

**MONITOREO DE INSECTOS VECTORES Y EFECTO DE FUENTES DE
INÓCULO EN EL DESARROLLO DE LA EPIDEMIA PUNTA MORADA DE
LA PAPA**

VIDAL HERNÁNDEZ GARCÍA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Noviembre de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

MONITOREO DE INSECTOS VECTORES Y EFECTO DE FUENTES DE
INÓCULO EN EL DESARROLLO DE LA EPIDEMIA DE PUNTA MORADA
DE LA PAPA

TESIS

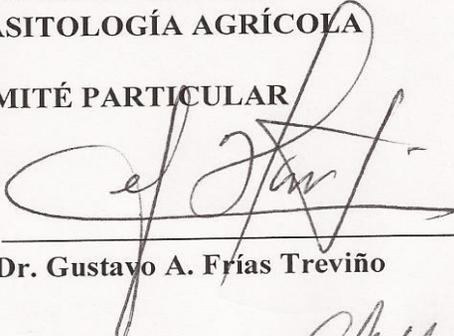
POR

VIDAL HERNÁNDEZ GARCÍA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

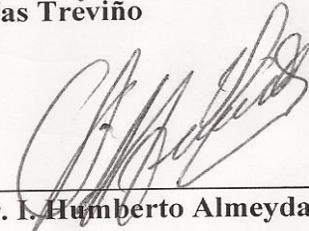
COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal: 

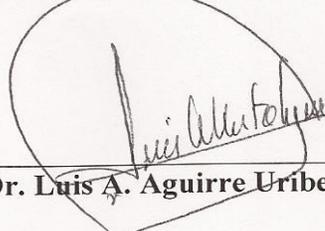
Dr. Gustavo A. Frías Treviño

Asesor: 

Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor: 

Dr. Humberto Almeyda León

Asesor: 

Dr. Luis A. Aguirre Uribe

Asesor: 

Dr. Ernesto Cerna Chávez


Dr. Fernando Ruíz Zárate
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Noviembre de 2011.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por brindarme el apoyo económico durante la realización de uno de mis grandes esfuerzos para la preparación profesional.

Con cariño a la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por haberme abierto sus puertas y envolverme en su seno, además de darme los más sabios conocimientos para terminar mis estudios profesionales y ser siempre un hombre de bien ante todas las adversidades que hay en la vida.

Al **Departamento de Parasitología, a la Subdirección de Postgrado** y a todas aquellas personas que ahí trabajan por su gran atención brindada.

El autor expresa su humilde y profundo agradecimiento al **Dr. Gustavo A. Frías Treviño**, por la oportunidad brindada para realizar esta investigación, invaluable asesoría para la culminación de este trabajo, a sí como mis más sinceras gracias por su amistad brindada durante los años en que nos conocemos.

Con agradecimiento al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por su magnífica y acertada asesoría, además de sugerencias para la mejor realización y culminación de esta investigación, mil gracias.

Al **Dr. I. Humberto Almeyda León**, un profundo agradecimiento por haber aceptado en primera instancia ser parte del comité de asesores y por la invaluable asesoría brindada durante la etapa de laboratorio, además sugerencias para la mejor realización y culminación de esta investigación, gracias.

Al **Dr. Luis A. Aguirre Uribe**, por su disposición, apoyo incondicional y por sus valiosas sugerencias brindadas durante la realización de este trabajo de investigación.

Al **Dr. Ernesto Cerna Chávez** por su valioso apoyo y motivación para culminar este trabajo de investigación.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Coahuila (**CESAVECO**), y **Fundación Produce Nuevo León y Coahuila**, en especial al **Ing. José Luis Duran** por su valiosa cooperación en la toma de datos del monitoreo de insectos y datos climáticos.

A los **productores** de papa de la región de Arteaga, Coahuila y Galeana Nuevo León, por el apoyo brindado durante los muestreos en los lotes de estudio.

A todos mis **Maestros**, por transmitirme parte de sus conocimientos durante mis estudios de Doctorado.

A mis **Amigos y Compañeros** del programa de graduados por todos los momentos felices; en especial a Dr. Quezada, Rigoberto, Omar, Misael, Pedro, Pancho, Salvador, Rebe, y Agustín por todas las alegrías compartidas dentro y fuera de las aulas.

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen de Guadalupe, quienes me han guiado por el mejor camino e iluminado en aquellos momentos tan difíciles que hay en la vida y por ser siempre mi mayor aliento durante mis estudios.

A LA MEMORIA DE MIS PADRES:

Vidal Hernández Pérez (†)

María Luz García Vásquez (†)

A **él**, por el recuerdo y por la admiración que siempre te tendré, ya que a tú edad, nunca te cansaste de cultivar la sagrada tierra y donde quiera que te encuentres papi, solo te pido: herédame esos deseos de trabajo arduo en el campo y guía mi camino por siempre.

A **ella** por darme buenos principios, educación, deseos de superación y todos los sacrificios realizados para poder llegar en el lugar en donde me encuentro, sin tú ayuda jamás hubiera logrado lo que ahora soy, mucho te lo debo a ti y donde quiera que estés mami nunca te olvidaré.

Por eso, les brindo este trabajo en premio a su gran amor, cariño y en agradecimiento a tantos esfuerzos que hicieron por mí, lo que he conseguido se los debo a ustedes, y donde quiera que se encuentren un eterno agradecimiento papas.

A MIS HERMANOS:

Salomón, Reynaldo, Clary, Dany, Jhonny e Hiver Hugo

Por su incondicional apoyo moral y económico, por su confianza depositada en mi.

A MI QUERIDA ESPOSA:

Luz Elena López Pérez, por estar siempre conmigo, por el gran amor, confianza y apoyo incondicional que me haz brindado durante mis estudios de Postgrado y durante los momentos difíciles que hemos pasado juntos.

A MIS DOS GRANDES TESOROS QUE DIOS ME HA DADO, mis queridos hijos: Jesús Joanni y Selena Vidalí, que son fuente de mi vida, motivación y la más bella experiencia que la vida y dios me ha brindado al tenerlos junto a mí.

A MIS SOBRINOS: Yeimy Yarityz, Kevin Axel, Denmy Kely y Emily Lucely

Por la bonita alegría que han traído a la familia y por ser los sobrinos mas lindos que tengo, se que algunos no entienden esto, pero cuando aprendan a leer acuérdense que los queremos mucho.

A MIS PRIMOS Y AMIGOS:

Por su gran apoyo moral, con quienes he convivido y disfrutado grandes momentos de mi vida; a ustedes les deseo el mejor de los éxitos donde quieran que se encuentren.

COMPENDIO

MONITOREO DE INSECTOS VECTORES Y EFECTO DE FUENTES DE INÓCULO EN EL DESARROLLO DE LA EPIDEMIA DE PUNTA MORADA DE LA PAPA

POR

VIDAL HERNÁNDEZ GARCÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. NOVIEMBRE 2011.

Dr. Gustavo A. Frías Treviño -Asesor-

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, Inóculo, Monitoreo, Incidencia, Vectores, Fitoplasmas, Candidatus, Zebra chip.

En los años 2004 al 2007, la Punta Morada de la Papa (PMP), adquirió mucha importancia por las grandes pérdidas que ocasiono en zonas paperas de Coahuila-Nuevo León, ya que la incidencia se incremento considerablemente afectando la mayoría de lotes destinados a la producción de papa, lo que trajo consigo pérdidas millonarias por la mala calidad de tubérculos cosechados. Actualmente, la PMP se maneja con numerosas aplicaciones de plaguicidas para controlar a los insectos vectores; sin embargo, aún con este manejo es frecuente el registro de altas incidencias de la enfermedad y cuantiosas pérdidas. En este trabajo de investigación, se analizo la incidencia de la PMP, las

poblaciones del psilido *Bactericera cockerelli* y de cicadelidos (*Empoasca* spp y *Macrostelus* spp), en 3 sitios de producción y 4 ciclos de cultivo (2004-2007) en las regiones paperas de Coahuila y Nuevo León. Se evaluó la importancia de la semilla tubérculo y la maleza perene *Lycium berlandieri* (Cilindrillo) como fuentes de inóculo de la punta morada de papa bajo condiciones de campo. De acuerdo a los resultados de esta investigación, se comprobó que existe una relación lineal, altamente significativa entre la incidencia anual de la PMP y las poblaciones de *B. cockerelli* y de cicadelidos, la importancia de éstos vectores en la diseminación de la PMP en Coahuila y Nuevo León. Se comprobó que la incidencia de la PMP, a los 30 y 57 días después de la emergencia (DDE) fue menor conforme se incrementó la distancia a partir de una fuente de inóculo (FI), constituida por plantas provenientes de semilla tubérculo enfermas de PMP. La distancia máxima a la que puede dispersarse la enfermedad a partir de una fuente de inóculo es de 80 a 100 m, según el gradiente de dispersión exponencial invertido en base al modelo. Las pérdidas causadas por PMP se incrementaron linealmente conforme se redujo la edad de la planta al inicio de la aparición de los síntomas de PMP. En muestras con síntomas de PMP se detectó la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter* y en las muestras analizadas por PCR, se detectaron muestras positivas al fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter solanacearum*, así como muestras con infecciones mixtas. En las parcelas en las que se utilizó como fuente de inóculo la maleza cilindrillo y en las parcelas sin fuente de inóculo, no se detectó un gradiente de PMP.

ABSTRACT

INSECTS VECTORS MONITORING AND EFFECT OF INOCULUM SOURCES IN THE DEVELOPMENT OF THE EPIDEMICS POTATO PURPLE TOP

BY

VIDAL HERNANDEZ GARCIA

DOCTORATE IN SCIENCES

AGRICULTURAL PARASITHOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. NOVEMBER 2011.

Dr. Gustavo A. Frías Treviño -Advisor-

Key words: *Solanum tuberosum*, Inoculum, Monitoring, Incidence, Vectors, Phytoplasma, Candidatus, Zebra chip.

During 2004 and 2007, the Potato's Purple Top (PPT) acquired great importance because of the great losses it caused in potato zones of Coahuila-Nuevo Leon, as its incidence increased considerably damaging most of the plots designated for potato production, thus bringing millionaire losses because of the bad quality of the harvested tubercles. Nowadays, PTP is managed with numerous chemical spraying to control the vectors insects; however, still with this handling it is frequent the registration of high incidences of the disease and considerable losses. This investigation work you analyzes the incidence of the PPT, the populations of the psyllids *Bactericera cockerelli* and

leafhoppers (*Empoasca* spp and *Macrosteles* spp), in 3 production sites and 4 crop cycles (2004-2007) in the potato growing region of Coahuila and Nuevo León, México. It was evaluated the importance of the seed tuber and the wild host perene *Lycium berlandieri* (Cilindrillo) as inoculum sources of the PMP under field conditions. According to the results of this investigation, was verified that a linear relationship exists, highly significant between the annual incidence of the PMP and the populations of *B. cockerelli* and leafhopper, the importance of these vectors in the dissemination of the PMP in Coahuila and New León. It was proven that the incidence of the PPT, 30 and 57 days after the emergency (DDE) it was smaller compared to it increased the distance starting from inoculum source (FI), constituted by plants coming from infected seed tuber of PPT. Fitted model to the data indicates that maximum dispersal distance of ZC inoculum source was 80-100 m. The losses caused by PPT were increased linearly compared to it reduced the time from the plant to the beginning of the appearance of the symptoms PPT. In samples with symptoms of PPT it detects the presence of the bacteria *Candidatus Liberibacter* and in the samples analyzed by PCR, positive samples were detected the phytoplasma and *Candidatus Liberibacter solanacearum*, as well as you show with mixed infections. In the plots in those that it was used as inoculum source the wild host cilindrillo and in the plots without inoculum source, a gradient of PPT was not detected.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN -----	1
Objetivos -----	3
REVISION DE LITERATURA -----	4
El Cultivo de la papa -----	4
Utilización-----	6
Importancia económica-----	6
Ciclo del cultivo-----	7
Crecimiento del cultivo-----	7
Plagas y enfermedades de importancia económica-----	9
La Punta Morada de la Papa -----	10
Fitoplasma -----	13
Sintomatología-----	15
Importancia de las enfermedades fitoplásmaticas-----	16
Transmisión y dispersión-----	17
Detección molecular-----	18
Detección por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) -----	19
Clasificación de los Fitoplasmas-----	20
Zebra chip -----	22
<i>Candidatus Liberibacter spp.</i> -----	23
Principales especies -----	24
Sintomatología-----	25
Importancia económica de las enfermedades causadas por <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter spp.</i> -----	26
Transmisión y dispersión-----	26
Detección molecular-----	27
Cuantificación de enfermedades -----	28
Cuantificación del patógeno -----	29
Cuantificación de las condiciones ambientales -----	29
Análisis de epidemias -----	30

Importance of <i>Bactericera cockerelli</i>, <i>Empoasca</i> spp y <i>Macrosteles</i> spp for Potato Purple Top Epidemic. -----	32
Importancia de la Semilla-Tubérculo y la Maleza <i>Lycium berlandieri</i> para la Epidemia de Punta Morada de la Papa-----	44
CONCLUSIONES GENERALES-----	68
LITERATURA CITADA-----	69

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa es uno de los más importantes de México, por ser una hortaliza que aporta gran cantidad de carbohidratos y almidón en la nutrición humana; además de tener gran importancia en cuanto a su valor alimenticio, también genera grandes fuentes de ingreso durante su explotación.

Durante el 2010 se sembraron alrededor de 55,645.63 mil ha, obteniendo una producción nacional aproximadamente de 1,536,617.37 ton principalmente en regiones productoras como la del pacífico, noreste y centro del país, siendo los principales estados productores: Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Nuevo León, este último estado al igual que Coahuila reportaron una producción de 133,320.00 ton y 28,825.57 ton respectivamente, cuya zona papera cuenta con riego sofisticado creando así una agricultura tecnificada de los valles de esta región. (SIAP, 2010).

