC, VanZee JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM, Severson DW. 2007. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 316: 1718-1723.

O'Connell DM, Wratten SD, Pugh AR, Barnes AM. 2012. 'New species association' biological control? Two coccinellid species and an invasive psyllid pest in New Zealand. *Biol. Control*. 62: 86-92.

Ontiveros-Guerra G. 2012. Detección de "Candidatus *Liberibacter solanacearum* en papa y tomate en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí, México. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. pp 80.

Page-Weir NEM, Jamieson LE, Chagan A, Connolly PG, Curtis C. 2011. Efficacy of insecticides against the tomato/potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). *New Zealand Plant Protection Society (Inc.)* 64: 276-281.

Pavlista AD. 2002. Nebraska Potato Eyes. Vol. 14. Issue 2. University of Nebraska Panhandle Research and Extension Center.
<http://www.panhandle.unl.edu/pdf/peyessum02.pdf>

Pletsch DJ. 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. *Montana Agricultural Experiment Station Bulletin* 446:95.

Pedigo LP. 1994. Introduction to sampling arthropod populations. Pp 1-11. En Pedigo LP, Buntin GD (eds). *Handbook of sampling methods for arthropods in agriculture*. CRC Press, Boca Raton. FL.

Perazzolo LM, Coward K, Davail B, Normand E, Tyler CR, Pakdel F, Schneider WJ, Le Menn F. 1999. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol. Reprod.* 60: 1057-1068.

Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuc AR, Cruz J, Simoes ZLP, Belles X. 2003. The vitellogenin of the honey bee *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 495-465.

Price DRG, Bell HA, Hinchliffe G, Fitches E, Weaver R, Gatehouse JA. 2009. A venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (*Lacanobia oleracae*). *Insect Molecular Biology* 18: 195-202.

Pugh AR. 2013. The potential of *Cleobora mellyi* (southern ladybird) as a biological control agent of the invasive tomato-potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) on potatoes. M.S. Dissertation. Lincoln University, N. Z. pp. 70

Puketapu A, Roskrige, N. 2011. The tomato-potato psyllid lifecycle on three traditional Maori food sources. *Agronomy New Zealand* 41: 167–173.

Raikhel AS, Dhadialla TS. 1992. Accumulation of yolk proteins in insects oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 217-251.

Raikhel AS, Brown MR, Belles X. 2005. Hormonal control of reproductive process. In: *Comprehensive Insect Science*. Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS. Elsevier Pergamon. USA. 433-491.

Rehman M, Melgar J, Rivera C, Urbina N, Idris AM & Brown JK. 2010. First report of “*Candidatus Liberibacter psyllaourous*” or “*Ca. Liberibacter solanacearum*” associated with severe foliar chlorosis, curling, and necrosis and tuber discoloration of potato plants in Honduras. *Plant Disease* 94: 376.

Rodríguez-Sánchez I. 2012. Perfiles transcriptómicos de tejidos de papiones con y sin obesidad. Tesis de Licenciatura. FCB. UANL.

Romney VE. 1939. Breeding areas of the tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *J. Econ. Entomol.* 32:150-151.

Rowe JA, Knowlton GF. 1935. Studies upon the morphology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Utah Acad. Sci. Proc.* 12:233-239.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132: 365-386.

Rubio-Covarrubias OA, Almeyda-León IH, Ireta-Moreno J, Sánchez-Salas JA, Fernández-Sosa R, Borbón-Soto JT, Díaz-Hernández C, Garzón-Tiznado JA, Rocha-Rodríguez R, Cadena-Hinojosa MA. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc en las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura Técnica en México.* 32:201-211.

Rubio-Covarrubias OA, Almeyda-León IH, Cadena-Hinojosa MA, Lobato-Sánchez R. 2011. Relation between *Bactericera cockerelli* and presence of *Candidatus Liberibacter psyllaourous* in commercial fields of potato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(1): 17-28.

Saavedra-Rodríguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, Mccall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel

gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology.

Salgado VL. 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. DowElanco, Down to Earth. 52:35:47.

Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 7.7, 8.21, 11.38.

Sánchez-Peña SR, Casas-De-Hoyo E, Hernandez-Zul R, Wall KM. 2007. A comparison of the activity of soil fungal isolates against three insects pest. J. Agric. Urban Entomol. 24: 43-47.

