



Bactericera trigonica Hodkinson.

Caracterización molecular de tres especies del “complejo *Bactericera nigricornis* Förster” utilizando código de barras de ADN

La correcta identificación de un insecto plaga es un paso fundamental para su seguimiento y para la aplicación de medidas de control adecuadas. El complejo denominado “*Trioza (Bactericera) nigricornis* Förster” alberga tres especies morfológicamente similares, *Bactericera trigonica* Hodkinson, *Bactericera nigricornis* (Förster) y *Bactericera tremblayi* (Wagner), potenciales vectores de la bacteria “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, que puede causar enfermedades en zanahoria, apio y patata. Estas tres especies de psílidos se pueden confundir cuando se encuentran conjuntamente en los cultivos, de ahí la necesidad de disponer de una técnica que permita la discriminación precisa de las mismas. En este estudio se pretende explicar la problemática de las tres especies del complejo presentes en España y proporcionar una herramienta basada en el código de barras de ADN (DNA Barcoding) para su identificación.

**S. Bastin¹,
Y. Santiago-Calvo²,
H. López³,
M.C. Asensio Sánchez-
Manzanera², E.
Hernández-Suárez¹ y F.
Siverio de la Rosa^{1,4}**

- 1 Unidad de Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), Tenerife, España.
- 2 Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid.
- 3 Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), Tenerife, España.
- 4 Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca del Gobierno de Canarias, Tenerife, España.



Figura 1. Síntomas de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' en patata (<https://gd.eppo.int>). Corte transversal de tubérculo próximo al estolón (izquierda) y daños en patatas fritas (derecha).

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) es una bacteria fitopatógena Gram-negativa, no cultivable *in vitro*, que vive exclusivamente en el floema de sus plantas hospedadoras y en diversas estructuras de los insectos que le sirven de vectores (Munyanza, 2012). Estos vectores pertenecen a la superfamilia Psylloidea, que son insectos con aparato bucal tipo picador-chupador, cuyos adultos transmiten la bacteria tanto horizontalmente, de planta a planta por alimentación, como verticalmente, mediante transmisión transovárica dentro de la población del psílido (Munyanza y col., 2007). La especie de psílido implicada en la transmisión de Lso varía en función de las áreas geográficas y las plantas hospedadoras. En América y Nueva Zelanda, la bacteria es transmitida por el psílido de la patata y el tomate, *Bactericera cockerelli* Sulc, a un gran número de solanáceas como tomate, pimiento, berenjena y, especialmente, patata, en la que provoca una de las enfermedades más graves de dicho cultivo, el *Zebra chip* (Butler y Trumble, 2012). Su nombre deriva de la aparición de manchas en el interior de los tubérculos infectados que se parecen a las rayas de una cebra. Estas rayas se acentúan cuando se procesan dichos tubérculos como patatas fritas (tipo chip en inglés), lo que los hace comercialmente inaceptables (Figura 1). Debido a esto, la enfermedad ha causado millones de dólares de pérdidas a la industria de la patata y ha conducido en algunos sitios al abandono total del cultivo (Munyanza, 2012). En Europa y en el Norte de África, la situación es



Figura 2. Síntomas de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' en zanahoria.

bastante diferente, ya que Lso afecta a las apiáceas y, principalmente, al cultivo de zanahoria. En estas regiones Lso es transmitida por dos psíidos, *Bactericera trigonica* Hodkinson y *Trioza apicalis* Förster (Munyanza y col., 2010a; Nelson y col., 2012). *Trioza apicalis* se encuentra en el norte y el centro de Europa, mientras que *Bactericera trigonica* se distribuye por la región mediterránea. Los síntomas de esta enfermedad en zanahoria son amarillos y enrojecimientos de las hojas, puntas rojas, presencia anómala de brotes, emisión abundante de raíces secundarias, enanismo y envejecimiento prematuro (Figura 2) (Munyanza y col., 2010b)