En los últimos años este cultivo de la papa ha sido afectado por un complejo de agentes, causando la punta morada de la papa (PMP), entre los cuales se encuentran los fitoplasmas, la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. y sus vectores. La PMP, ocasiona de manera directa la mala calidad de los tubérculos al inducir una acumulación de metabolitos, ocasionándoles un manchado interno que los hace inadecuados para la industria (García-Quijano, 1996; Cadena-Hinojosa, 1996; Santiago, 2005). Los fitoplasmas y la bacteria

Candidatus Liberibacter spp. son transmitidos por insectos del Orden Hemiptera, entre los que se encuentran insectos de las familias Cicadellidae y Psyllidae (Almeyda, *et al.*, 2008; Lee, 1998; Hansen *et al.*, 2008).

La familia Psyllidae está constituida por 180 géneros y en el mundo existen más de 3,000 especies descritas, que en su mayoría se alimentan de plantas dicotiledóneas (Marín, 2003). Los psílidos son conocidos como "piojos saltones" o "pulgonos saltadores" por la similitud con estos insectos y por la forma de moverse (Kaloostian, 1980).

La familia cicadellidae constituye un grupo muy grande (cerca de 2500 especies norteamericanas) (Triplehorn y Johnson, 2005). Oman *et al.*, (1990) mencionan que la familia cuenta con 2 476 géneros y 21 305 especies. A los cicadélidos se les conoce como chicharritas y son insectos saltadores muy comunes. Son vectores importantes ya que pueden transmitir hasta 40 virus distintos pertenecientes a las familias Rhabdoviridae y Reoviridae, además de un grupo de geminivirus. Los géneros más importantes son *Empoasca*, *Dalbulus* y *Dicrella* (Metcalf y Flint, 1984).

En las áreas productoras de papa de Coahuila y Nuevo León, actualmente, el manejo de la PMP se basa en el monitoreo de insectos vectores cuantificando semanalmente la población de insectos vectores y notificando los resultados a los productores para la toma de decisiones de cuando aplicar; sin embargo se desconoce la importancia relativa de las especies de insectos

vectores en la diseminación de la enfermedad; también se desconoce si los insectos son los que introducen la enfermedad al cultivo o si solo la diseminan una vez que aparecen plantas de papa enfermas dentro del cultivo. Las numerosas aplicaciones de plaguicidas para controlar a los insectos vectores para el manejo de esta enfermedad; dejan mucho que desear, ya que, aún con este manejo es frecuente el registro de altas incidencias de la enfermedad y cuantiosas pérdidas. En la región se desconoce cuál es la principal fuente de inóculo (FI) primario a partir de la cual se inicia la epidemia, cual es la distancia máxima a la que puede dispersarse la enfermedad, cual es el período de incubación en campo y cuáles son los períodos críticos en los que el cultivo debe protegerse para reducir las pérdidas causadas por PMP.

OBJETIVOS:

1. Determinar el periodo de incubación y la capacidad de dispersión de la PMP a partir de una FI.
2. Determinar la importancia de la semilla tubérculo y las malezas como FI para el inicio de la epidemia.
3. Evaluar el rendimiento en plantas infectadas en diferentes etapas de desarrollo de la planta.
4. Caracterizar la fluctuación poblacional de insectos vectores de la enfermedad PMP en la zona papera de Coahuila y Nuevo León y su relación con la incidencia de PMP.

REVISION DE LITERATURA

El Cultivo de la papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las especies más importantes de la familia *Solanaceae* que también incluye al tomate, chile, tabaco y berenjena. Se domesticó en Sudamérica, específicamente en Bolivia, entre los lagos Titicaca y Poopó hace unos 10,000 a 7,000 años, aunque los primeros vestigios se encontraron en el cañón de Chilca, al sur de Lima en Perú que datan de una antigüedad de hace 10,500 años, aunque existe controversia y opiniones muy diversas en cuanto al origen de la papa, sin duda se estima que el altiplano peruano-boliviano es el centro de origen de este importante cultivo (Rousselle *et al.*, 1999).

La papa tiene más especies silvestres que cualquier otro cultivo. Estas especies están ampliamente distribuidas, desde la región suroeste de los Estados Unidos (Nebraska y Colorado) hasta el extremo sur de los Andes. Existen dos centros de biodiversidad de especies silvestres, uno en la región central de México y otro en la región alta Andina, desde Perú hasta el noroeste Argentino, según el Botánico inglés John Gregory (Hawkes, 1990).

Fue introducida a Europa después de la conquista de los españoles, apareciendo gradualmente en varios países europeos durante el siglo XVII y XVIII. Durante el periodo de 1600 a 1845 la papa se constituyó como la principal

fuentes de alimentos de Irlanda, siendo los inmigrantes de este país, los que la trajeron a Norteamérica en el año de 1719.

La papa usualmente se propaga de forma vegetativa o asexual, aunque también puede propagarse por semilla verdadera.

La planta de papa tiene raíces superficiales, y el tubérculo es un engrosamiento de la porción terminal de los tallos subterráneos (estolones) debido a la acumulación de productos de la fotosíntesis, y tiene capacidad de reproducción. La epidermis del tubérculo está compuesta por la capa exterior de células, y con el peridermo (varias capas de células corchosas) forman la piel o cáscara. Alrededor de todo el tubérculo e inmediatamente debajo de la piel se halla el anillo vascular, que se extiende en toda la superficie interna del tubérculo y conecta, junto con el área medular, a todas las yemas.

La piel de un tubérculo maduro es muy resistente a la entrada de microorganismos perjudiciales y evita la pérdida de agua. En los tubérculos que crecen en suelos con excesiva humedad, las lenticelas se abren y pueden ser una puerta de entrada para microorganismos patógenos. Los virus y otros agentes sistémicos se localizan en el anillo vascular y en las yemas (Leyva-López, 2002, b).

Utilización

La producción de papa que se obtiene de las regiones paperas de México y del mundo va para su consumo en fresco normalmente, aunque en países desarrollados los porcentajes de esta producción de papa se procesa de diferente manera para su aprovechamiento posterior. En la industria de la papa, las técnicas han evolucionado, pero los principios siguen siendo los mismos, hojuelas deshidratadas y papa trozadas congeladas, y a los que hay que añadir otros sistemas de deshidratación y de conservación mediante fritura y cocción como los purés (Alonso, 1996).

Importancia económica

La papa es de suma importancia como fuente de alimentación humana ocupando el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios del mundo, pues su producción sólo es superada por el trigo, maíz y arroz. En los últimos cinco años, la superficie sembrada se ha mantenido gradualmente, y la superficie cosechada ha aumentado un poco, a pesar de numerosos problemas fitopatológicos, de una producción nacional de 1,129, 280 ton en el 2005 a 1,536, 617 ton en el 2010, en México (SIAP, 2010).

Los precios de la papa también están sujetos por la fuerza de la oferta y la demanda, pero a pesar de ello, el productor siempre busca recuperar las inversiones realizadas, aunque en ocasiones ocurran desastres con las enfermedades. Pero, sin lugar a duda la papa es uno de los cultivos que tiene una fuerte demanda por la gran fuente de ingresos que se genera para los

agricultores, y la gran demanda de mano de obra que necesita durante su desarrollo agrícola (70-85 jornales/ha) y de postcosecha como cosechadores, cargadores, transportistas, comerciantes (Rocha, 1985).

Es por ello, que la papa constituye un alimento fundamental en la dieta del hombre, pues en México el consumo per capita es de 12.5 kg, muy bajo si comparamos a Estados Unidos u Holanda que es de 58.4 kg y 58.8 kg respectivamente; en México la papa ocupa el sexto lugar de importancia alimenticia (Rangel, 1995).

Ciclo del cultivo

El crecimiento y desarrollo de la papa dependen principalmente de factores genéticos y de condiciones ambientales. El cultivo varía de más o menos 90 días para variedades tempranas y de más o menos de 120 días para las variedades tardías.

Crecimiento del cultivo

En el cultivo de papa la fase de crecimiento es fuertemente influenciado por una serie de factores como clima, ambiente del suelo, prácticas culturales y la presencia de plagas, de tal manera que los rendimientos son una expresión integrada de diversas variables (1980; Stone *et al.*, 1986).

Una mejora en los rendimientos se ha atribuido a un incremento en el tamaño de los tubérculos, aunque hay quienes lo han relacionado con un aumento en su cantidad (Bernoit and Grant, 1980).

La habilidad de una planta para sostener el crecimiento del tubérculo depende de la presencia de suficiente follaje para producir los fotosintatos necesarios y un adecuado suministro de agua y nutrientes (Moorby, 1978).

Antes del inicio de la tuberización el follaje es el principal usuario de los asimilatos, sin embargo desde el inicio de la tuberización existe un mayor flujo de éstos hacia los estolones y tubérculos en formación (Moorby, 1978). De esta manera del 75 a 85 % del total de materia seca producida por la planta es acumulado en los tubérculos (Cutter, 1978).

Bajo ciertas condiciones ambientales que limitan la asimilación neta de carbono, las ramas se pueden convertir en las principales demandantes de los fotosintatos (Malik *et al.*, 1992).

Igualmente bajo ciertas condiciones anormales los tubérculos se pueden desarrollar casi en cualquier yema vegetativa independientemente de su ubicación en la planta (Cutter, 1978).

Plagas y enfermedades de importancia económica

El cultivo de la papa es susceptible a más de 300 plagas y enfermedades, aunque no todas causan pérdidas significativas en el rendimiento. El tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* es la enfermedad más importante en el mundo (Zúñiga-López *et al.*, 2000), sin embargo esta enfermedad ha pasado a segundo término ya que actualmente la enfermedad más importante para el cultivo de la papa en México es conocido como la punta morada de la papa o como Zebra Chip en Estados Unidos. Otra enfermedad endémica de importancia en zonas húmedas es la marchitez bacteriana, que es causado por *Pseudomonas solanacearum*. También *Erwinia* sp. *sepedonicum* o *Corynebacterium sepedonicum* son bacterias que causan enfermedades importantes en el cultivo de la papa en muchos lugares del mundo. También se han observado algunos nematodos como *Globodera* sp. y *Meloidogyne* spp. (Salazar, 1996). Al presente, se han encontrado numerosos virus como el virus Y de la papa (PVY), virus X de la papa (PVX) y el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) causando disminución tanto en producción como en calidad del tubérculo, viroides como el tubérculo fusiforme de la papa (PSTVd) que causa deformación de los tubérculos y pérdidas significativas en producción; y fitoplasmas, patógenos que han afectado seriamente los rendimientos de este cultivo en nuestro país (Leyva-López, 2002, b).

La Punta Morada de la Papa

Esta enfermedad, fue reconocida inicialmente en Canadá durante 1933, pero fue hasta 1953, cuando se registraron incidencias de 20 a 75 %, debido a la condición de brote fino que se desarrollaba en los lotes de semilla infectada con punta morada. Para 1954 las pérdidas en la producción comercial de papa fueron cuantiosas en zonas productoras de Canadá y Estados Unidos de Norte América, ya que los tubérculos utilizados como semilla produjeron el síntoma de Brote de Hilo, causando que las plantas que lograron desarrollar no produjeran tubérculos adecuadamente (Cadena-Hinojosa, 1993).

En México la enfermedad punta morada de la papa fue mencionada por primera vez por Niederhauser y Cervantes en 1956 y observada en el valle de Toluca, en las cercanías del Nevado de Toluca, en Guanajuato, Michoacán y en los estados de Puebla y Tlaxcala (Cadena y Galindo, 1985).

En la región de Coahuila-Nuevo León, Guigon (1994), describe una enfermedad con síntomas típicos de punta morada, pero no la menciona como tal, solo describe que algunas plantas de etiología desconocida presentaban síntomas como tubérculos aéreos y brotes axilares anormales, así como una coloración en los bordes de las hojas rosa-púrpura y el desarrollo de tubérculos en las yemas axilares de las plantas.

En otro estudio realizado por García-Quijano (1996), señaló que en las áreas paperas de Coahuila y Nuevo León, Jalisco y otras del país, comenzó a manifestarse una enfermedad de etiología desconocida ocasionando amarillamientos, enrollamiento de folíolos color morado, necrosis vascular en tallos y tubérculos, además de otros síntomas que coincide con lo descrito por Guigon (1994), ocasionando pérdidas que llegan hasta el 80% (Rubio-Cobarrubias *et al.*, 2002), lo que en la actualidad dicha enfermedad es causada por un complejo de agentes y conocida como síndrome de punta morada de la papa.

Sintomatología

La planta puede manifestar síntomas de punta morada, desde los 20 días después de la emergencia, dependiendo de las condiciones de nutrición, humedad, temperatura, alcanzando la mayor expresión de estos, durante la etapa de floración, aproximadamente a los 55 después de emergencia. En general varios autores que han estudiado esta enfermedad hacen mención que los síntomas provocados por esta enfermedad pueden variar dependiendo del órgano de la planta que es atacado, etapa fenológica del cultivo y de las condiciones climáticas en que se establece el cultivo; además la planta enferma toma al final una apariencia de marchitez con un tono amarillento a morado apagado y muere prematuramente (Cadena-Hinojosa, 1974; Cadena y Galindo, 1985; Flores *et al.*, 2004).

Hojas

En campo, es común observar que los primeros síntomas son tonalidad amarilla de las hojas de la parte aérea de la planta, sin que haya presencia de insectos, esto se da al principio en las orillas de los lotes; posteriormente los síntomas aparecen en los brotes terminales y en punta de folíolos con pequeñas áreas con pigmentación morada, y las hojas se enrollan en forma de taco o cuchara y toman un color morado de donde adquiere el nombre la enfermedad.

Tallos

Al mismo tiempo que van apareciendo los síntomas en las hojas y a medida que van avanzando la enfermedad, la planta detiene su desarrollo produciendo en tallos, una brotación anormal de yemas axilares, también se observa un engrosamiento de tallos y acortamiento de entrenudos, así mismo en la parte basal de los tallos hay necrosis vascular (Cadena y Galindo, 1985).

