



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Manejo de enfermedades-Control biológico				
Título del proyecto:	Variabilidad genética y patogénica de <i>Xylella fastidiosa</i> y alternativas de control en vid				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$ 75,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	X Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable	fdanielhc@hotmail.com
Vinculación:	Si	No	X	Fondos concurrentes:	No
Cooperante(s):	No				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Coahuila				
A realizar durante el(los) año(s):	Enero 2018-Diciembre 2018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Francisco Daniel Hernández Castillo	Parasitología	2022		
Colaborador:	Alberto Flores Olivas	Parasitología	2289		
Colaborador:	Sergio René Sánchez Peña	Parasitología	2886		
Colaborador:	Yisa María Ochoa Fuentes	Parasitología	3948		
Colaborador:	Raúl Rodríguez Herrera	UAdeC	Externo		
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Esmeralda González Gallegos	Doctorado	61131215		
Programa Docente:	Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Dr. Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Variabilidad genética y patogénica de <i>Xylella fastidiosa</i> y alternativas de control en vid	\$ 75,000
--	-----------

2.- Introducción

La Enfermedad de Pierce de la vid (*Vitis vinifera*) es ocasionada por *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, una bacteria fitopatógena limitada al xilema que sobrevive y se multiplica en los conductos vasculares de la planta, los obstruye e impide el transporte del agua en la misma ocasionando su muerte. *X. fastidiosa* coloniza un amplio rango de hospederos, más de 300 especies de plantas reportadas que pueden encontrarse presentando o no síntomas (Stancanelli, 2015). La bacteria se disemina a grandes distancias mediante material vegetal propagativo infectado, mientras que a corta distancia se disemina principalmente por insectos vectores de las familias Cicadellidae y Cercopidae (Janse y Obradovic, 2010). Actualmente, *X. fastidiosa* se encuentra distribuida en Canadá, Estados Unidos, México, Brasil, Argentina, Costa Rica, Honduras, Paraguay, Perú, Venezuela, India, Irán, Taiwán, Turquía, Austria, Bélgica, Francia, Italia, Holanda, Serbia, Suiza, Yugoslavia y Morocco (CABI, 2016; EPPO, 2016). En México, la enfermedad de Pierce está catalogada como una plaga cuarentenaria, ya que se encuentra presente en el país y puede potencialmente causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes por lo que se encuentra bajo control oficial. Está presente en los estados de Baja California Coahuila y en Querétaro (SENASICA, 2015). La enfermedad de Pierce representa una seria amenaza para las más de 29,000 has cultivadas con vid en México con valor aproximado de 4,500 millones de pesos (SIAP, 2014), ya que actúa de manera progresiva eliminando plantas y viñedos completos en un período de dos a cinco años. Una reciente epidemia causó pérdidas del 30% en viñedos de Temecula, Valley en California, Estados Unidos, con valor estimado de 46 millones dólares (Wallis y Chen, 2012) aunado al alto costo de la enfermedad en este estado que corresponde a 104.4 millones de dólares por año, 48.3 millones actividades de control y 56.1 millones costo de la pérdida de producción (Tumber *et al.*, 2014). Hasta la fecha, una medida preventiva efectiva o un control eficiente de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la variabilidad genética y patogénica de *Xylella fastidiosa* en plantas de vid y proponer alternativas de control

Objetivos específicos

1. Identificar molecular y serológicamente a *X. fastidiosa* en plantas de vid y hospederos alternos
2. Aislar y caracterizar bioquímicamente diferentes cepas de *X. fastidiosa*
3. Obtener extractos vegetales y evaluar *in vitro* su actividad bactericida o bacteriostática contra *X. fastidiosa*
4. Estudiar la actividad antagonista de microorganismos benéficos y el efecto de sus metabolitos contra *X. fastidiosa in vitro*
5. Estudiar el efecto de inducción de resistencia de ácido jasmónico y ácido salicílico contra *X. fastidiosa* en plantas de vid
6. Determinar la variabilidad patogénica de *X. fastidiosa* en vid y en otros hospederos
7. Determinar la variabilidad genética de *X. fastidiosa* de vid y de otros hospederos

Hipótesis

Existirá variabilidad genética y patogénica entre cepas de *X. fastidiosa* y al menos una de las alternativas de control propuestas mostrará efectividad contra la bacteria o su vector.