Hasta ahora, se pensaba que Lso afectaba solamente a los cultivos de

apiáceas en Europa; sin embargo, se han detectado tubérculos y plantas de patata naturalmente infectadas por la bacteria en España y Finlandia, respectivamente (MAPAMA, 2017; Haapalainen y col., 2018). Debido a la ausencia en Europa del único vector conocido de Lso en patata, *Bactericera cockerelli*, no se sabía cómo se habían infectado estas plantas y qué especie de psílido estaba implicada. Varios estudios han demostrado que el riesgo de la transmisión de Lso de la zanahoria a la patata por los dos vectores de Lso presentes en Europa era muy limitado, ya que no son capaces de alimentarse del floema de las plantas de la patata (Teresani y col., 2017; Antolínez y col., 2017; Haapalainen y col., 2018). Esto es un requisito esencial para la

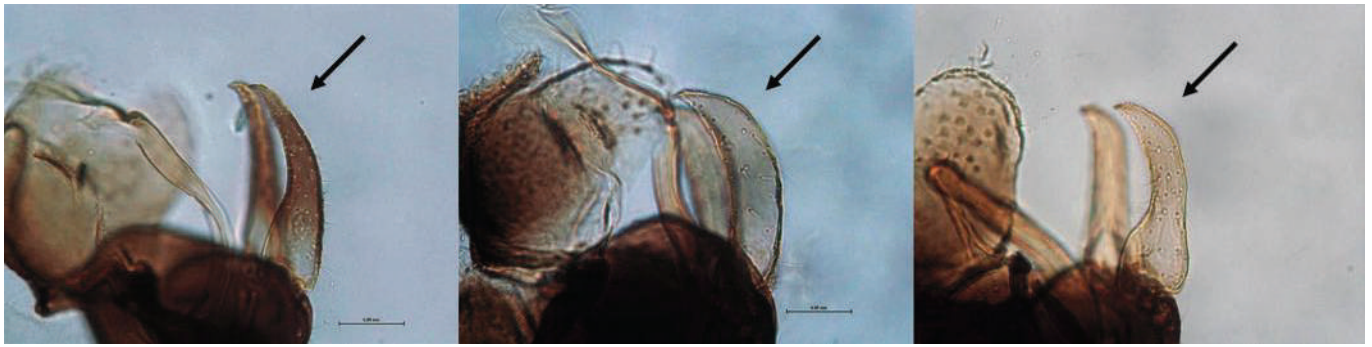


Figura 3. Forma del parámetro de *B. trigonica* (izquierda), *B. tremblayi* (centro) y *B. nigricornis* (derecha).



Figura 4. Forma del edeago de *B. trigonica* (izquierda), *B. tremblayi* (centro) y *B. nigricornis* (derecha).

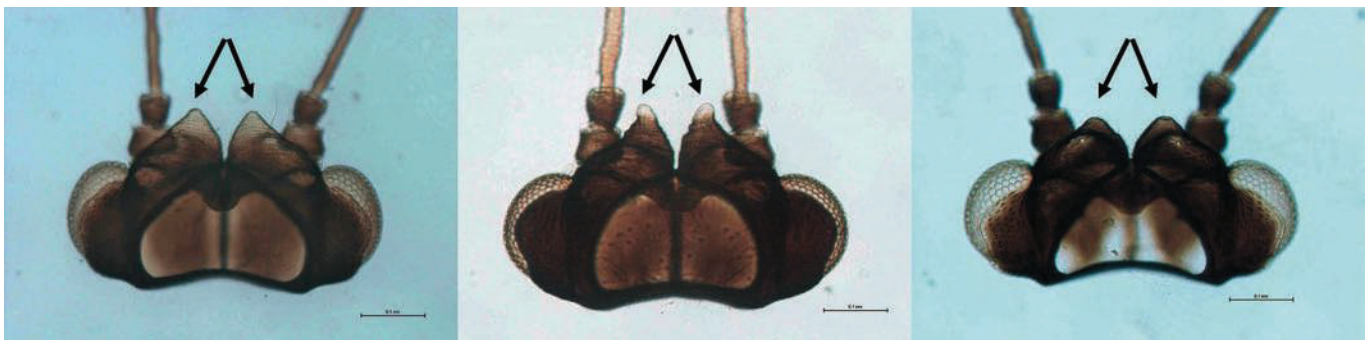


Figura 5. Forma de los conos genales de *B. trigonica* (izquierda), *B. tremblayi* (centro) y *B. nigricornis* (derecha).