Tubérculos

Durante la etapa de desvare, se observan tubérculos aéreos en la base de los tallos. Los tubérculos producidos suelen estar sanos y sin propiciar ningún síntoma de punta morada, pero al paso del tiempo aquellos tubérculos de lotes que presento alta incidencia de punta morada, pueden mostrar síntomas como un anillo vascular y necrosis reticular. Los tubérculos procedentes de plantas enfermas no brotan, y si lo hacen producen una brotación anormal que puede ser brotes finos y débiles (Cadena y Galindo,

1985); aunque en la realidad, en campo se observa que tubérculos que tienen el manchado producen una brotación anormal que puede ser brotes finos y débiles pero también tiene brotes normales.

Se ha demostrado que los síntomas descritos previamente son causados por fitoplasmas, por la bacteria *Candidatus Liberibacter* sp., patógenos transmitidos por el psillido *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae) y chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae), (Leyva-López *et al.*, 2002 a; Munyaneza, *et al.*, 2006; Almeyda, *et al.*, 2008).

Fitoplasmas

Los fitoplasmas fueron observados al microscopio electrónico por primera vez en 1967 por un grupo de científicos japoneses, relacionándolos con enfermedades de plantas con síntomas de amarillamientos, descartándose a los virus como agente causal. Debido a su gran parecido con los micoplasmas, se les denominó “organismos tipo micoplasma” hasta 1994, que en el “10 th Congress of International Organization of Mycoplasmaology” se sustituyó éste por el término fitoplasmas. Estos patógenos pertenecen a la clase *Mollicutes*, que agrupa a los procariotes auto replicativos más pequeños que se conocen, incluye a los micoplasmas (infectan animales), fitoplasmas (infectan plantas e insectos), espiroplasmas (afectan plantas e insectos), acholeplasmas (afectan animales, insectos y plantas) y entomoplasmas (infectan a insectos y plantas) (Razin *et al.*, 1998). Los miembros de esta Clase son similares a las bacterias, pero están desprovistos de pared celular; este rasgo es el responsable de la mayoría de las características de esta clase: gran plasticidad,

pleomorfismo, gran sensibilidad a la lisis y total resistencia a la penicilina u otras sustancias antibacterianas que degradan o inhiben la síntesis de péptidoglucano, siendo por el contrario sensibles a la tetraciclina (Kuboyama *et al.*, 1998). Son organismos de tamaño pequeño, con un diámetro que puede variar entre 0.1-1.0 mm. Poseen genomas muy pequeños (530-1350 kb) (Marcon *et al.*, 1999); los más pequeños son aproximadamente 1/6 del tamaño del genoma de *Escherichia coli* y 1/2 del de las rickettsias, con un contenido de guanina y citosina (G+C) de 23-31 mol%, mucho menor que otros procariotes (25-80 mol%); este último rasgo impone grandes restricciones a la cantidad de información genética disponible, lo que se traduce en sus complejos requerimientos nutricionales y sus modos de vida parásitos o saprófitos (Llácer *et al.*, 1996).

El conocimiento sobre su fisiología, bioquímica y biología molecular es muy limitado, debido principalmente a que los procedimientos disponibles para la purificación y aislamiento del DNA de los fitoplasmas son muy tediosos y pocos satisfactorios por la inevitable contaminación de los componentes de la planta y a la imposibilidad de cultivarlos *in vitro* (Yu *et al.*, 1998).

En la naturaleza, las enfermedades de las plantas asociadas a fitoplasmas son transmitidas y dispersadas principalmente por insectos vectores pertenecientes a la familia *Cicadelloidae* y *Fulgoridae* (Lee *et al.*, 1998). La detección e identificación de una gran cantidad de fitoplasmas involucrados en cientos de enfermedades de plantas ha sido posible al desarrollo de herramientas moleculares como los anticuerpos mono y policlonales, sondas de DNA clonado de fitoplasmas,

particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con “primers” específicos para fitoplasmas diseñados sobre la secuencia del gen 16S ribosomal (Lee *et al.*, 1998; Gundersen y Lee, 1996).

Sintomatología

Los fitoplasmas han sido considerados como el agente causal de más de 300 diferentes enfermedades en cientos de especies de plantas (Chang, 1998). Las plantas infectadas con fitoplasmas exhiben una serie de síntomas que sugieren una profunda alteración en el balance normal de hormonas de plantas o reguladores de crecimiento (Lee *et al.*, 2000). Los síntomas más usualmente asociados a estos patógenos son los amarillamientos, filodias (desarrollo de partes florales de la hoja), virescencia (desarrollo de flores verdes) esterilidad de las flores, proliferación de brotes axilares (escoba de bruja), enanismo, apariencia arbustiva al final de los tallos, necrosis en el floema de tallos y raíces, muerte regresiva de ramas en plantas leñosas y declinamiento generalizado (Rojas-Martínez, 1999).

Los síntomas inducidos en una planta enferma varían con el fitoplasma y con el estado de infección. Internamente, las infecciones fitoplásmicas pueden causar necrosis del floema y muy comúnmente formación en exceso de tejido de floema, resultando en venas dilatadas. En general, estos patógenos provocan claros efectos perjudiciales en las plantas, aunque en algunas especies de plantas son tolerantes o resistentes. Las pérdidas económicas

causadas por las infecciones fitoplásmicas varían desde una reducción parcial en rendimiento y calidad hasta la pérdida total del cultivo (Leyva-López, 2002).

Importancia de las enfermedades fitoplásmicas

Los fitoplasmas se han asociado a cientos de enfermedades de especies de plantas, incluyendo plantas alimenticias importantes, cultivos frutícolas, plantas ornamentales, árboles de sombra y maderables. En los últimos 5 años se han identificado una gran diversidad de enfermedades causadas por fitoplasmas, ya que éstos son uno de los principales factores limitantes en la producción de cultivos económicamente importantes en el mundo. Por ejemplo, el fitoplasma del amarillamiento del aster contribuye con la mayor parte de las pérdidas de algunos cultivos vegetales (lechuga, zanahoria, apio, entre otros) y de plantas ornamentales en Norteamérica y aparte de Europa (Lee *et al.*, 1992); amarillamiento de durazno y enfermedad X en durazno y cereza en EU (Gundersen *et al.*, 1995), escoba de bruja de la papa y enmelezado del maíz a las pérdidas de papa y maíz en centro y Sudamérica; la escoba de bruja en camote y enfermedades relacionadas con pérdidas en este cultivo en Asia y Australia (Gibb *et al.*, 1995), entre otras enfermedades causadas por fitoplasmas. Debido a la presencia de estas enfermedades, el movimiento de muchas de las plantas afectadas están restringidas por regulaciones cuarentenarias internacionales (Lee *et al.*, 2000; Leyva-López *et al.*, 2002).

Transmisión y dispersión

Los fitoplasmas son parásitos obligados que habitan el floema de la planta y se dispersan principalmente por insectos chupadores pertenecientes a las familias Cicadellidae y Fulgoridae (Chicharritas) (Lee *et al.*, 1998). Los insectos adquieren a los fitoplasmas al alimentarse de tejidos del floema de una planta enferma y posteriormente los transmiten de éstas a otra planta. Los fitoplasmas invernan en insectos vectores así como en plantas perennes que sirven de reservorios de los fitoplasmas que serán dispersados en la siguiente primavera (Lee *et al.*, 2000).

El movimiento a larga distancia, de un continente a otro, se efectúa más comúnmente cuando no se tienen medidas cuarentenarias estrictas. El material infectado puede ser introducido a través del intercambio internacional de germoplasma tales como injertos, yemas, portainjertos y tubérculos, a nuevas regiones geográficas donde la vegetación nativa y las especies vectores son diferentes de la región de donde los fitoplasmas fueron inadvertidamente transportados. Si todos los elementos se conjugan (especies de plantas susceptibles y vectores disponibles), los fitoplasmas son introducidos, creándose un nuevo nicho para el fitoplasma importado, teniendo así la oportunidad de interactuar con plantas nativas, vectores y otros fitoplasmas (Lee *et al.*, 1998).

Por lo tanto, la distribución y dispersión está fuertemente relacionada con los hábitos alimenticios y la biología de los insectos vectores, así como también las plantas alternativas o reservorios de los fitoplasmas.

Detección molecular

En las décadas pasadas, debido a la imposibilidad de obtener cultivos puros de cualquier fitoplasma, su detección e identificación no fue precisa. Los principales criterios usados para diagnosticar enfermedades de posible origen fitoplásmico fueron la presencia de síntomas característicos y la subsiguiente observación al microscopio de cuerpos tipo neoplasma en secciones ultra delgadas en las plantas enfermas (Errampalli *et al.*, 1992). En algunos casos, la desaparición de síntomas posteriores al tratamiento con tetraciclinas brinda evidencia adicional que sustenta el diagnóstico (Lee y Davis 1992). Las variantes de fitoplasmas fueron diferenciadas e identificadas por sus propiedades biológicas, tales como similitud y diferencia en síntomas inducidos en plantas infectadas, su rango de hospedantes y sus insectos vectores (Rojas-Martínez, 1999).

En los 80's, el desarrollo de sondas moleculares, tales como anticuerpos mono y policlonales y DNA clonado específicamente para fitoplasmas, dio un gran impulso al diagnóstico de estas enfermedades (Lee *et al.*, 1998). Las pruebas serológicas como ELISA y microscopía inmunofluorescente, usando anticuerpos monoclonales altamente específicos, permitieron la detección e identificación de cepas de fitoplasmas específicas. Hibridaciones tipo "dot y

southern” usando sondas de DNA clonado de fitoplasmas permitieron el estudio de relaciones genéticas entre estos patógenos, dando como resultado el reconocimiento de varios grupos y subgrupos (Ko y Lin 1994). Actualmente la detección y sistemas de clasificación basados en técnicas moleculares han reemplazado en gran medida los sistemas de clasificación biológicos tradicionales.

Detección por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los métodos basados en PCR desarrollados a finales de los 80's y principios de los 90's permitieron el mayor avance en el diagnóstico de enfermedades fitoplásmicas. El diagnóstico por PCR es mucho más sensible que las pruebas serológicas o hibridaciones DNA-DNA para la detección de fitoplasmas. Inicialmente los “primers” fueron diseñados con base en secuencias de fragmentos de DNA de fitoplasmas clonados y fueron usados para detectar fitoplasmas específicos (Jarausch *et al.*, 1994). Esta técnica permitió la detección de los fitoplasmas debajo título en el tejido vegetal en las que no había sido posible detectar por pruebas serológicas e hibridaciones DNA-DNA. Posteriormente se desarrollaron “primers” universales o grupo-específicos diseñados en la región 16S rRNA (Ahrens y Seemuller, 1992; Gundersen y Lee, 1992; Smart *et al.*, 1996). Esto permitió la amplificación de de secuencias dl 16S rDNA de un amplio espectro de cepas de fitoplasmas, convirtiéndose en el principal avance de la investigación en este campo. Posteriormente fueron diseñados otros “primers” sobre la región intergénica

16S-23S, el gen de la proteína ribosomal y el gen del factor de elongación EF-Tu (*tuf*) (Smart *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1997).

Clasificación de los Fitoplasmas

Los fitoplasmas, como no se han aislado en cultivo puro *in vitro*, ha sido difícil determinar sus caracteres fenotípicos útiles para su identificación y clasificación. Una solución parcial al problema ha sido la caracterización molecular de genes conservados, lo cual ha permitido la construcción de un esquema de clasificación independiente de los caracteres fenotípicos. Estudios recientes, basados en análisis filogenéticos de la región 16S rRNA y genes de proteínas ribosomales han confirmado la colocación apropiada de los fitoplasmas dentro de la clase de los *mollicutes* y ha permitido el reconocimiento de los fitoplasmas como una clada monofilética distinta dentro de esta clase (Davis y Sinclair, 1998).

Los primeros intentos para diferenciar y clasificar a los fitoplasmas se basaron en el conocimiento de propiedades biológicas como sintomatología, rango de plantas hospedantes y especificidad de transmisión por insectos vectores. En base a estas características se clasificaron en tres grandes grupos, agentes de declinamiento, proliferación y virescencia (Rojas-Martínez, 1999).

Con la introducción de los métodos moleculares tales como serología, hibridación de DNA y análisis de restricción de la región 16SrRNA, se ha

avanzado a pasos agigantados en la clasificación y identificación de fitoplasmas.

Inicialmente se reconocieron 9 grupos y 4 subgrupos mediante métodos serológicos y RFLP-PCR (Lee *et al.*, 1993). Posteriormente se han identificado 14 grupos, a los que se les han denominado 16Sr. El 16SrI, se incluye a los amarillamientos del áster, el 16SrII a los de la escoba de bruja del cacahuate, el III a la enfermedad X del durazno, el 16SrIV al amarillamiento letal del cocotero, el 16SrV al amarilla miento del olmo, el 16SrVI al de la proliferación del trébol, el 16SrVII al de amarillamientos cenizos. El 16SrVIII a la enredadera de esponja, el 16SrIX al de escoba de bruja del chícharo, el 16SrX a la proliferación del manzano, el 16SrXI al achatarramiento amarillo del arroz, el 16SrXII al storbur, el 16SrXIII al de virescencia de la teresita mexicana y el 16SrXIV a la hoja pequeña del pasto bermuda. También se han identificado por esta misma metodología o por lo menos 32 distintos subgrupos (Lee *et al.*, 1998).

Mediante análisis de la secuencia del 16S ribosomal (rDNA) y los genes de proteínas ribosomales se ha encontrado que los fitoplasmas comprenden una clada monofilética discreta que está más cercanamente relacionada a los acholeplasmas que a otros mollicutes (Gundersen *et al.*, 1994 y Seemuller *et al.*, 1998). De acuerdo a datos filogenéticos basados en las secuencias de la región del rDNA 16S, se pueden distinguir 20 subcladas (grupos) dentro de la clada *Phytoplasma*. Las subcladas de fitoplasmas se considera representan el equivalente a especies distintas bajo el estatus de especie taxonómica

provisional o candidata. Dentro de la mayoría de las subcladas es posible una posterior diferenciación mediante análisis de restricción (RFLPs) y otros métodos (Lee *et al.*, 2000).