Sappington TW, Kokoza VA, Cho WL, Raikhel AS. 1996. Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. Proc Natl Acad Sci USA 93: 8934–8939.

Sappington TW, Raikhel AS. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptor. Insect Biochem Mol Biol. 8:277-300.

Schneider WJ. 1996. Vitellogenin receptors: oocytespecific members of the low density lipoprotein receptor supergene family. Int Rev Cytol 166: 103–137.

Schneider WJ, Nimpf J. 2003. LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. Cellular and Molecular life sciences. 60; 892-903.

Schonbaum CP, Lee S, Mahowald AP. 1995. The *Drosophila* *yolkless* gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. Proc Nat Acad Sci USA 92: 1485–1489.

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C_t difference” formula. J Mol Med 84: 901-910.

Schemeer HD, Bluett R, Heatherington P. 1990. Field evaluation of imidacloprid as an insecticidal seed treatment in sugar beet and cereals with particular reference to virus vectors. Proc. Brighton Crop. Prot. Conf. 2:29-36.

Secor GA, Rivera-Varas V. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. Revista Latinoamericana de la Papa (Suplemento) 1: 1–8.

Secor GA, Rivera VV, Abad JA, Lee IM, Clover GRG, Liefing LW, Li X, De Boer SH. 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: 574–583.

Sehadova H, Siffelova G, Dolezel D. 2005. Characterization of period gene expression in the central nervous system of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Unpublished.

Sengoda VG, Munyaneza JE, Crosslin JM, Buchman JL, Pappu HR. 2010. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip disease of potato. *Am. J. Potato Res* 87:41-49.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2013. Ficha técnica No.29: Zebra chip *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Primera Edición. pp 17. ISBN: 978-607-715-151-7.

Snigirevskaya ES, Raikhel AS. 2005. Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins in insect oocytes. In *Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. XII Part B (Raikhel AS, Sappington TW eds), pp 199-228. Science Publishers, Inc. Enfield, USA-Plymouth UK.

Sorek R, Cossart P. 2010. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* 11: 9-16.

Shu YH, Wang JW, Lu K, Zhou JL, Zhang R. 2010. The first vitellogenin receptor from a lepidopteran insect: molecular characterization, expression patterns and RNA interference analysis. *Insect Molecular Biology*. doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01054.x

Staley M, Dorman KS, Bartholomay C, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Loroño-Piño MA, García-Rejón JE, Ibarra-Juárez L, Blitvich BJ. 2010. Universal primers for the amplification and sequence analysis of actin-1 from diverse mosquito species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 26(2): 214-218.

Strand LL. 2006. Integrated pest management for potatoes in the Western United States. University of California, Oakland CA.

Sulc K. 1909. *Trioxa cockerelli* n.sp., a novelty from North America, being also of economic importance. *Acta Societatis Entomologicae Bohemiae* 6: 102-108.

Sumpter JP. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82/83: 737-742.

Tamayo-Mejía F. 2014. Parasitismo de *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Triozidae) y su interacción con aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill (Ascomycota: Hypocreales). Tesis de Doctorado. FCB. UANL. pp. 61.

Teulon DAJ, Workman PJ, Thomas KL, Nielsen MC. 2009. *Bactericera cockerelli*: incursion, dispersal and current distribution on vegetable crops in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 62: 136-144.

Thomas KL, Jones DC, Kumarasinghe LB, Richmond JE, Gill GSC, Bullians MS. 2011. Investigation into the entry pathway for the tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli*. New Zealand Plant Protection 64, 259–268.

Trenczek TA, Engels W. 1986. Occurring of vitellogenin in drone honeybees. International Journal of Invertebrate of Reproduction and Development. 10: 307-311.

Trumble J. 2008. The tomato psyllid: a new problem on fresh market tomatoes in California and Baja Mexico. University of California Cooperative Extension. http://ceventura.ucdavis.edu/Vegetable_Crops/Tomato_Psyllid.htm

Trumble J. 2009. Potato Psyllid. Center for Invasive Species Research, University of California, Riverside. Available at: http://cistr.ucr.edu/potato_psyllid.html

Tucuch-Haas J, Rodriguez-Maciel JC, Lagunes-Tejeda A, Silva-Aguayo G, Aguilar-Medel S, Robles-Bermudez A, Gonzalez-Camacho JM. 2010. Toxicidad de Spiromesifen en los Estados Biológicos de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). Neotropical Entomology 39(3):436-440.