transmisión de la bacteria, ya que esta se localiza y se replica en la planta únicamente en ese tejido conductor. Sin embargo, otras especies de psílidos presentes en ambos cultivos podrían ser capaces de alcanzar el floema y actuar como vector en patata, siendo este el caso de *Bactericera nigricornis* (Förster). Éste ha sido mencionado, en un estudio realizado por Antolínez y col. (2019), como la especie de psílido predominante en los campos de patata de España. Además, se ha detectado Lso en individuos de *Bactericera nigricornis* (Teresani y col., 2015; Asensio Sánchez-Manzanera y col., 2018; Antolínez y col., 2019). También otra especie del género *Bactericera* ha sido detectada en

campos de hortalizas de España, la psila del puerro y de la cebolla (*Bactericera tremblayi* (Wagner)), que ha sido asociada a diversos desarreglos vegetativos en estos cultivos (Ouvrard y Burckhardt, 2012). Antolínez y col. (2017) han citado que, aunque *Bactericera tremblayi* no puede reproducirse en zanahoria, es capaz de alimentarse del floema de la misma y podría usarla como planta de alimento temporal en ausencia de puerro y cebolla. Sin embargo en sus ensayos no pudo transmitir Lso de zanahoria a zanahoria y no es un vector probable de Lso de apiáceas a patata. Para entender las implicaciones en la transmisión de la bacteria por estos vectores potenciales de Lso y deter-

minar si pueden representar un riesgo para la producción europea de patata, falta realizar ensayos de campo. Estos se ven dificultados, ya que estas tres especies del género *Bactericera* son morfológicamente similares y se pueden encontrar conjuntamente en los cultivos. *B. trigonica*, *B. tremblayi* y *B. nigricornis* pertenecen al grupo llamado "*Trioza (Bactericera) nigricornis* Förster" (Hodkinson, 1981). Solo algunas estructuras morfológicas basadas principalmente en la genitalia del macho como la forma del parámetro masculino (Figura 3), la longitud de la porción apical del edeago y la forma de su ápice (Figura 4), permiten diferenciar los adultos de las tres especies. Los conos genales (Figura 5)

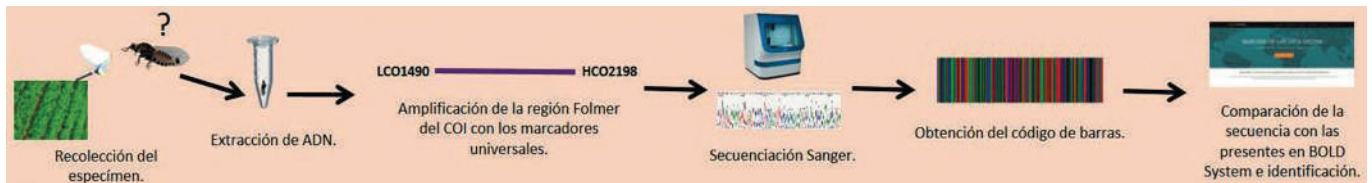


Figura 6. Metodología de la técnica del Código de Barras de ADN (*DNA Barcoding*).

también tienen un carácter discriminatorio, aunque en menor medida, debido a la variación intraespecífica. La identificación de las especies del complejo en sus fases ninfales por sus características morfológicas se basa en el quinto y último estadio, pero es extremadamente difícil, y requiere del montaje de las mismas para su observación en el microscopio (Ouvrard y Burckhardt, 2012). En definitiva, la discriminación de estas tres especies basada en los caracteres morfológicos está sujeta a errores, requiere de la presencia de machos y una formación especializada previa para el reconocimiento y el montaje correcto de los ejemplares en los que distinguir las estructuras de interés taxonómico. Una alternativa al desafío de las identificaciones sustentadas en aspectos morfológicos es la basada en el código de barras de ADN (*DNA Barcoding*). Esta técnica ha sido ampliamente usada estos últimos años para la identificación de especies animales y vegetales, ya sea para complementar los métodos clásicos basados en características morfológicas o para reemplazarlos (Ball y Armstrong, 2006). La idea de crear un método de identificación basado en el ADN nació de la necesidad de resolver lo que la Organización de las Naciones Unidas (ONU) llamó *Taxonomic impediment* (impedimento taxonómico): la escasa disponibilidad de información taxonómica, los vacíos en la taxonomía y la falta de taxónomos especializados para identificar y clasificar los diversos taxones presentes en nuestro planeta. Fueron Hebert y col. los que propusieron en 2003 el método del *DNA Barcoding*, que consiste en identificar especímenes a nivel de especie mediante el uso de secuencias cortas de ADN estandarizadas; es decir, atribuir el nombre de una especie a una secuencia de ADN corta o código de barras de ADN (*DNA Barcode*). El marcador *DNA Barcode*