Zebra Chip

El psillido *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Psyllidae) es el vector de la bacteria patógena que causa la Zebra chip (ZC), enfermedad en la papa. Recientemente ZC ha llegado a ser importante en papa durante su desarrollo y de los tubérculos destinados para la industria en Estados Unidos, México, Centro América y Nueva Zelanda (Gharalari *et al.*, 2009). El psillido que se alimenta de las hojas causa dos tipos de enfermedades: 1) amarillamiento de las hojas de la papa que impiden su crecimiento y reduce el tamaño de los tubérculos y 2) Zebra chip, que ha sido recientemente asociado con una nueva especie de *Candidatus Liberibacter*. Los tubérculos producidos de plantas de papa infectadas con ZC desarrollan un modelo de rayado de necrosis que se envuelve particularmente después de freír (Munyanzeza *et al.*, 2007 y Hansen *et al.*, 2008). ZC se ha vuelto un problema serio para los cultivos de papa, cuya producción es destinada a la industria; infecciones mayores del 20% de ZC, causan millones de dólares en pérdidas a productores de papa y empresas procesadoras (Secor and Rivera-Varas, 2004).

En los últimos años se ha observado un incremento importante de las poblaciones de *B. cockerelli*, el que se ha venido asociando a las enfermedades de punta morada de la papa y zebra chip en aéreas cultivas de papa de

Coahuila y Nuevo León. Ya que este cultivo es uno de los principales hospederos. De las enfermedades como la PMP asociada al manchado de los tubérculos de la papa y ambas, a la bacteria patogénica *Candidatus liberibacter solanacearum* de reciente descripción (Munyaneza, *et al.*, 2008). A las bacterias no cultivables reportadas como tales por su secuencia de genes ribosomales, se les designa como “Candidatus”. Algunos ejemplos de ellas son: *Candidatus liberibacter africanus*, *Candidatus liberibacter americanus* *Candidatus liberibacter asiaticus* y *Candidatus liberibacter solanacearum*.

Candidatus liberibacter solanacearum es una bacteria no cultivable, Gram negativa, que se aloja en los vasos conductores de la savia del floema de algunos géneros de plantas de la familia de las solanáceas y rutáceas. Su tamaño varía de 350-550 x 600-1500 nm y un grosor de 20-25 nm. Generalmente son cuerpos en forma de barra y pleomorficas durante su crecimiento, tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivales de su vector.

Candidatus Liberibacter spp

El género *Candidatus Liberibacter* es una bacteria perteneciente al grupo de las Gram negativas, a la subdivisión alfa proteobacteria (Bove, 2006 *et al.*, Jagoueix *et al.* 1996). Se pensaba que el género tenía tres especies que infectaban especies de *Rutaceae* (López and Frare 2008), que difiere en la especificidad del vector y tolerancia del medio ambiente (Bové, 2006):

- *Candidatus Liberibacter africanus* -- African Huanglongbing
- *Candidatus Liberibacter americanus* -- American Huanglongbing

- *Candidatus Liberibacter asiaticus* -- Asian Huanglongbing.

Sin embargo en Junio del 2008, en Nueva Zelanda se notifico que un nuevo "*Candidatus Liberibacter sp.*", afecto fuertemente a cultivos de tomate y chile en la Isla Norte. Este fue el primer informe confirmado de *Candidatus Liberibacter sp.* afectando a cultivos de la familia solanaceae (Liefting *et al.* 2008). Subsecuentemente, el psyllido que causa el amarillamiento en papa y tomate fue relacionado con la bacteria en los Estados Unidos, que fue descrito como "*Candidatus Liberibacter psyllaorous*" por Hansen *et al.*, 2008.

"*Candidatus Liberibacter psyllaorous*", transmitida por psillidos, causa la enfermedad amarillamiento en el cultivo de solanáceas y zebra chip tubérculos de papa.

Principales especies

Las principales especies de *Candidatus*, se da a continuación los nombres incluidos:

Liberibacter africanus.- Originándose en África y es el agente causal del Huanglongbing, también conocido como Greening, enfermedad en cítricos y como vector de esta enfermedad al psyllido *Tryoza erytraea*.

Liberibacter americanus.- Una nueva especie de Brasil descrita en el 2005 y asociada al Huanglongbing, conocida también como Greening, enfermedad en cítricos cuyo vector es el psyllido asiático *Diaphorina citri*.

Liberibacter asiáticos.- Originario de Asia y agente causal del Huanglongbing, conocido también como Greening, enfermedad en cítricos y el vector es el psyllido asiático *Diaphorina citri*.

Liberibacter europaeus.- Una nueva especie se describió en el 2010, encontrándose en árboles frutales de pera donde no parece causar ningún síntoma, cuyo vector es el psyllido *Cacopsylla pyri*.

Liberibacter psyllaourous.- Una nueva especie descrita en el 2008 en solanáceas, específicamente en cultivos de papa y tomate, y el vector es el psyllido, *Bactericera cockerelli*.

Liberibacter solanacearum.- Agente causal de zebra chip disease en papas y el vector es el psyllido de la papa y tomate, *Bactericera cockerelli*. Este sinónimo es más usado para a la preferencia de "psyllaourous".

(http://en.wikipedia.org/wiki/Candidatus_Liberibacter. Consultado el 6 de junio del 2011).

Sintomatología

Los síntomas son muy similares a los que causan los fitoplasmas; sin embargo, los más comunes asociados a este tipo de bacterias son necrosis en el floema, manchado de los tubérculos en papa, decoloración en la pulpa. En otros hospederos como los cítricos, estos organismos se restringe al floema (tubos cribosos) de las Rutáceas, produce clorosis de las nervaduras, enverdecimientos, aborto de semillas y ocasional moteado de las hojas u hojas amarillentas con moteado asimétrico, frutos irregulares, duros y con sabor amargo y semilla oscura; además de reducción del tamaño de las hojas y pecíolos erectos. En general, estos patógenos provocan efectos perjudiciales en plantas, provocando pérdidas económicas considerables; que van desde una reducción parcial en rendimiento y calidad hasta la pérdida total del cultivo.

Importancia económica de las enfermedades causadas por *Candidatus Liberibacter* spp.

Candidatus Liberibacter spp., está asociado principalmente a hospederos de la familia solanaceae y rutaceae, ya que son los hospederos de plantas alimenticias y cultivo frutícola más importantes que ataca este tipo de bacterias; la cual es transmitida por diferentes vectores, tales como *Tryoza erytreae*, *Cacopsylla pyri*, *Diaphorina citri* y *Bactericera cockerelli*. En los últimos 5 años se han identificado una gran diversidad de enfermedades causadas por especies de *Candidatus Liberibacter*, por los diferentes daños y síntomas que causan y que suelen ser una limitante en la producción de estos cultivos en cuanto a su calidad y valor económico en el mundo.

Transmisión y dispersión

El vector de la especie de *Candidatus Liberibacter solanacearum* es por el vector. La transmisión por el vector es circultiva. Se ha encontrado el patógeno en los huevecillos, lo cual deja abierta la posibilidad de que el patógena se transmita a la descendencia de este insecto. La forma de transmisión de *Candidatus* es persistente, y se puede realizar de un día para otro. De esta forma *Bactericera cockerelli* adquiere el patógeno de una planta enferma en 15-30 minutos y puede transmitirlo al día siguiente, también en unos cuantos minutos.

Las especies de *Candidatus Liberibacter*, que causan enfermedades en solanáceas son parásitos obligados que habitan el floema de la planta, al igual

que los fitoplasmas, se dispersan principalmente por insectos chupadores pertenecientes a las familias Psyllidae y Cicadellidae (Munyanza, *et al.*, 2006). Los insectos adquieren el patógeno al alimentarse de tejidos del floema de una planta enferma y posteriormente los transmiten a plantas sanas. Se desconoce si este tipo de bacterias invernan en insectos vectores así como en plantas perennes que pueden servir como reservorios de este tipo de bacterias.

El movimiento a cortas o largas distancias, se efectúa comúnmente cuando no se tienen medidas cuarentenarias estrictas. El material infectado puede ser introducido a través del intercambio de semillas, intercambio internacional de germoplasma tales como injertos, varetas, yemas, portainjertos y tubérculos, a nuevos lotes o nuevas regiones geográficas donde la vegetación nativa y las especies vectores son diferentes de la región de donde este tipo de bacterias fueron inadvertidamente transportados.

Detección molecular

La detección de *Candidatus Liberibacter* sp., está basado por la técnica de PCR, utilizando primers específicos para este tipo de patógenos y la especie definida en base al hospedero de la muestra a analizar. Inicialmente los “primers” fueron diseñados con base en secuencias de fragmentos de DNA de *Candidatus Liberibacter* que se detectaron en su vector *Bactericera cockerelli* (Hansen *et al.*, 2008). Gracias a las técnicas moleculares se ha logrado detectar la presencia de esta bacteria en vectores y de plantas de las familias solanáceae y *Rutaceae* (Hansen *et al.*, 2008; López and Frare 2008). Finalmente con la técnica de PCR se logro la amplificación de la secuencias del

16S rDNA y posteriormente se lograron diseñar primers sobre la región intergénica 16S-23S (Hansen *et al.*, 2008).

Cuantificación de enfermedades

Las formas más comunes de cuantificar una enfermedad es evaluando la incidencia y severidad (Zadoks and Schein, 1979; Seem, 1984; Campbell and Madden, 1990).

La incidencia es el porcentaje o proporción de plantas enfermas dentro de una unidad de muestreo (población), es una medida cuantitativa, rápida y sencilla que es generalmente más precisa y reproducible que otras mediciones cuantitativas (Zadoks and Schein, 1979; Seem, 1984).

Severidad es la cantidad de enfermedad que afecta las entidades (área foliar) dentro de una unidad de muestreo (población de plantas). La medida de severidad es más sencilla cuando se expresa como proporción o porcentaje de la unidad de muestreo usando unidades de mediciones directas o estimaciones indirectas como claves o escalas (Zadoks y Schein, 1979; Seem, 1984).

Las escalas están expresadas en números, son descripciones verbales y numéricas de rangos de severidad; en si la función de la escala es simplificar las cosas.

La necesidad de cuantificar las enfermedades ha sido reconocida como requisito para realizar estudios regionales, epidemiológicos y para la estimación de pérdidas (Gaunt, 1987; Kranz, 1988).

La medición de la enfermedad es usada para cuantificar el desarrollo de las epidemias en el tiempo y espacio, para el análisis de los factores que afectan el desarrollo de una enfermedad, para medir la resistencia en plantas y la eficiencia (poco tiempo) de pesticidas, como base para la predicción de enfermedades y rendimiento y para la definición de umbral para programas de manejo (Gaunt, 1987).

Cuantificación del patógeno

La cuantificación del patógeno nos sirve para evaluar tratamientos, para hacer pruebas de inoculación con propósito de diagnóstico o resistencia. También sirve para hacer estudios epidemiológicos como son: para determinar dinámica de poblaciones (para ver su variación con respecto al tiempo), para determinar la capacidad de dispersión del patógeno o para determinar la relación del patógeno-ambiente-enfermedad, con la finalidad de hacer sistemas de predicción y un mejor manejo de la enfermedad.

Cuantificación de las condiciones ambientales

Es muy importante cuantificar las condiciones ambientales ya que nos sirve para establecer la relación: a) Condiciones ambientales-patógeno o vector-enfermedad-hospedero y con esto hacer un mejor criterio para el manejo

de la enfermedad, así mismo es información básica para desarrollar sistemas de predicción, modelos de simulación o establecer criterios de aplicación de algún producto químico. b) Para establecer la relación: Condiciones ambientales- desarrollo del hospedero para generar información de predicción o estimación de pérdidas. c) Para establecer estrategias de control diferentes a la aplicación de pesticidas, por ejemplo fechas de siembra (en base a las condiciones ambientales menos favorables al patógeno) o para definir frecuencia y tipo de riego (este afecta directamente a la variable humedad). Este criterio esta relacionado con la humedad relativa y el suelo.

Al cuantificar el medio ambiente debemos tener claro nuestro objetivo y debemos tener conocimiento básico de la biología del patosistema en estudio. Esto nos va ayudar a definir donde cuantificar, con que frecuencia cuantificar y cuando cuantificar el clima.

Análisis de epidemias

Una epidemia puede definirse como un cambio en la enfermedad con el tiempo y espacio cuya descripción fundamental se muestra a través de la curva de progreso, la cual expresa la interacción del patógeno, hospedero y ambiente a través del tiempo (Campbell y Madden, 1990; Chaube and Singh, 1991; Kranz, 1974; Madden, 1980).

El progreso de la enfermedad en el tiempo es probablemente el primer paso para describir una epidemia, ya que el control de enfermedades

comúnmente se dirige a la prevención de un incremento en la enfermedad (Vander Plank, 1963).

Es por ello que la curva del progreso de la enfermedad es considerada como una representación gráfica de una epidemia que posee ciertas características definibles (Campbell, *et al.*, 1980) y ofrece una oportunidad para analizarla, compararla y comprenderla (Campbell and Madden, 1990; Chaube and Singh, 1991), llegando a proporcionar información valiosa concerniente a las relaciones entre los componentes de un sistema epidémico (Campbell *et al.*, 1980).

Para analizar el progreso de las enfermedades en el tiempo se han utilizados diferentes modelos matemáticos, de tal manera que las epidemias pueden ser clasificados de acuerdo al modelo que asegure el mejor ajuste de la curva a los valores de enfermedad observados (Kranz, 1974; Madden, 1980; Campbell and Madden, 1990; Chaube and Singh, 1991).

Una herramienta útil en el análisis de las epidemias es la comparación cuantitativa mediante la linearización de sus curvas de progreso, o que permite comparar diferentes características de la epidemia como el inicio, la tasa de crecimiento, la existencia y duración de una asíntota y el máximo nivel de enfermedad (Kranz, 1974; Campbell *et al.*, 1980).

Importance of *Bactericera cockerelli*, *Empoasca* spp y *Macrosteles* spp for Potato Purple Top Epidemic.