3.-Revisión de Literatura

Xylella fastidiosa es una bacteria fitopatógena Gram negativa restringida a los vasos del xilema de sus hospederos, fue descrita por Wells *et al.* (1987) y el género incluye una sola especie, sin embargo, es probable encontrar varios fenotipos ya que existen claras diferencias en el rango de plantas hospederas y la patogenicidad entre cepas.

Coloniza un amplio rango de hospederos con más de 300 especies de plantas reportadas que pueden encontrarse presentando o no síntomas (Stancanelli *et al.*, 2015) y en las que se han diferenciado cuatro subespecies de *X. fastidiosa*: 1) subsp. *fastidiosa* incluye cepas aisladas de cultivo de uva (*Vitis vinifera*), alfalfa (*Medicago sativa*), maple

(*Acer* sp.) y almendro (*Prunus dulcis*) entre otros; también se encuentra en algunas malezas, pero no infecta el laurel de flor; 2) subsp. *multiplex* infecta durazno (*Prunus persica*), olmo (*Ulmus* sp.), roble (*Quercus* spp.), ciruelo (*Prunus domestica*), almendro (*Prunus dulcis*), olivo (*Olea europaea*), sicomoro (*Platanus occidentalis*) y otros árboles de sombra; 3) subsp. *pauca* que ha sido aislada de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y plantas de café (*Coffea arabica*) y 4) subsp. *sandyi* que se ha encontrado en adelfas o laurel de flor (*Nerium oleander*) (EPPO, 2006; Hernandez-Martinez et al., 2006; Krugner et al., 2014).

Las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* suelen ser de gran importancia a nivel mundial debido al enorme potencial patógeno de la bacteria sobre un gran número de plantas. La Clorosis Variegada de los Cítricos, el Decaimiento súbito del Olivo, la Crespada del Café, la Escaldadura foliar del Ciruelo, Quemadura foliar del Almendro, Enfermedad falsa del Melocotón, Enanismo en Alfalfa, Quemadura de la hoja en Olmo, Roble, mora y arándano o la Enfermedad de Pierce en uva son algunas de las enfermedades que se mencionan con mayor frecuencia.

La Enfermedad de Pierce (PD por sus siglas en inglés) apareció en 1880 en el sur de California donde destruyó 14,000 ha de uvas ocasionando el cierre de 50 vinerías. En 1892 el Fitopatólogo N. B. Pierce describió la enfermedad y estudió ampliamente la sintomatología y su distribución, por lo que más tarde fue nombrada Enfermedad de Pierce de la uva (Raju y Wells, 1986).

X. fastidiosa tiene distribución mundial, se encuentra presente en Canadá, Estados Unidos, México, Brasil, Argentina, Costa Rica, Honduras, Paraguay, Perú, Venezuela, India, Irán, Taiwán, Turquía, Austria, Bélgica, Francia, Italia, Holanda, Serbia, Suiza, Yugoslavia y Morocco (CABI, 2016; EPPO, 2016). Se disemina principalmente por medio de insectos vectores de la familia Cicadellidae y Cercopidae (Janse y Obradovic, 2010).

En México, se destinan alrededor de 29,000 ha al cultivo de uva con una producción de 335, 739 toneladas con un valor aproximado de 4,531 millones de pesos, los principales estados productores son Sonora, Zacatecas y Baja California. Coahuila, con tres regiones productoras ubicadas en los municipios de Parras de la Fuente, San Pedro y Cuatro Ciénegas, ocupa el sexto lugar a nivel nacional con un valor de producción cercano a los 27 millones de pesos, las regiones productoras de vid se encuentran en los municipios de Parras de la Fuente, San Pedro y Cuatro Ciénegas (SIAP, 2014).