seleccionado para el reino animal fue un fragmento corto de más o menos 650 pb del gen de la subunidad del citocromo oxidasa I (COI), una proteína que interviene en la cadena respiratoria de las mitocondrias, llamado región Folmer porque: 1) está flanqueada por los cebadores universales descritos por Folmer y col. en 1994 y que se han usado con éxito para la identificación de la gran mayoría de las especies de los Metazoos, 2) su tasa de evolución es relativamente alta, 3) presenta una alta variación interespecífica y baja variación intraespecífica, y 4) es fácilmente amplificable (Herbert y col., 2003). Para almacenar los *DNA Barcode* de las especies estudiadas y ponerlos a disposición de los especialistas en todo el mundo se creó, a partir de una iniciativa internacional, la biblioteca de referencia, el *Barcode of Life Data System* (BOLD System). Esta base de datos tiene la particularidad, frente a otras como GenBank, de relacionar los *DNA Barcode* con *vouchers* (especímenes de referencia) identificados con métodos morfológicos y depositados en una institución científica (Wilson, 2012). La Figura 6 nos muestra la metodología de la técnica del *DNA Barcoding* para identificar una especie, consistente en extraer, amplificar y secuenciar la región *Barcode* del COI, a partir de una muestra de un organismo, y realizar una comparación con una secuencia presente en la base de datos BOLD System para establecer una identificación a nivel de especie.

El interés de esta técnica reside en su capacidad para identificar rápidamente y con bajo coste individuos a nivel de especie en cualquiera de sus etapas de desarrollo (ninfas, huevos, larvas, semillas, plántulas, etc.) y a partir de muestras dañadas o descompuestas, como por ejemplo, las presentes en contenidos intestinales, en muestras fecales o ejemplares

de trampas adhesivas (Iftikhar y col., 2016). Por estas razones, el *DNA barcoding* es cada vez más usado en entomología aplicada. Por ejemplo, para estudiar las relaciones tróficas depredador/presa (Agustí y col., 2003) u hospedador/parasitoide (Moreno-Ripoll y col., 2012), en la detección de especies invasoras y en la identificación de especies conocidas tales como los enemigos naturales, los parasitoides y las plagas agrícolas (Madden y col., 2019). En el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias estamos actualmente trabajando en la caracterización morfológica y molecular de especímenes de las tres especies del complejo *nigricornis* procedentes de varias zonas de España. El análisis de secuencias COI de especímenes de áreas geográficas distintas ha permitido: 1) incrementar la fiabilidad de la discriminación de las especies, 2) detectar posibles haplotipos, 3) validar el uso del marcador COI en la identificación de las mismas. Además, la obtención de los códigos de barras de ADN de estas especies facilitará también su diferenciación de otros psílidos vectores de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, como la psila de la patata, *Bactericera cockerelli*. Este insecto es considerado una especie de cuarentena, está incluido en el Reglamento Delegado (UE) 2019/1702 de la Comisión de 1 de agosto de 2019 por el que se establece una lista de plagas prioritarias, y es muy similar morfológicamente a las especies del complejo *nigricornis*. La técnica de *DNA barcoding* permitiría distinguir la especie invasora de manera rápida y concluyente en el caso de que fuera introducida accidentalmente en España.