Gustavo Alberto Frías-Treviño, Vidal Hernández-García¹, and Luis Alberto Aguirre-Uribe, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Depto. de Parasitología Agrícola, Apdo. Postal 342, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315. Correspondencia: gfrias@yahoo.com, vidalhg@gmail.com, luisaguirreu@yahoo.com.mx
¹Graduate student

Abstract. Incidence of Potato Purple Top (PPT), populations of its vectors; the Psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homóptera: Psyllidae) and leafhoppers (*Empoasca* spp and *Macrosteles* spp), were monitored in 3 production sites and 4 crop cycles (2004-2007) in the potato growing region of Coahuila and Nuevo León, México. There is a lineal relationship between the annual incidence of PPT, populations of *B. cockerelli* and leafhoppers. Results show the importance of these vectors in PPT dissemination in this region. Planting dates before the middle of May, are exposed to higher populations of vectors. The least risk of disease spread occurred when the potato plant emerges between June and July, when populations of these insects are relatively low. Vectors arrival to the production sites not always coincides with disease outbreak, which suggests that seed potatoes are the main initial source of inoculum for potato purple top epidemic.

Key words: Potato purple top, vectors, source of inoculums

INTRODUCTION

Transmition of Potato Purple Top (PPT) by *B. cockerelli* and *Carsidara* spp, (Homóptera: Psyllidae) (Vargas, 2005; Salas, 2006; Munyaneza, *et al.*, 2006) and by the leafhoppers *Circulifer tenellus* (Baker) y *Empoasca* spp (Lee, *et al.*, 2004; Almeyda *et*

al., 2004; Sánchez, 2004; Vargas, 2005; Salas, 2006; Munyaneza, *et al.*, 2006) has been reported. In the states of Coahuila and Nuevo León, PPT is considered a limiting factor in potato production due to its high disease incidence and its effect on tuber quality that become unacceptable for shipping industry and table stock standards (García-Quijano, 1996; Cadena-Hinojosa, 1996). In the region, disease damage from 2004 to 2007 was 50 % to 100 % (Santiago, 2004; Flores, 2004; Hernández, 2006). Vectors are monitored throughout the year with sticky traps; and data is published in a web page <http://www.fpcoahuila.org/> to help producers with decisions taking on pesticide applications. However, the importance of each vector for introducing or spreading PPT in the crop has not been established, although this information is essential for developing a disease management strategy. This research has the objective of evaluating the importance of insect vectors in the introduction and spread of PPT by monitoring vectors population and disease incidence.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Research was carried out at el Tunal, Arteaga Coahuila; San Rafael and el Cristal, Galena, Nuevo León, from 2004 to 2007. Selection of sites was made considering their distance to a weather station and prevailing environmental conditions so that differences among sites were significant. Weather stations are part of a net belonging to Fundación Produce Nuevo León and Coahuila.

Sampling of vectors and climatic data. Three yellow sticky card traps were put in each sampling location, 10 m from the crop, at canopy level. Traps were checked and changed weekly according to Zavala (2002) y Nava (2002) recommendations. Maximum and minimum temperatures were registered in the weather stations.

Incidence. Percentage of potato purple top was evaluated systematically during the epidemic. A systematic sampling in a W shaped transect per plot at five plant physiological stages: green furrow (SG), close furrow (SC), flowering (F), maturity (M) and harvest (H). Nine points were sampled at a rate of 10 plants to complete 90 plants per lot. At each sampling date, the percentage of plants with PPT symptoms was quantified.

Statistical Analysis. Disease progress curves (percentage of disease against time) were graphed for every year 2004 – 2007. These graphs were used to calculate area under disease progress curves (AUDPC) according to Van der Plank (1963) and Campbell and Madden (1990). A regression analysis between AUDPC and insects trapped per each of the four years was performed to evaluate the importance of insect population on disease spreading.

Potato Purple Top-vectors population, *Bactericera cockerelli*, and leafhoppers (*Empoasca* spp y *Macrostelus* spp.) was plotted against time for each growing cycle for each of the three experimental plots. Se graficó la fluctuación poblacional para cada ciclo de cultivo, con el número total de insectos capturados quincenalmente de en las tres localidades de estudio (Fig. 1, 2); total PPT-vector population in all three experimental plots and four crop cycles was also plotted against time (Fig 3). Total PPT-vector population in each experimental plot was plotted to examine consistency of population peaks (Fig 4). The relationship between vector population and disease incidence was graphically compared among the experimental sites and among growing cycles (Fig. 6).

RESULTS

Insect Population Fluctuation. Number of *B. cockerelli* adults captured in the 3 production fields and crop cycles analyzed in this research varied very from one year to another; the higher population of this insect occurred in 2004 and 2007. One population peak was detected every year between March and May. A second peak was evident only in 2004 in June to August (Fig. 1).

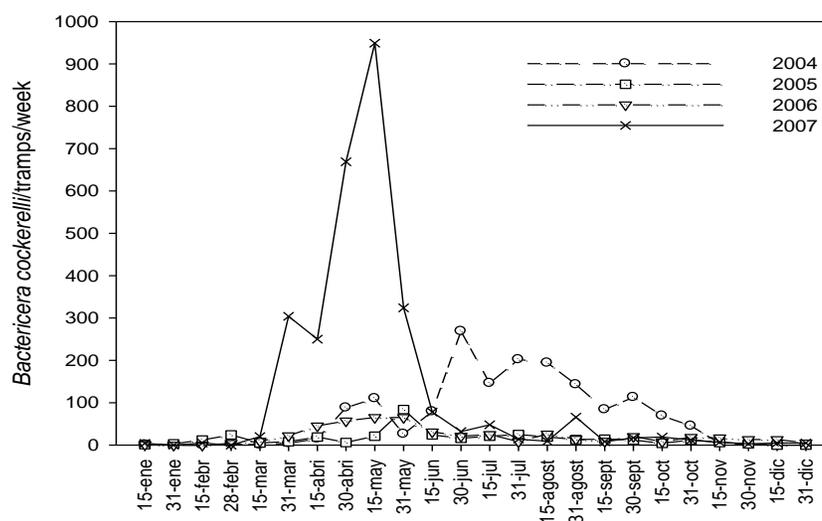


Fig. 1. Number of *Bactericera cockerelli* adults per trap per week in 3 production fields during 2004 to 2007 in Coahuila and Nuevo León.

Number of leafhoppers captured in the three production sites and 4 crop cycles, also varied very from one year to another. As in the case of psyllid, populations of leafhoppers were higher in years 2004 and 2007 with respect to 2005 and 2006. A second population peak was detected in September to November (Fig. 2).

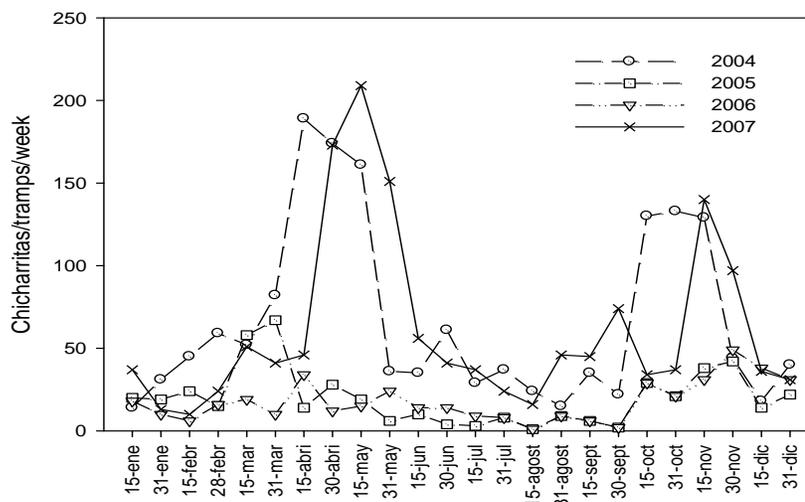


Fig. 2. Numbers of leafhoppers per trap per week in 3 lots of production in 4 crop cycles (2004 to 2007) in the potato growing areas of Coahuila y Nuevo León.

The average numbers of *B. cockerelli* captured per trap per week in all lots and crop cycles was significantly higher than average of leafhoppers (Fig. 3). Both vector species had the first population picks from March to May. *B. cockerelli* had a second peak in June-August, while leafhoppers had a second peak in October-November 2004-2007 (Fig. 3).

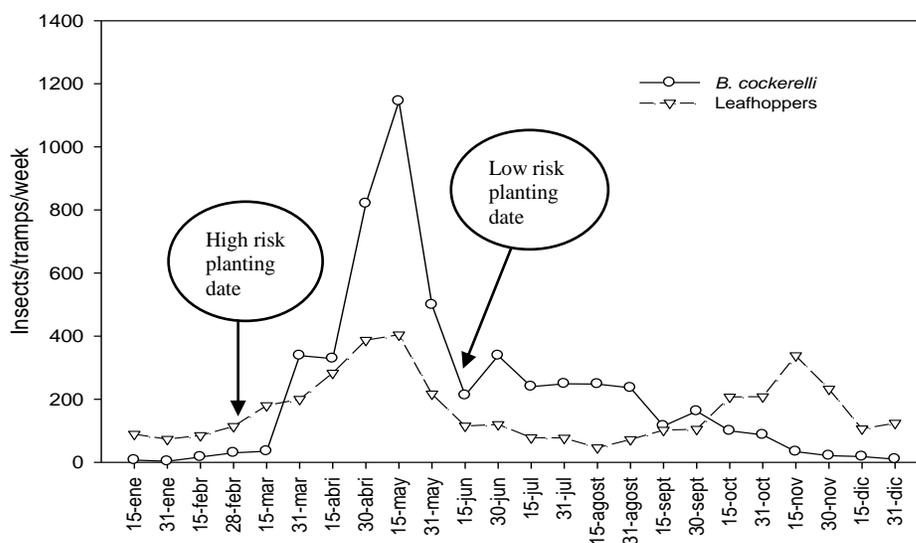


Fig. 3. Average number of adults of *Bactericera cockerelli* and leafhoppers, in three lots in 4 production cycles (2004-2007) in the potato growing area of Coahuila y Nuevo León.

A difference in the average (4 production cycles) number of adult vectors of PPT was observed among the 3 production sites. San Rafael, Galeana N.L. had the higher population of insects and el Cristal had the lowest. The first population peak was observed from March to May (Fig. 4).

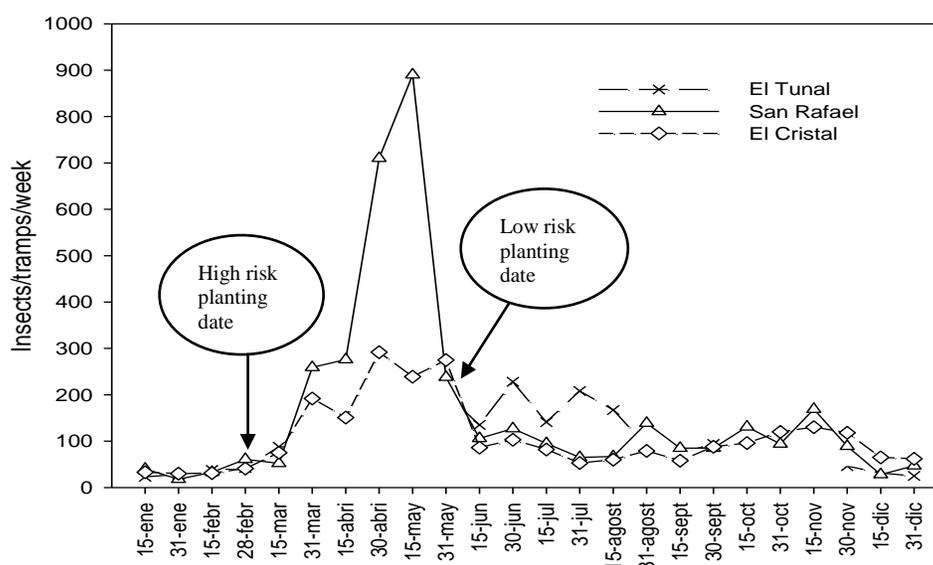


Fig. 4. Average number of *Bactericera cockerelli* and leafhoppers in three production sites and 4 crop cycles (2004-2007) in the potato growing areas of Coahuila y Nuevo León, México.

Potato Purple Top incidence and insect population relationship. Disease incidence in each crop cycle, expressed as the area under the curve of epidemic development (AUDPC), was directly and significantly related to the numbers of vectors captured per crop cycle ($P > 0.01$; $r^2 = 0.96$ for Psillid and 0.77 for leafhoppers), as shown in Fig. 5.