Tufail M, Raikhel AS, Takeda M. 2005. Biosynthesis and processing of insects vitellogenin. In: Raikhel AS, Sappington TW. (Eds). Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology in Invertebrates vol XII. Part B. Science Publishers Inc. Enfield USA Plymouth UK. p 1-32.

Tufail M, Takeda M. 2005. Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. Insect Mol Biol 14: 389–401.

Tufail M, Takeda M. 2007. Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. Insect Biochem Mol Biol 37: 235–245.

Tufail M, Takeda M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenesis. Journal of insect Physiology 54: 1447-1458.

Tuthill LD. 1945. Contributions to the knowledge of the psyllidae of Mexico. Kansas Entomological Society. 18(1) 1-29.

Valle D. 1993. Vitellogenesis in insects and other groups-a review. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz 88: 1-26.

Walker G, MacDonald F, Larsen N, Wallace AR. 2011. Monitoring *Bactericera cockerelli* and associated insect populations in potatoes in South Auckland. N. Z. Plant Prot. 64: 269-275.

Wallis, R. L. 1955. Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. Tech. Bull. U. S. Dep. Agric. Technical Bulletin 1107:1-24.

Weber DC. 2013. Biological control of potato insects pest. En: Giordanengo P, Vincent Ch, Alyokhin A (eds). Insects pest of potato. Global perspectives on Biology and Management. Academic Press. Oxford UK. pp: 399-437.

Weinzierl R, Henn T. 1989. Alternatives in insect management: microbial insecticides, Rep. No. 1295. University of Illinois, Urbana-Champaign.

Winnebeck EC, Millar CD, Warman GR. 2010. Why does insect RNA look degraded?. Journal of Insect Science. 10(159): 1-7.

Workman PJ, Whiteman SA. 2009. Importing *Tamarixia triozae* into containment in New Zealand. N.Z. Plant Prot. 62: 412.

Wyatt GR, Davey KG. 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone II. Roles of juvenile hormones in adult insects. Advances in Insect Physiology 26: 1-155.

Xu Y, Zhu B, Liu Q, Wei G, Chen L, Yu L, Liu Ch. 2012. Prokaryotic expression of vitellogenin receptor gene of *Actias selene* Hubner. African Journal of Agricultural Research. 7(21): 3166-3174.

Yang X, Liu TX. 2009. Life history and life tables of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) on eggplant and bell pepper. Environ. Entomol. 38:1661-1667.

Yang XB, Zhang YM, Hua L, Liu TX. 2010a. 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. J. Econ. Entomol. 103:1729-1734.

Yang XB, Zhang YM, Hua L, Peng LN, Munyaneza JE, Trumble JT, Liu TX. 2010b. Repellency of selected biorational insecticides to potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera:Psyllidae). Elsevier Crop Protection. 29: 1320-1324.

Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. Tropical Medicine and International Health. 16(4): 501-509.

Zavala Quintana TE, Cadena Hinojosa MA. 1998. Punta Morada de la papa. Resúmenes, Tecnología de cultivo de papa, CONPAPA, INIFAP, Toluca Edo. de México. P. 17-19.

Zavala Quintana TE. 2002. Experiencias en el Valle de Toluca sobre Punta Morada. Memorias del XI congreso Nacional de Productores de papa. León, Guanajuato, México. P. 81-97. Septiembre 26-28, 2002.

Zink RT. 1998. Colorado Agricultural Statistics Service, 1998 Colorado Pesticide Guide, Vegetable Crops, Fort Collins, CO, USA.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Olga Karina Villanueva Segura

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica

Tesis: CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LA VITELOGENINA EN *Bactericera Cockerelli* [Sulc, 1909] (HEMIPTERA:TRIOZIDAE)

Campo de Estudio: Entomología.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 30 de julio de 1982, hija de Olga Segura Amaya y Oscar Villanueva Martínez.

Estudios: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Biólogo el 02 de Agosto del 2004. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología el 20 de Julio del 2007.

Experiencia Profesional: Personal no docente tiempo completo, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, hasta el año 2010.