En nuestro país, la PD está catalogada como una plaga cuarentenaria, ya que se encuentra presente en el país y puede potencialmente causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes por lo que se encuentra bajo control oficial. Se encuentra presente en los estados de Baja California (Valle de Guadalupe, Coahuila (Parras de la Fuente) y en el municipio de Ezequiel Montes en Querétaro. En la Costa de Ensenada, Baja California, principal zona productora de vinos en México, se han encontrado los siguientes vectores: chicharrita cabeza roja (*Cameocephala fulgida*), chicharrita verde (*Draeculacephala minerva*), chicharrita verde-azulada (*Graphocephala atropunctata*), chicharrita árbol de humo (*Homalodisca liturata=lacerta*) y la chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis=coagulata*); mismos que representan una amenaza constante para la dispersión y establecimiento de la bacteria en las zonas productoras de los cultivos hospedantes sin presencia de la enfermedad (SENASICA, 2015).

En la zona vitivinícola de Parras de la Fuente, el principal vector de *X. fastidiosa* es la chicharrita de alas cristalinas al cual se le atribuyen altos niveles epidemiológicos de la enfermedad causando daños catastróficos que alcanzan el 50% de destrucción de los viñedos (CESAVEBC, sf). Según información del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Coahuila, durante el 2014 se atendieron 400 ha de vid, beneficiando a 4 productores, con un valor de la producción de \$19,760,000 con costos fitosanitarios de \$ 1,105,800; la superficie afectada por la presencia de la chicharrita de alas cristalinas *Homalodisca coagulata*, principal transmisor del causante de la PD, *Xylella fastidiosa* fueron 380 ha de vid en dicho municipio.

No existe un control eficiente de la enfermedad, el manejo implementado es principalmente sobre los vectores. Se recomienda la eliminación de raíz de las plantas enfermas cuando se comprueba mediante análisis de laboratorio la infección por *X. fastidiosa*, el uso de variedades resistentes, el uso de trampas y la aplicación de insecticidas para mantener poblaciones bajas de insectos; y el empleo de antibióticos inyectados de manera directa al tronco o raíz de vides enfermas (sólo provee un control temporal) (SENASICA, 2015).

Se requiere mayor conocimiento en los aspectos biológicos, genéticos y patogénicos de *X. fastidiosa*, sobre la especificidad de sus hospederos así como hospederos alternos y los insectos vectores que participan en la dispersión de la enfermedad en las regiones productoras de vid en México.

4.- Procedimiento Experimental

El experimento se llevará a cabo en el Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN, los muestreos y colecta de insectos se realizarán en diferentes viñedos ubicados en los municipios de Luis Moya, Cosío y Parras de la Fuente en los estados de Zacatecas, Aguascalientes y Coahuila, respectivamente.

Muestreo

a) Plantas de vid: Se realizarán muestreos dirigidos en viñedos ubicados en los diferentes estados.

Para la toma de muestras se seguirán los lineamientos propuestos por la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV, 2014) que dictan lo siguiente:

El muestreo se realizará en plantas que muestran o empiezan a mostrar algunos síntomas como escaldado en el margen de la hoja, peciolo desnudo, maduración desuniforme de caña y/o pasificación de frutos. Las muestras deberán tomarse entre los meses de junio a noviembre de hojas sintomáticas unidas a la caña y que contengan parte de tejido verde ya que los diagnósticos realizados antes de este periodo pueden producir falsos resultados debido a que la bacteria no se encuentra distribuida uniformemente en toda la planta.

Por cada predio se muestrearán 5 puntos, cada uno compuesto por 5 muestras. Por cada planta se elegirán 8 hojas sintomáticas (en caso de presentarse) mismas que deben estar distribuidas a lo largo de una o varias cañas, se depositarán en bolsas de polietileno, se identificarán a la vista con el número de planta y punto cardinal; se conservarán y transportarán en hieleras al laboratorio de Fitopatología de la UAAAN. Se elaborarán mapas y croquis de las rutas de muestreo georeferenciados.

b) Hospederos alternos: Se realizará un recorrido exploratorio en los alrededores de las zonas de muestreo de vid para identificar otros posibles hospederos como nogal, durazno, ciruelo, alfalfa, olmo, roble, cítricos, laurel de flor y/o malezas presentes. Se colectarán hojas y serán transportados como se mencionó antes.