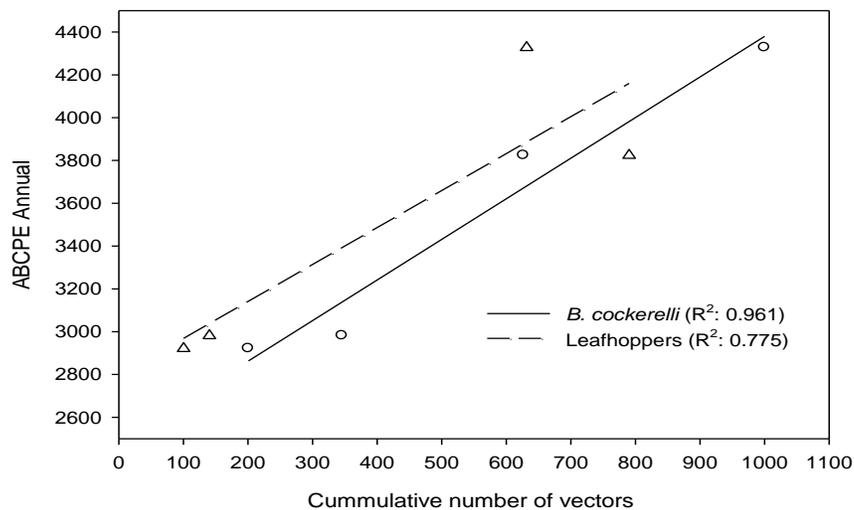
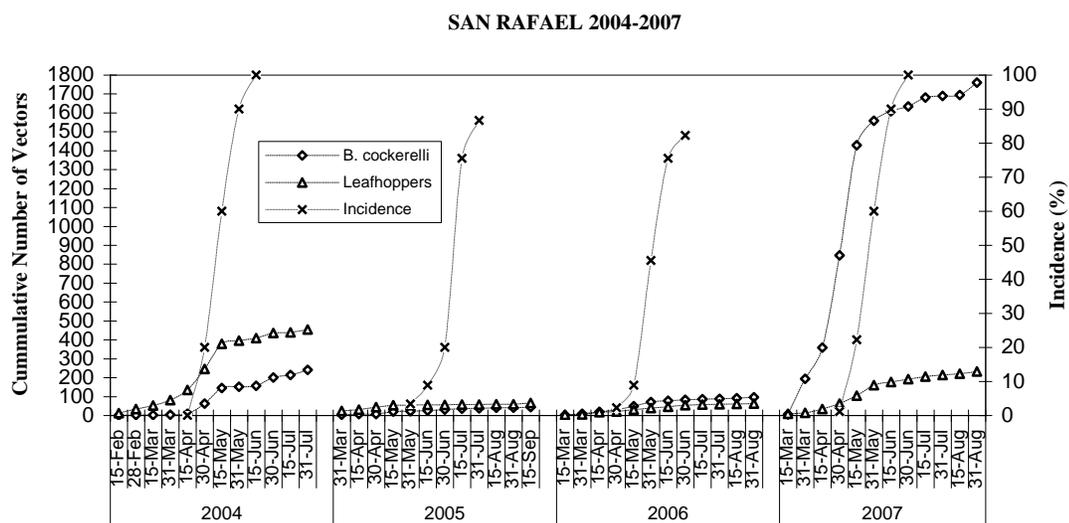
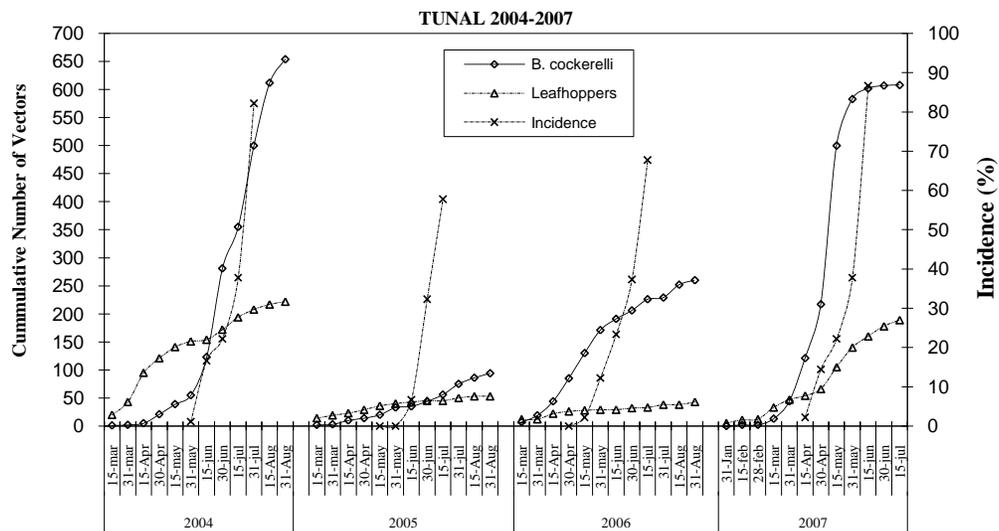


Fig. 5. Relationship between annual incidence (2004-2007) of Potato Purple Top (Area Under Disease Progress Curve) and the annual average number of vectors in three production sites in Coahuila y Nuevo León.

Disease development and number of trapped insects (vectors) in the three production sites during the 4 years period, was very different among sites. San Rafael was the site with the higher disease incidence and number of PPT vectors every year followed by el Tunal and el Cristal (Fig. 6).



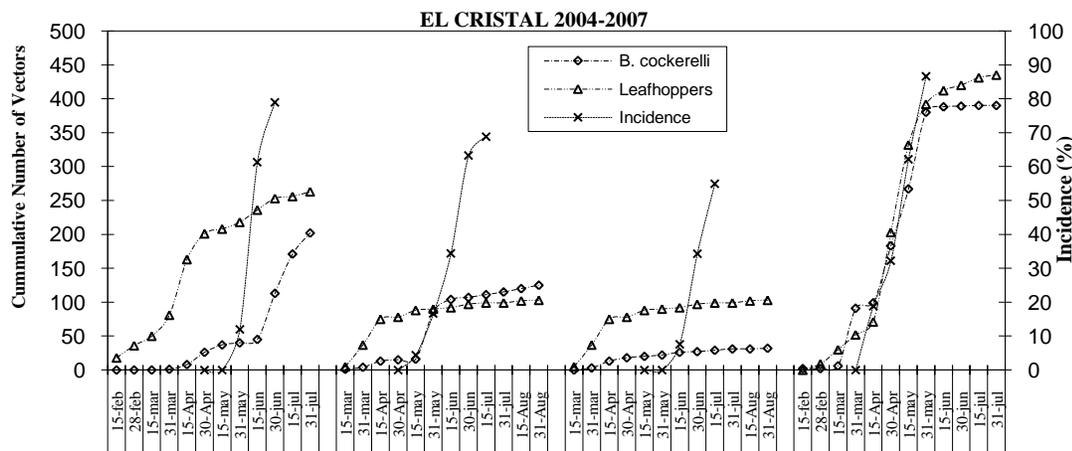


Fig. 6. Disease incidence and cumulative insect vectors in three production sites and 4 crop cycles (2004 al 2007) in the potato growing areas of Coahuila y Nuevo León.

DISCUSSION

There is a highly significant relationship between insect vectors populations and disease incidence during the crop cycle. This supports the important role that *Bactericera cockerelli*, and leafhoppers (*Empoasca* spp y *Macrosteles* spp.) play in the spread of the disease. There are reports of PPT transmission form infected to healthy plants by *B. cockerelli*, *Carsidara* spp. y *Circulifer tenellus*, *Orosius* spp. (Lee, *et al*, 1998; Lee, *et al.*, 2004; Salas, 2006; Munyaneza, *et al.*, 2006). Other leafhoppers (*Macrosteles fascifrons*, *Macrosteles divisus*, *Aceratagallia* spp) and the psyllid (*Heteropsylla texana*) are reported as positive to PPT phytoplasm (Macleod, 1954; Maramorosch, 1998; Beres *et al.*, 1998; Sánchez, 2004; Almeyda, *et al.*, 2005; Vargas, 2005; Ramírez y Ramos, 1978), but their habilty to transmit the disease from disease to healthy plants has not been demonstrated. In this research, *Carcidara* spp. was not found in the potato crop, thus, their importance for the spread of the disease is questionable, even though the specie has been reported associated whit host-weeds in the area (Salas, 2006).

Planting potato crops by the end of May play an important role in management of the PPT disease, due to reduction in exposure time to vector population-peaks. The least PPT risk may occur when potato plants emerge during June and July when *B. cockerelli* and plant hoppers populations are low. Sites where disease and PPT vector population are lower may also have lower crop losses risk.

CONCLUSIONS

There is a direct relationship, highly significant, between the annual incidence of PPT and the populations of *Bactericera cockerelli*, *Empoasca* spp. and *Macrosteles* spp. in the potato growing areas of Coahuila and Nuevo León. Based on the results of this research, the disease is introduced to the crop through the seed-tubers and from there, it is spread by the insects. Symptoms appeared 40 to 50 days after plant emergence and the higher populations of PPT vectors occurred from March to May.

ACKNOWLEDGMENTS

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Coahuila (**CESAVECO**) y Fundaciones Produce (Coahuila y Nuevo León), por su autorización en la utilización de algunos datos de factores bióticos y abióticos.

REFERENCES CITED

- Almeyda, L. I. H. 2005. Detección de fitoplasmas en insectos y malezas asociadas al cultivo de la papa en el noreste de México. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Fitopatología/VIII Congreso Internacional de Fitopatología. Manzanillo, Colima, México. Resumen C-135.
- Almeyda, L. I., J. A. Sánchez y J. A. Garzón. 2004. Detección molecular de fitoplasmas en papa. En memorias del Simposio punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila. pp. 4-13.

- Becerra, F. A. 1989. Biología de *Paratrioza cockerelli* Sulc. y su relación con la enfermedad “permanente del tomate” en el Bajío. Tesis de Licenciatura en Química Agrícola. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 55 p.
- Béres, M., Zavala S., M.E., Ríos B. M., Marin J. A., Rocha R., Leal K. D. S. y Martínez S. J. P. 1998. Etiología y ecología del agente causal de los síndromes “Bola de Hilo” y “Punta Morada” papa en México. Memorias del segundo simposium internacional de la Papa. Toluca, México. p.3.
- Campbell, C.L. and Madden L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons Inc. 532 p.
- Flores, T.L.M. 2004. Virus del enrollamiento de la hoja de la papa y su detección en el síndrome de punta morada. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 58 p.
- García-Quijano, J.R. 1996. Etiología y transmisión del obscurecimiento del tubérculo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) para industria. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado. de México. 65 p.
- Hernández, G. V. 2006. Factores abióticos y su relación con el síndrome de punta morada de la papa. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 62 p.
- Lee, I.-M., K. D. Bottner, J. E. Munyaneza, G. A. Secor, and N. C. Gudmestad. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. Plant Dis. 88: 429.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., and Assunta Betaccini. 1998. Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology*, 88, 1359-1366.
- Macleod, D.J.1954. “Aster yellow (Purple-Top) of Potatoes”.American Potato Journal. 31: 119-128.
- Maramorosch, K. 1998. Current status of potato purple top wilt. International Journal of Tropical Plant Diseases 16:61-72.
- Munyaneza, J.E., J.M. Crosslin, and J.E. Upton. 2006. The beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. J. Econ. Entomol. 99: 268-272.
- Nava, C. U. 2002. Muestreo, Monitoreo y Umbrales Económicos del Psíllido del Tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc), Memoria, Taller sobre *Paratrioza cockerelli* (Sulc).

Como Plaga y Vector de Fitoplasmas de Hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México. pp. 57-77.

- Ramírez, M.M., y Ramos, E. J., 1978, Poblaciones de chicharritas (Homoptera-Cicadellidae) en 12 variedades de papa en Chapingo, México, y su posible relación con la enfermedad de punta morada. *Agrociencia* 33:89-90.
- Sánchez, S. J.A. y Almeida, L. I. H. 20004. Diagnóstico de las especies de vectores y su interrelación con el fitoplasma agente causal de la enfermedad punta morada en las regiones paperas de Coahuila y Nuevo León. En memorias del Simposio punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila. pp. 14-23.
- Santiago, C.V. 2004. Epidemiología de la punta morada de la papa en la región sur de Coahuila y Nuevo León, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 51 p.
- Salas-Marina, M. A., A. Flores-Olivas, A. Sánchez-Arizpe, O. García-Martínez, I. H. Almeida-León, and J. A. Garzón-Tiznado. 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de fitoplasma de la punta morada de la papa., pp. O-1. *In Memoria de XXII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa*, 30 Julio-4 Agosto 2006. ALAP, Toluca, México.
- Van der Plank, J.E. 1963. *Plant diseases: Epidemics and control*. Academic Press. New York. 349 p.
- Vargas, C. I. 2005. Especies y fluctuación poblacional de cicadelidos y psillidos positivos a fitoplasma en el cultivo de la papa y malezas aledañas en Arteaga, Coahuila. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista. Saltillo, Coahuila, México. 52 p.
- Zavala, Q. T. E. 2002. Experiencias en el Valle de Toluca sobre Punta Morada. Memorias del XI Congreso Nacional de la Papa. León Guanajuato, México. pp. 81-97.

**Importancia de la Semilla-Tubérculo y la Maleza *Licium berlandieri* para la
Epidemia de Punta Morada de la Papa Punta Morada de la Papa**

**(Importance of the Seed-tuber and the Overgrowth *Licium berlandieri* for the
Potato Purple Top Epidemic)**

Vidal Hernández-García*, Gustavo Alberto Frías-Treviño, Luis Alberto Aguirre-Uribe, Alberto Flores-Olivas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Depto. de Parasitología Agrícola, Apdo. Postal 342, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315; **Isidro Humberto Almeyda-León**, INIFAP Campo Experimental General Terán, Carr. Montemorelos-China km. 31, General Terán, Nuevo León, México. CP 67400. Correspondencia: gfriast@yahoo.com.mx

*Estudiante de Postgrado

Resumen. La incidencia de Punta Morada de la Papa (PMP) fue menor conforme se incrementó la distancia a partir de una FI (plantas de papa infectadas). Se estimó que la distancia máxima de dispersión de PMP a partir de una FI es 80 a 100 m. El rendimiento varió de 12,478 kg/ha en las plantas cercanas a la FI hasta 24, 203 kg/ha en las plantas ubicadas a 50 m de distancia de la FI. Las pérdidas causadas por PMP se incrementaron linealmente conforme se redujo la edad de la planta en la que se observaron los primeros síntomas de PMP. No se encontraron evidencias de que el cilindrillo (*Licium berlandieri*) infectado con PMP sea una FI para la epidemia. En contraste, la semilla tubérculo resultó ser una importante FI. *Candidatus* Liberibacter y el Fitoplasma PMP fueron detectados por PCR en las plantas con síntomas de PMP. Con base en estos resultados es fundamental sembrar semilla tubérculo libre del patógeno, mantener un área de 80-100m alrededor de la parcela libre de hospederos (v.g. papa mostrenca) e insectos vectores de la PMP, así como vigilar y proteger estrictamente al cultivo de los vectores durante los primeros 40 días después de la emergencia.

Palabras clave: Fitoplasmas, Zebra chip, Gradiente, Psílido.

Abstract. Potato purple top (PMP) incidence decreased as distance from an inoculum source (infected potato plants) increased. Maximum dispersion distance from the inoculum source (IS) was 80-100m. Yield was 12,475 kg/ha in plots close to IS and 24,203 kg/ha in plots 50 m from the IS. Yield losses by PMP increased linearly as age for PMP symptoms appearance decreased. No evidence was found to consider *Lycium berlandieri* plants infected with PMP as IS for the epidemic. On the other hand potato seed tubers were found to be important as IS. *Candidatus Liberibacter* and PMP Phytoplasma were detected by PCR in plants with PMP symptoms. According with this research, it is fundamental to plant disease free seed-tubers, control host plants (potato volunteers) and PMP vectors 80-100m around the plot, strictly monitor and control PMP vectors during the first 40 days after plant emergence.