Bibliografía



- Agustí, N., Unruh, T. R., Welter, S. C. 2003. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in Predator Guts Using COI Mitochondrial Markers. *Bulletin of Entomological Research* 93(3): 179–85.
- MAPAMA. 2017. Plan de Contingencia de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lso) y sus Vectores. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidadvegetal/candidatuslso_contingencia_abril2017sincolores_tcm30-379857.pdf
- Antolínez, C. A., Fereres, A., Moreno, A. 2017. Risk Assessment of '*Candidatus Liberibacter Solanacearum*' Transmission by the Psyllids *Bactericera trigonica* and *B. tremblayi* from Apiaceae Crops to Potato. *Scientific Reports* 7:1–10.
- Antolínez, C. A., Moreno, A., Ontiveros, I., Pla, S., Plaza, M. 2019. Seasonal Abundance of Psyllid Species Associated with Carrots and Potato Fields in Spain 8: 1–15.
- Asensio Sánchez-Manzanera, M. C., Santiago, Y., Vacas, R., Flores, D., Ruano-Rosa, D. 2018. Estudio de la sintomatología de Zebra Chip de la patata en tubérculo y en la parte aérea. Presentado en XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología.
- Ball, S. L., Armstrong, K. F. 2006. DNA Barcodes for Insect Pest Identification: A Test Case with Tussock Moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research* 36(2):337–50.
- Butler, C. D., Trumble, J. T. 2012. The Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae): Life History, Relationship to Plant Diseases, and Management Strategies. *Terrestrial Arthropod Reviews* 5(2): 87–111.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294–99.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Rastas, M., Wang, J., Hannukkala, A., Pirhonen, M., Nissinen, A. I. 2018. Carrot Pathogen '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Haplotype C Detected in Symptomless Potato Plants in Finland. *Potato Research* 61(1): 31–50.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard J. R. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. 270:313–21.
- Hodkinson, I. D. 1981. Status and Taxonomy of the *Trioza (Bactericera) nigricornis* Förster Complex (Hemiptera: Triozidae). *Bulletin of Entomological Research* 71(4): 671–79.
- Iftikhar, R., Ashfaq, M., Rasool, A., Hebert, P. D. N. 2016. DNA Barcode Analysis of Thrips (Thysanoptera) Diversity in Pakistan Reveals Cryptic Species Complexes. *PLoS ONE* 11(1): 1–21.
- Madden, M. J. L., Young, R. G., Brown, J. W., Miller, S. E., Frewin, A. J., Hanner, R. H. 2019. Using DNA Barcoding to Improve Invasive Pest Identification at U.S. Ports-of-Entry. *PLoS ONE* 14(9): 1–15.
- Moreno-Ripoll, R., Gabarra, R., Symondson, W. O. C., King, R. A., Agustí, N. 2012. Trophic Relationships between Predators, Whiteflies and Their Parasitoids in Tomato Greenhouses: A Molecular Approach. *Bulletin of Entomological Research* 102(4): 415–23.
- Munyanza, J. E., Crosslin, J. M., Upton, J. E. 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(3): 656–63.
- Munyanza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., Lemmetty, A. 2010a. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Associated with Psyllid-Affected Carrots in Europe. *Plant Disease* 94(5): 639–639.
- Munyanza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., Lemmetty, A. 2010b. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with the Psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entomology* 103(4): 1060–70.
- Munyanza, J. E. 2012. Zebra Chip Disease of Potato: Biology, Epidemiology, and Management. *American Journal of Potato Research* 89(5): 329–50.
- Nelson, W. R., Sengoda, V. G., Alfaro-Fernandez, A. O., Font, M. I., Crosslin, J. M., Munyanza, J. E. 2013. A New Haplotype of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Identified in the Mediterranean Region. *European Journal of Plant Pathology* 135(4): 633–39.
- Ouvrard, D., Burckhardt, D. 2012. First Record of the Onion Psyllid *Bactericera tremblayi* (Wagner, 1961) in France (Insecta: Hemiptera: Sternorrhyncha: Psylloidea), New Symptoms on Leek Crops and Reassessment of the *B. nigricornis*-Group Distribution. *EPPD Bulletin* 42(3): 585–90.
- Teresani, G., Hernández, E., Bertolini, E., Siverio, F., Marroquín, C., Molina, J., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. 2015. Search for Potential Vectors of '*Candidatus Liberibacter Solanacearum*': Population Dynamics in Host Crops. *Spanish Journal of Agricultural Research* 13(1): 1–11.
- Teresani, G. R., Hernández, E., Bertolini, E., Siverio, F., Moreno, A., Fereres, A., Cambra, M. (2017). Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' by *Bactericera trigonica* Hodkinson to vegetable hosts. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(4). <https://doi.org/10.5424/sjar/2017154-10762>
- Wilson, J. (2012). DNA Barcode for Insects. In Kahl, G. 2015. DNA Barcode.