1. Identificación de *X. fastidiosa* en plantas de vid y hospederos alternos

Las muestras colectadas de vid y otros posibles hospederos serán procesadas para la identificación de la bacteria mediante PCR y ELISA.

Se realizará la extracción de ADN mediante la técnica de Murray y Thomson (1980), se visualizará la calidad de ADN a través de un análisis electroforético, posteriormente se llevará a cabo la PCR utilizando primers específicos para *X. fastidiosa* y se determinará el peso del fragmento esperado mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para la detección serológica, los peciolo serán macerados en 1 mL de solución de extracción (0.13% de sulfito de sodio, 2% polivinilpirrolidona, 0.02% de azida de sodio, 0.2% de albúmina de huevo grado II y 2% de Tween 20), los extractos serán utilizados para realizar la prueba de ELISA mediante un kit comerciales (Aguilar et al., 2008).

2. Aislamiento y caracterización bioquímica de *X. fastidiosa*

Las muestras que resulten positivas a *X. fastidiosa* por las técnicas de PCR o ELISA serán tratadas para el aislamiento de la bacteria. El material vegetal será sometido a un proceso de desinfección para realizar diferentes métodos de extracción y siembra que se mencionan, ya que por su carácter de bacteria fastidiosa, *Xylella* es nutricionalmente exigente además de presentar crecimiento lento. Los peciolo serán cortados en trozos aproximadamente 1 cm por lado y se desinfectarán durante 5 minutos con etanol al 70% e hipoclorito de sodio 1% durante 5 minutos, se lavarán 3 veces con agua destilada estéril y se colocarán sobre papel secante estéril. Para el aislamiento de la bacteria se realizarán diferentes métodos de extracción y siembra que se describen a continuación:

a) Una vez desinfectados los peciolo, se colocarán algunos trozos en 5 mL de caldo PW y se agitará durante 15 minutos para liberar las células bacterianas. Alícuotas de 300 µL de la suspensión bacteriana se inocularán en medios de cultivos PCYE, BCYE o PW. Así mismo, se realizarán diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}) y se sembrarán 300 µL de cada en medio de cultivo PCYE, BCYE o PW. Las cajas se incubarán 28°C durante 15 días.

b) Trozos de los peciolo desinfectados se colocarán en bolsas de maceración conteniendo 1 mL de agua destilada estéril y se realizarán diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}), 300 µL de cada dilución se sembrarán en medio de cultivo PCYE, BCYE o PW. Las cajas se incubarán 28°C durante 15 días.

De los aislamientos de la bacteria obtenidos en medio de cultivo se determinará la morfología y características coloniales y se realizarán algunas pruebas bioquímicas básicas. Las colonias obtenidas serán confirmadas como *X. fastidiosa* mediante pruebas de PCR.

3. Obtención de extractos vegetales y evaluación *in vitro* contra *X. fastidiosa*

Se utilizarán extractos vegetales de diferentes plantas típicas del semi desierto de la región, se realizarán muestreos,

las plantas serán clodadas hasta obtener peso constante, se pulverizarán y se almacenarán hasta su uso. Se realizarán diferentes procesos de extracción con etanol y agua siguiendo la metodología propuesta por Ojeda et al., (2011).

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos frente a *X. fastidiosa*, se utilizará la técnica de microdilución en microplacas de 96 pozos siguiendo lo mencionado por Ramírez y Castaño (2009). Se evaluarán diferentes concentraciones de cada extracto vegetal y se mezclarán con una solución bacteriana de *X. fastidiosa* crecida en medio líquido PW, se dejará incubar y posteriormente se determinará, por turbidez o por cambio de color con bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazolium (MTT), el crecimiento o no del microorganismo. Como prueba confirmatoria se sembrará por estría en cajas de petri con el medio de cultivo, 20 µl del contenido del pozo, dejando incubar durante 15 a 30 días a 28 °C. De cada extracto vegetal se obtendrá la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) (Abdul-Mushin et al., 2013).