Additional keywords: Phytoplasmas, Zebra chip, Gradient, Potato psyllid

INTRODUCCION

En la región papera de Coahuila y Nuevo León, la Punta Morada de la Papa (PMP), es la principal limitante de la producción de éste cultivo (Flores y Lira, 2008). En los últimos años la incidencia de la PMP se ha mantenido entre el 40 al 80%, (CESAVECO, 2009), tomando mayor importancia en la calidad de los tubérculos por el manchado interno que produce y que los hace inadecuados para la industria y para uso como semilla (Cazares-Méndez *et al.*, 2004; Munyaneza *et al.*, 2006). Martínez *et al.*, (1999) y Leyva-López *et al.*, (2002), reportan que el agente causal de la PMP son Fitoplasmas. Munyaneza *et al.*

(2008), Hansen *et al.*, (2008), Almeyda-León *et al.*, (2009) y Munyaneza *et al.*, (2009), indican que el principal agente causal de la PMP es la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae*.

El fitoplasma y la bacteria pueden ser transmitidos por el psillido *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), de acuerdo con los resultados de investigaciones realizadas en México y Estados Unidos de América (Leyva-López *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2004; Lee, *et al.*, 2006 ; Munyaneza *et al.*, 2007; Munyaneza *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2008), adicionalmente se ha reportado que el fitoplasma de la PMP se puede transmitir por las chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae), (Munyaneza, *et al.*, 2006; Almeyda, *et al.*, 2008; Flores y Lira 2008). Actualmente, la PMP se maneja con numerosas aplicaciones de plaguicidas para controlar a los insectos vectores; sin embargo, aún con este manejo es frecuente el registro de altas incidencias de la enfermedad y cuantiosas pérdidas. Se desconoce cuál es la principal fuente de inóculo (FI) primario a partir de la cual se inicia la epidemia, cual es la distancia máxima a la que puede dispersarse la enfermedad, cual es el período de incubación en campo y cuáles son los períodos críticos en los que el cultivo debe protegerse para reducir las pérdidas causadas por PMP. Los objetivos de esta investigación fueron: a) estimar la capacidad de dispersión de la PMP a partir de semilla tubérculo y la maleza (*Lycium berlandieri* Dunal) infectadas con el Fitoplasma de la punta morada y la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., b) evaluar la importancia de la semilla tubérculo y la maleza *Lycium berlandieri* como FI primario, c) determinar el período de incubación de la enfermedad en campo y d) evaluar el efecto de la enfermedad punta morada de la papa en el rendimiento en plantas infectadas en diferentes etapas de desarrollo.

MATERIALES Y METODOS

Localización de las parcelas experimentales. El trabajo de investigación se llevo a cabo en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), denominada el Bajío, durante los ciclos de primavera-verano, 2007, 2008 y 2009. El Bajío se encuentra situado al N 25° 21.534' y al O 101° 2.395', tiene una temperatura promedio anual de 19 °C y una precipitación de 339 mm.

Diseño experimental. En el ciclo 2007, se sembraron, minitubérculos de papa variedad Gigant libres de PMP en una parcela de 6 surcos de ancho y 50 m de largo. Como FI se sembraron en el borde de la parcela, 6 surcos de 3 m de largo con tubérculos var. Atlantic provenientes de un cultivo con 100% de incidencia de PMP. Esta semilla-tubérculo se sembró 12 días antes de sembrar los minitubérculos, de tal manera que el inóculo estuviera disponible durante toda la etapa de desarrollo del cultivo. En el ciclo 2008, la siembra se repitió pero sin sembrar FI y utilizando la variedad Gigant. En el ciclo 2009, se repitió el experimento, usando como FI la maleza *Lycium berlandieri* infectada con la bacteria y sembró la variedad Fianna. Las plantas de *Lycium berlandieri* se seleccionaron en el ciclo 2008 en la región papera de Nuevo León por estar fuertemente infestada con psilidos y se sembraron al borde de la parcela en abril de ese mismo año, para inducir su infección natural con fitoplasma y/o bacteria y utilizarla como FI para el ciclo 2009, no sin antes corroborar mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la presencia de fitoplasma y/o bacteria.

Gradiente de enfermedad y su relación con el rendimiento. Para determinar la importancia de la semilla tubérculo (ciclo 2007) y la maleza cilindrillo (ciclo 2009), como fuentes de inóculo para el inicio de la epidemia de PMP, se evaluó la incidencia de

la enfermedad en 5 etapas de desarrollo del cultivo: surco verde (30 días después de la emergencia (DDE), surco cerrado (57 DDE), floración (73 DDE), madurez (85 DDE) y cosecha (100 DDE). La incidencia se determinó en las plantas adyacentes a la FI y a cada 10 m a partir de la FI, hasta los 50 m. Se examinaron 10 plantas adyacentes a la FI y a cada 10 metros hasta los 50 m; se evaluó la presencia o ausencia de síntomas de PMP y se calculó el porcentaje de plantas enfermas. Se calculó el porcentaje de plantas infectadas con fitoplasma y bacteria, y se graficó contra la distancia de la fuente de inóculo para determinar si existía un gradiente de infección y por lo tanto un efecto de la fuente de inóculo sobre la incidencia de plantas enfermas con infectadas con el fitoplasma y la bacteria.

Al final del ciclo de cultivo 2007, se cosecharon los tubérculos de 18 plantas en cada una de las distancias (0-50m) en las que se evaluó la enfermedad. Se calculó el peso promedio por planta y se multiplicó por 16750 plantas por hectárea, para estimar el rendimiento a cada distancia evaluada. Estos datos se usaron para calcular el rendimiento por hectárea y para evaluar la relación entre la edad en que la planta se enferma (aparición de síntomas) y el rendimiento. También se determinó la fecha en la que aparecieron síntomas de PMP a cada distancia (0-50m) y se graficó contra las pérdidas causadas por la enfermedad para determinar la relación entre la edad de la planta en la que aparecen los síntomas y el porcentaje de pérdidas en rendimiento. El porcentaje de pérdidas se calculó con base en la producción de las plantas más lejanas a la fuente de inóculo y que no presentaron síntomas de PMP durante el ciclo de cultivo. El rendimiento por hectárea se estimó como se explicó previamente.

En el ciclo 2008 se evaluó la incidencia de la enfermedad en una parcela con las características descritas en la sección de diseño experimental, sembradas con

minitubérculos pero en las que no se colocó ninguna fuente de inóculo. Se examinaron 10 plantas adyacentes al borde de la parcela y cada 10 metros hasta los 50 m; se evaluó la presencia o ausencia de síntomas de PMP y se calculó el porcentaje de plantas enfermas.

Gradiente de infección por fitoplasma ciclo 2007 y 2009. Se tomaron muestras de follaje de 10 plantas cada 10 m de distancia de la FI y en cada una de las 5 etapas fenológica del cultivo. Se extrajo el ADN de cada una de las plantas muestreadas, y se determinó la presencia del fitoplasma de la PMP y/o *Candidatus Liberibacter* spp. mediante PCR. La extracción del ADN y las pruebas de PCR se realizaron en los laboratorios de Parasitología Molecular de la UAAAN y de la Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular del INIFAP. La extracción de ADN se realizó utilizando la metodología descrita por Almeyda *et al.* (2008). La detección de los patógenos se realizó mediante PCR en su modalidad de PCR-Secuencial. En el primer ciclo de amplificación se utilizó el par de iniciadores P1/P7 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'/5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3')(Smart *et al.*, 1996) y en el segundo ciclo se utilizó el par de iniciadores R16mF2/R16mR1 (5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'/5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3') (Gundersen *et al.*, 1996). Las PCR's se realizaron de acuerdo a lo reportado por Almeyda *et al.*, (2004), en un volumen final de 25 µl conteniendo 2.5 µl de buffer de PCR (1X), 1 µl de MgCl₂ (2 mM), 2 µl de cada nucleótido (200 µM), 2 µl de cada primer (0.5 µM), 2 µl de DNA (50 ng) y 0.3 µl de DNA Taq-Polimerasa (1.5 U). Las PCR's se realizaron en un termociclador MJ Research. Para los iniciadores P1/P7 las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por dos minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineamiento a 55 °C

por un minuto, extensión a 72 °C por un minuto y 30 segundos y un ciclo final a 72 °C por 10 minutos. En el segundo ciclo de amplificación se realizó una dilución 2:40 del primer ciclo de amplificación y se utilizaron 2µl como DNA molde, las condiciones del termociclador fueron las mismas que en el primer ciclo de amplificación, con la variante de que la temperatura de alineamiento fue de 50 °C por 30 segundos.

Gradiente de infección por *Candidatus Liberibacter* spp. durante los ciclos 2007 y 2009. Las extracciones de ADN utilizadas para la detección de fitoplasmas también fueron usadas para detectar la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. Se utilizaron tres pares de iniciadores: Lp Frag 1-25F/Lp Frag 1-427R, Lp Frag 3-1024F/Lp Frag 3-1686R y Lp Frag 4-1611F/Lp Frag 4-480R, diseñados sobre la secuencia del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de *Candidatus Liberibacter* spp (Hansen, *et al.*, 2008). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por tres minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 65 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por un minuto y un ciclo final a 72 °C por 10 minutos. Los fragmentos amplificados fueron fraccionados en geles de agarosa al 1.5%, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizó en una cámara de luz ultravioleta. Los fragmentos amplificados con los iniciadores Lp Frag 1-25F/Lp Frag 1-427R (400 pb), fueron purificados con el Kit comercial Rapid Gel Extraction System (Marligen Bioscience) y se secuenciaron directamente en ambas direcciones. Se calculó el porcentaje de plantas infectadas con la bacteria y se graficó contra la distancia de la fuente de inóculo para determinar si existía un gradiente de infección y por lo tanto un efecto de la fuente de inóculo sobre la incidencia de plantas infectadas con la bacteria.

Gradiente de infecciones mezcladas de Fitoplasma y *Candidatus Liberibacter* spp. durante los ciclos 2007 y 2009. Utilizando las pruebas de PCR para *Candidatus Liberibacter* spp. y Fitoplasma descritas anteriormente, se determinó cuantas de las plantas muestreadas a cada distancia de la fuente de inóculo presentaron infecciones por ambos patógenos. Se calculó el porcentaje de plantas con infecciones mezcladas y se graficó contra la distancia de la fuente de inóculo para determinar si existía un gradiente de infección y por lo tanto un efecto de la fuente de inóculo sobre la incidencia de plantas enfermas con infecciones mezcladas.

Monitoreo de insectos vectores. Se colocaron 3 trampas amarillas pegajosas a lo largo de las parcelas para detectar la presencia de psilidos y chicharritas, estas fueron colocadas 50 cm por arriba de la copa del cultivo orientadas en dirección del viento. Se contó el número de psilidos y chicharritas capturados semanalmente al igual que el cambio de trampas amarillas pegajosas, (Zavala, 2002).

Análisis para estimar distancia máxima de dispersión. Se graficó la incidencia de la enfermedad a los 30 y 57 DDE contra la distancia a partir de la fuente de inóculo (semilla tubérculo o maleza). La selección de estas fechas de muestreo (30 y 57 DDE) se basó en el período de incubación de la enfermedad en campo (30 días), de manera tal, que las plantas con síntomas no fueran infectadas por sus vecinas, sino por una fuente de inóculo externa al cultivo (semilla tubérculo o maleza). Se realizaron análisis de regresión utilizando los modelos para gradiente: ley de potencia, exponencial invertido y de Berger y se seleccionó el modelo que mejor se ajusto a los datos, de acuerdo con su r^2 y la distribución de residuales (Van der Plank, 1963; Berguer 1979; Madden, 1980). Una vez seleccionado el modelo se trazó la línea de regresión hasta que alcanzo el

menor porcentaje de incidencia de la enfermedad o de infección para determinar la distancia máxima a la que puede dispersarse la PMP a partir de una fuente de inóculo.

Detección y caracterización de *Candidatus Liberibacter* spp. Se realizó un análisis filogenético, el cuál consistió primeramente en consultar secuencias homologas a la secuencia objetivo en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se obtuvieron 40 secuencias del NCBI y se borraron los intervalos que no aportaban información, teniendo de esta manera un análisis más sensible. Los análisis filogenéticos de las 40 secuencias fueron realizados utilizando software MEGA versión 5.0, en el cuál se uso la versión ClustalW. El dendrograma se generó mediante el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). El porcentaje de replicas de los árboles con las secuencias asociadas en la prueba de arranque (1000 replicas), se muestran al lado de las ramas o grupos formados. Este método supone que la tasa de sustitución de nucleótidos o aminoácidos es la misma para todos los linajes evolutivos. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el Método de Máximo Riesgo Compuesto y se encuentran en unidades de número de sustituciones de base por sitio.

RESULTADOS

Período de incubación. Las primeras plantas enfermas se detectaron cerca de la FI a los 30 DDE. Tomando en cuenta que las plantas de papa se expusieron a la FI desde su emergencia y que en la parcela experimental estaban presentes los vectores (Figuras 4A y 4B), la infección ocurrió los primeros días después de la emergencia. Con estos resultados podemos afirmar que el período de incubación de la PMP en campo es de 23-30 DDE.

Gradiente de enfermedad y de infección. En el ciclo 2007, el porcentaje de enfermedad a los 30 DDE fue de 40% junto a la FI (plantas con PMP provenientes de semilla tubérculo infectado), reduciéndose progresivamente hasta llegar a 0% a los 40 m de distancia de la FI. A los 57 DDE, el porcentaje de enfermedad fue de 60%, junto a la FI, reduciéndose progresivamente hasta 10% a los 40 m (Figuras 1A y 1B). A los 73 DDE ya no se observó un gradiente conforme aumentaba la distancia a partir de la fuente de inóculo. Esto hace suponer que las plantas que se infectaron primero, pasaron por su período de latencia y se volvieron fuente de bacteria y/o fitoplasma para infectar a las demás plantas de la parcela experimental. Por esta razón, se utilizaron las incidencias de PMP registradas los días 30 y 57 DDE para estimar la distancia máxima de diseminación de la enfermedad a partir de una fuente de inóculo.