Profesionista Independiente, en la empresa Vitagénesis S.A. de C.V., hasta enero 2011
Asistente en Proyectos de Investigación, en el Control de Poblaciones de *Diaphorina citri*, en Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, hasta julio 2011.

Maestro de la asignatura Bioseguridad, en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León durante 2011-2013.

Premio de Investigación 2012; Premio otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Beca de tres semanas, en Febrero 2013, para la realización de entrenamiento en Colorado State University otorgada por el National Institutes of Health,

Beca de 4 meses, Marzo-Julio 2014 para la realización de entrenamiento en Colorado State University, otorgada por el National Institutes of Health.

Publicaciones:

Papadopoulos DK, Résendez-Pérez D, Cárdenas-Chávez DL, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Felix DA, Fünfschiling R, Gehring WJ. 2011. Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and linker size in

transcriptional activation and repression. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 108(29): 11959-11964. doi:10.1073/pnas.1108686108.

Villanueva-Segura OK, Barragán-Camacho EK, Gutiérrez-Rodríguez SM, Ponce-García G, Flores-Suárez AE. 2013. Efecto del ciclo circadiano sobre la resistencia a permetrina en *Aedes aegypti* (L). Entomología Mexicana 2: 1325-1330.

López B, Ponce G, González JA, Gutiérrez SM, Villanueva OK, González G, Bobadilla C, Rodríguez IP, Black WC IV, Flores AE. 2014. Susceptibility to chlorpyrifos in pyrethroid-resistant populations of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Mexico. Journal of Medical Entomology 3:644-649.

Gutiérrez-Rodríguez SM, Flores-Suárez AE, Villanueva-Segura OK. 2014. Pediculosis. Artrópodos y Salud. 1:14-21. <http://artropodosysalud.com/Publicaciones/No1-Mayo2014/No.4.html>.

Rodríguez-Sánchez IP, López-Monroy B, Villanueva-Segura OK, López-Uriarte A, Varela-Echavarría A, Garza-Rodríguez ML, Martínez-de-Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Garza-Guajardo R, Barboza-Quintana O, Flores-Suarez AE, Barrera-Saldaña HA, Ponce-García G. 2014. A molecular tool for identification of dipteran species of forensic importance. Southwestern Entomologist 39: 663-674.

Bernal-Silva S, Villanueva-Segura OK, Lugo-Trampe A, Trujillo-Murillo KC, Ponce-García G, Favela-Lara S, Delgado-Enciso I, Martínez-de-Villarreal LE, Garza-Guajardo R, Barboza-Quintana O, González-Alvarez R, Flores-Suárez AE, Rodríguez-Sánchez IP. 2015. PCR-RFLP for identification of bluetongue virus serotypes. Southwestern Entomologist 40(1): 25-36.

Rodríguez-Sánchez IP, Villanueva Segura OK, González-Alvarez R, Flores-Suárez AE, Garza-Rodríguez ML, Delgado-Enciso I, Martínez-de-Villarreal LE, Canales-del-Castillo R, Favela-Lara S, Garza-Guajardo R, Lugo-Trampe A, Trujillo-Murillo KC, Barboza-Quintana O, González-Rojas JI, Barrera-Saldaña HA, Ponce-García G. 2015. Molecular cloning and characterization of the circadian clock timeless gene in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae). Southwestern Entomologists 40(1):53-70.

González-Alvarez R, Villanueva-Segura OK, Ponce-García G, Martínez-Fierro ML, Delgado-Enciso I, Flores-Suárez AE, Garza-Guajardo R, Zamudio-Osuna MJ, Barrera-Saldaña HA, Barboza-Quintana O, Martínez-de-Villarreal LE, Guzmán-Velasco A, Rodríguez-Sánchez IP. 2015. Molecular Cloning, sequence analysis and Gene Expression of the circadian clock gene *period* in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Southwestern Entomologists 40(1) 71-80.

Villanueva-Segura OK, Ponce García G, Rodríguez-Sánchez IP, Favela-Lara S, López-Monroy B, Lomelí-Flores JR, Flores-Suárez AE. 2015. Molecular characterization of the vitellogenin receptor in *Bactericera cockerelli* [Sulc, 1909](Hemiptera:Triozidae). Insect Science. Aceptado