4. Actividad antagonista de microorganismos benéficos y el efecto de sus metabolitos contra *X. fastidiosa in vitro*

Se realizará el aislamiento de hongos del género *Trichoderma* y bacterias pertenecientes a *Bacillus* a partir de muestras de suelo colectadas de la rizósfera de planas de vid en viñedos. Los aislamientos serán identificados morfológica y bioquímicamente para evaluar su actividad antagónica contra *X. fastidiosa*. Se realizarán confrontaciones de ambos microorganismos por separado contra *X. fastidiosa* en placas con medio de cultivo sólido para observar el efecto directo de las estructuras del hongo o bacteria sobre *X. fastidiosa* y observar si existe antagonismo. De la misma manera se realizarán confrontaciones en medio sólido del hongo contra la bacteria benéfica para determinar si existe algún tipo de antagonismo o sinergismo entre ellos. (García et al., 2011).

También se realizarán fermentaciones en estado líquido para la producción de metabolitos secundarios a partir del hongo y bacteria benéficos y su efecto contra *X. fastidiosa* será medido de la forma antes descrita, es decir, por microplacas.

5. Inducción de resistencia con ácido jasmónico y ácido salicílico en plantas de vid infectadas con *X. fastidiosa* bajo condiciones controladas

El ácido jasmónico (AJ) será producido mediante fermentaciones en estado líquido utilizando al hongo fitopatógeno *Botrodiploidy theobromae* con el medio de cultivo Miersh modificado que será proporcionado de otro proyecto de doctorado. El ácido salicílico será comprado grado reactivo en la casa comercial Sigma Aldrich, mientras que el tercer inductor será aquel microorganismo que haya obtenido mejores resultados en las pruebas de antagonismo contra *X. fastidiosa*. La identificación y cuantificación de AJ se llevará a cabo mediante técnicas de HPLC. Se evaluarán diferentes tratamientos que serán asperjados de manera foliar en plantas de vid en macetas e inoculadas por punción al tallo con una suspensión bacteriana de *X. fastidiosa*, posteriormente se determinarán parámetros bioquímicos indicadores del aumento de las defensas en las plantas como actividad enzimática fenilalanina-amono-liasas, peroxidasa y superóxido dismutasa, así como la identificación y cuantificación de ácido jasmónico y ácido salicílico mediante HPLC y la concentración de compuestos fenólicos totales por técnicas espectrofotométricas (Dathe et al, 1981; Kramell et al, 1999). Los índices de incidencia y severidad de la enfermedad serán evaluados al cabo de 6 -12 meses después de la inoculación calculando el área foliar quemada mediante la siguiente escala: 0 = hoja sana, 1 = hoja con menos del 5% de área quemada, 2 = hoja con 5.1 a 10% de área quemada, 3 = hoja con 10.1 a 25% de área quemada, 4 = hoja con 25.1 a 50% de área quemada y 5 = hoja con más de 50% de área quemada. El análisis de varianza será realizado con las medias del índice de severidad y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad de $P= 0.05$.

6. Variabilidad patogénica de *X. fastidiosa* en vid y otros hospederos

Se realizarán pruebas de transmisión mecánica de una solución bacteriana de *X. fastidiosa* a plantas de diferentes variedades de vid, se determinarán tiempo de incubación hasta presencia de síntomas, tolerancia de variedad a la bacteria, incidencia y severidad de los síntomas, colonización de los haces vasculares de las plantas por *X. fastidiosa* (determinación de UFC, observaciones al microscopio electrónico), tiempo que la bacteria permanece viable en la planta (Hopkins, 1980; Lopes et al. 2003).

7. Variabilidad genética de *X. fastidiosa* de vid y otros hospederos

La variabilidad genética de las cepas aisladas será determinada mediante técnicas de marcadores moleculares como microsatélites utilizando los marcadores y el procedimiento indicado por (Murray y Thompson, 1980; Oliveira et al., 2014) para la diversidad genética.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Muestréos en las diferentes zonas vinícolas				x	x	x	x	x	x	x		
Identificación de <i>X. fastidiosa</i>				x	x	x	x	x	x	x		
Obtención y evaluación de extractos vegetales	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Obtención y evaluación de metabolitos microbianos	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Inducción de resistencia en plantas de vid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Determinación de la variabilidad genética y patogénica de <i>X. fastidiosa</i>				x	x	x	x	x	x			
Redacción y publicación de artículos				x	x						x	x
Obtención de grado												x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Muestréos en las diferentes zonas vinícolas										\$10,000		
Identificación de <i>X. fastidiosa</i>										\$10,000		
Obtención y evaluación de extractos vegetales										\$8,000		
Obtención y evaluación de metabolitos microbianos										\$6,000		
Inducción de resistencia en plantas de vid										\$5,000		
Determinación de la variabilidad genética y patogénica de <i>X. fastidiosa</i>										\$20,000		
Redacción y publicación de artículos										\$8,000		\$8,000
Obtención de grado												

Duración total del proyecto

Año de Inicio	Enero 2016	Año estimado de conclusión	Diciembre 2018
---------------	------------	----------------------------	----------------

5.-Productos Esperados

- Identificación y reporte de la (s) subespecie (s) de *Xylella fastidiosa* presentes en vid en zonas vitivinícolas de Coahuila
- Generación de conocimiento sobre la variabilidad genética y patogénica de las cepas de *X. fastidiosa* presentes en la zonas vinícolas de Coahuila
- Publicación de 2 artículos científicos
- Publicación de memoria para 1 congreso (nacional e internacional)
- Obtención del Grado Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola
- Estrategia de uso de biofungicidas y productos orgánicos como alternativa para el control de *Xylella fastidiosa* en vid

6.-Literatura Citada

- Abdul-Mushin, M.S., Koshy, P. and Sekaran, M. 2013. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10:360
- Aguilar, E., Moreira, L. and Rivera, C. 2008. Confirmation of *Xylella fastidiosa* infecting grapes *Vitis vinifera* in Costa Rica. *Tropical Plant Pathology*, Vol. 33 6, 444-448
- CABI, 2016. Invasive Species Compendium. *Xylella fastidiosa*. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/57195>
- Dathe, W., Rönsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G. and Schreiber, K. 1981. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp., *Planta* Volume 153. 6: 530-535.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2014. Lineamientos para la elaboración, revisión y dictamen de los programas de trabajo de las campañas fitosanitarias coordinadas por la Dirección de Protección

- Fitosanitaria. SENASICA. Hoja 44.
- EPPO. 2016. Global Database. En línea: <https://gd.eppo.int/> Fecha de consulta: 05 de Febrero del 2016.
 - García J.G., 2011. Producción y evaluación de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* para el control de la Sarna de la papa "*Streptomyces* spp." Tesis. Mexico.
 - Hernandez-Martinez, R., Costa, H.S., Dumenyo, C.K., and Cooksey, D.A. 2006. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay. *Plant Dis.* 90:1382-1388.
 - Janse, J.D. and Obradovic, A. 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology* 92 (1, Supplement) S1.35-S1.48
 - Kramell, R., Miersch, O., Schneider, G., Wasternack, C. 1999. Liquid Chromatography of Jasmonic Acid Amine Conjugates. *Chromatographia* Vol. 49, No. 1/2
 - Krugner, R., Sisterson, M.S., Chen, J., Stenger, D.C., and Johnson, M.W. 2014. Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. *Plant Dis.* 98:1186-1193.
 - Ojeda R. S, Guerrero O. T. & Jaramillo F. X.; 2011. Inhibición de la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa a partir de los extractos de plantas de justicia colorata (Nees) Wassh (insulina), *Artocarpus altilis* (parkinson) Fosberg (Fruto del pan) y *Adiantum poiretti* (culantrillo). *Planta de productos Naturales*. Universidad Técnica de Loja
 - Pria, J.W.D., Teixeira, L.P., Messias, C.L., Azevedo, J.L. and Magalhaes, L.P. 2008. Bioassay assessment of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae). *Brazilian J of Microbiology.* 39:128-132
 - Raju, B.C. and Wells, J.M. 1986. Disease Caused by Fastidious Xylem-Limited Bacteria and Strategies for Management. *Plant Dis.* 70,182-186
 - Ramírez L.S. y Castaño D., 2009. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica* Año XV, No 42. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701 263.
 - SENASICA, 2015. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 26. 20 p
 - SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2014. Estadísticas de la producción anual nacional de vid. En línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Fecha de consulta: 05 de Febrero, 2016.
 - Stancanelli, G., Gregorie, J.C., Almeida, R., Hollo, G., Bosco, D., Mosbach-Schulz, O., Caffler, D., Parnell, S., Czwienczek, E. and Bragard, C. 2015. Assessing the risk posed to plant health by *Xylella fastidiosa* in the European Union. *CIHEAM. Watch Letter* No. 33.
 - Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylemlimited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143
 - Abdul-Mushin, M.S., Koshy, P. and Sekaran, M. 2013. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10:360
 - Aguilar, E., Moreira, L. and Rivera, C. 2008. Confirmation of *Xylella fastidiosa* infecting grapes *Vitis vinifera* in Costa Rica. *Tropical Plant Pathology*, Vol. 33 6, 444-448
 - CABI, 2016. Invasive Species Compendium. *Xylella fastidiosa*. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/57195>
 - Dathe, W., Rönsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G. and Schreiber, K. 1981. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp., *Planta* Volume 153. 6: 530-535.
 - Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2014. Lineamientos para la elaboración, revisión y dictamen de los programas de trabajo de las campañas fitosanitarias coordinadas por la Dirección de Protección Fitosanitaria. SENASICA. Hoja 44.
 - EPPO. 2016. Global Database. En línea: <https://gd.eppo.int/> Fecha de consulta: 05 de Febrero del 2016.
 - García J.G., 2011. Producción y evaluación de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* para el control de la Sarna de la papa "*Streptomyces* spp." Tesis. Mexico.
 - Hernandez-Martinez, R., Costa, H.S., Dumenyo, C.K., and Cooksey, D.A. 2006. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay. *Plant Dis.* 90:1382-1388.
 - Janse, J.D. and Obradovic, A. 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology* 92 (1, Supplement) S1.35-S1.48

- Kramell, R., Miersch, O., Schneider, G., Wasternack, C. 1999. Liquid Chromatography of Jasmonic Acid Amine Conjugates. *Chromatographia* Vol. 49, No. 1/2
- Krugner, R., Sisterson, M.S., Chen, J., Stenger, D.C., and Johnson, M.W. 2014. Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. *Plant Dis.* 98:1186-1193.
- Ojeda R. S, Guerrero O. T. & Jaramillo F. X.; 2011. Inhibición de la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa a partir de los extractos de plantas de justicia colorata (Nees) Wassh (insulina), *Artocarpus altilis* (parkinson) Fosberg (Fruto del pan) y *Adiantum poiretti* (culantrillo). *Planta de productos Naturales. Universidad Técnica de Loja*
- Pria, J.W.D., Teixeira, L.P., Messias, C.L., Azevedo, J.L. and Magalhaes, L.P. 2008. Bioassay assessment of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae). *Brazilian J of Microbiology.* 39:128-132
- Raju, B.C. and Wells, J.M. 1986. Disease Caused by Fastidious Xylem-Limited Bacteria and Strategies for Management. *Plant Dis.* 70,182-186
- Ramírez L.S. y Castaño D., 2009. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica Año XV, No 42. Universidad Tecnológica de Pereira.* ISSN 0122-1701 263.
- SENASICA, 2015. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 26. 20 p
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2014. Estadísticas de la producción anual nacional de vid. En línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Fecha de consulta: 05 de Febrero, 2016.
- Stancanelli, G., Gregorie, J.C., Almeida, R., Hollo, G., Bosco, D., Mosbach-Schulz, O., Caffler, D., Parnell, S., Czwienczek, E. and Bragard, C. 2015. Assessing the risk posed to plant health by *Xylella fastidiosa* in the European Union. *CIHEAM. Watch Letter* No. 33.
- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylemlimited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143