En cuanto al gradiente de infección se observó que del 10 al 20% de las plantas cercanas a la fuente de inóculo podían estar infectadas con el fitoplasma o la bacteria sin mostrar los síntomas característicos de la PMP (Figuras 1A y 1B), aunque al transcurrir el tiempo todas las plantas infectadas mostraron síntomas.

El modelo que mejor se ajustó al gradiente de la enfermedad y de infección por la bacteria y el fitoplasma en el ciclo 2007, fue el exponencial invertido. De acuerdo con este modelo, la distancia máxima a la que puede dispersarse esta enfermedad y los patógenos asociados a la misma (bacteria y fitoplasma) es de 80 a 100 m, así lo indica la línea de tendencia ajustada al porcentaje de plantas enfermas e infectadas con fitoplasma, bacteria o la mezcla de estos a los 30 y 57 DDE (Figuras 1A, 1B, y 2A), así como los resultados positivos de muestras analizadas para fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter* spp. (Figuras 5A, 5B). La incidencia de ambos patógenos cerca de la FI fue similar, 70% para la bacteria y 60% para el fitoplasma. Mas de la mitad de las plantas

infectadas tenían infecciones mezcladas (Figura 2A), lo que podría explicar la diferencia en síntomas y características epidemiológicas de la enfermedad en la región papera de Coahuila y Nuevo León comparada con la enfermedad en otras regiones del país o en Estados Unidos.

En la parcela sin FI (ciclo 2008), aunque se detectaron vectores de PMP, no se observó gradiente de la enfermedad y la incidencia de PMP fue mínima; solo una planta infectada con la bacteria fue detectada a los 30 m durante todo el ciclo de cultivo, lo que refuerza la teoría de que la semilla tubérculo es una FI importante para el inicio de la epidemia de PMP.

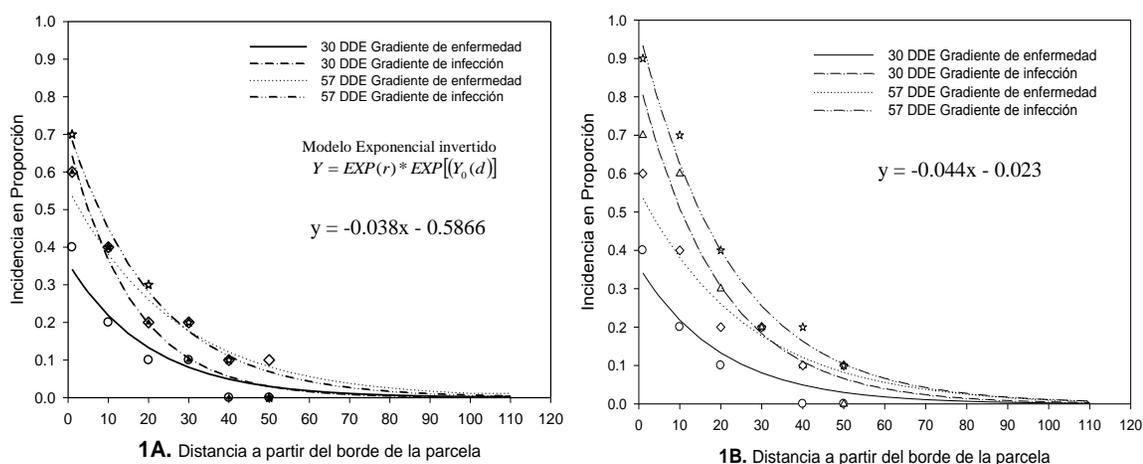


Figura 1. Gradientes de la enfermedad y gradientes de infección por fitoplasma y *Ca. Liberibacter psyllaurous* a partir de una fuente de inóculo. A) Plantas con síntomas de PMP provenientes de semilla-tubérculo infectada por fitoplasma; B) Plantas con síntomas de PMP provenientes de semilla-tubérculo infectada por *Ca. Liberibacter psyllaurous*.

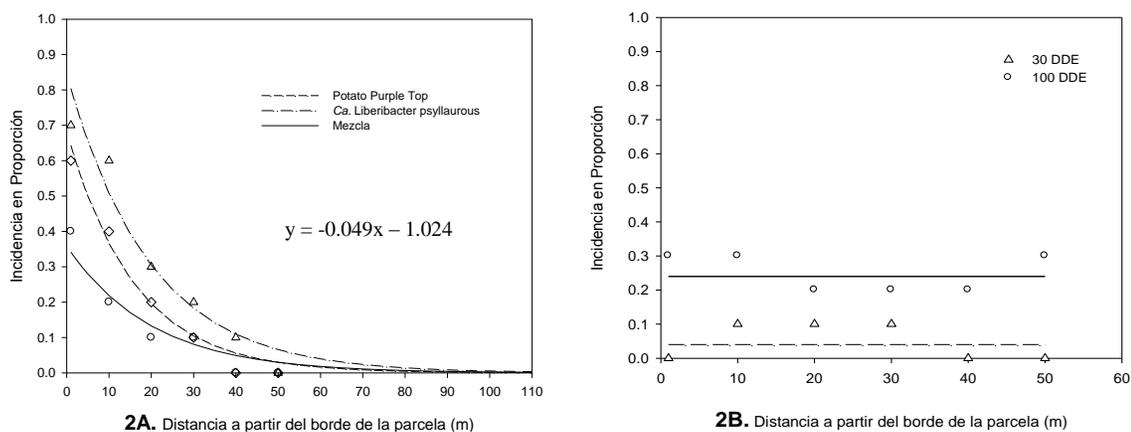


Figura 2. Gradiente de infección de patógenos asociados a PMP a los 30 DDE a partir de una fuente de inóculo e incidencia de PMP sin fuente de inóculo a los 30 y 100 DDE. A) Gradiente de infección por Potato Purple Top, *Ca. Liberibacter psyllae* y su Mezcla en plantas con síntomas de PMP provenientes de semilla-tubérculo infectada; B) Incidencia de PMP en la parcela experimental sin fuente de inóculo.

En la parcela con malezas como FI (ciclo 2009), se detectó una incidencia importante de PMP. Aunque se detectaron vectores de PMP durante todo el ciclo de cultivo (Figuras 4A y 4B), no se observó una reducción gradual de las plantas con PMP a partir de la maleza infectada con la bacteria, es decir no se detectó un gradiente de la enfermedad (Figura 3). A los 73 DDE se registró un 30% de plantas enfermas junto a la FI, y a los 10 m la incidencia fue de 30 %, a los 20, 30, 40 y 50 m fue de 10, 20, 10 y 10 % de plantas con síntomas de PMP respectivamente. Una situación similar, en la que no se detectó gradiente de la enfermedad fue en la parcela experimental sin fuente de inóculo (Fig. 2 B).

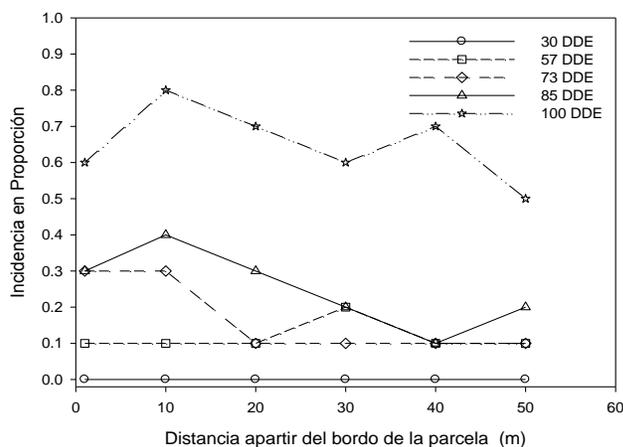


Figura 3. Incidencia de PMP en la parcela experimental donde se utilizó como fuente de inóculo a la maleza *Lycium berlandieri* positiva a *Candidatus Liberibacter psyllae*.

Monitoreo de insectos vectores. Los vectores de la PMP (*Bactericera cockerelli*, *Empoasca* sp. y *Macrosteltes* sp.), se detectaron durante todo el ciclo de cultivo en los 3 años de estudio (Figuras 4A y 4B).

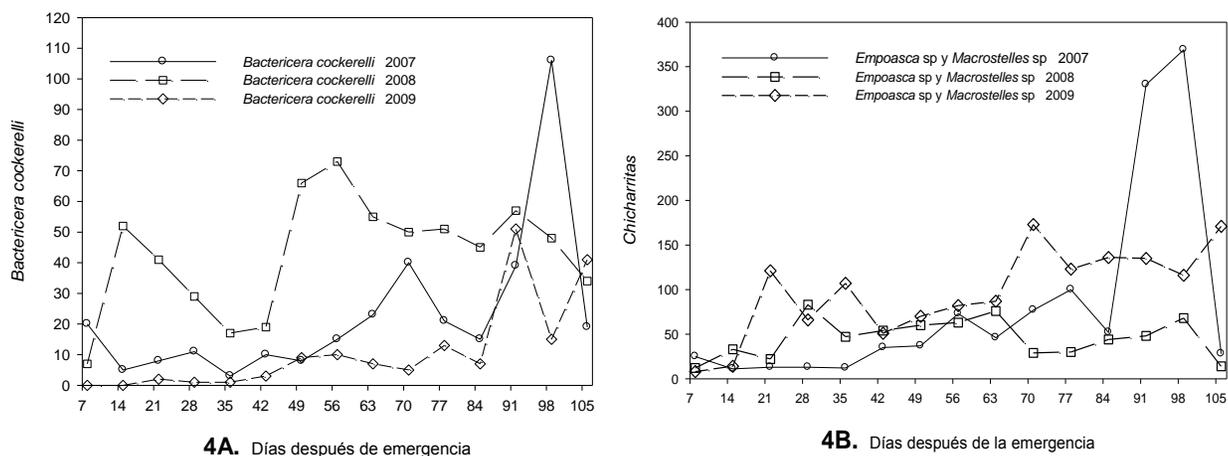


Figura 4. Fluctuación poblacional de *Bactericera cockerelli* y de chicharritas vectores de la PMP en tres ciclos de cultivo **A.** Fluctuación poblacional de *Bactericera cockerelli*, **B.** Fluctuación poblacional de chicharritas.

Patógenos asociados a los síntomas de PMP. En las diferentes muestras de plantas de papa con síntomas de PMP se amplificaron fragmentos del ADN de fitoplasmas y de la bacteria *Ca. Liberibacter psyllae*. En el caso de fitoplasmas se amplificó un fragmento de un tamaño aproximado de 1450 pares de bases (pb), en el caso de *Ca. Liberibacter psyllae*, se amplificaron 3 fragmentos de un tamaño aproximado de 400, 662 y 918 pb, no se observó amplificación en los testigos negativos (Figuras 5A y 5B).

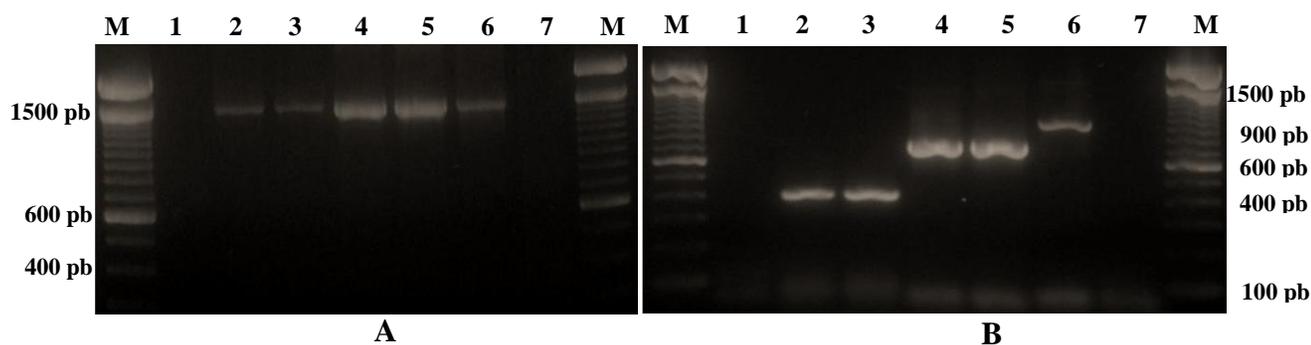


Figura 5. Fragmentos del ADN de fitoplasmas y la bacteria *Ca. Liberibacter psyllaourous* amplificados a partir del ADN extraído de plantas de papa con síntomas de PMP. A) Fragmentos del ADN de fitoplasmas, amplificados por PCR-Secuencial utilizando los iniciadores P1/P7 + R16mF2/R16mR1. Carril M: Marcador de peso molecular Ladder 100, Carriles 1 y 7: Testigos negativos (agua ultrapura estéril y planta sana), Carril 2-7: Muestras de papa con síntomas de PMP. B) Fragmentos del ADN de *Ca. Liberibacter psyllaourous*, amplificados por PCR utilizando los iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R (400 pb); Lp16S-ISRF/Lp16S-ISRR (662 pb) y Lp16S-ISR 23 SF/Lp16S-ISR 23 SR (918 pb). Carril M: Marcador de peso molecular Ladder 100, Carril 1 y 7: Testigos negativos (agua ultrapura estéril y planta sana), Carril 2-6: Muestra de papa con síntomas de PMP.

Caracterización molecular de *Ca. Liberibacter spp.* Para establecer con toda precisión a que especie de bacteria correspondía el ADN amplificado, el fragmento de 400 pb amplificado por PCR fue purificado mediante el sistema Wizard PCR Preps (Promega, Madison, WI) y posteriormente secuenciado. La secuencia obtenida en este trabajo presentó el 100% de similitud con la secuencia del gen 16S ribosomal reportada para *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Los datos anteriores fueron corroborados con el dendrograma generado a partir de la secuencia del fragmento amplificado por PCR y su comparación con diferentes secuencias reportadas en el banco de genes (Figura 6). Con los datos presentados anteriormente se puede inferir que la bacteria que actúa como uno de los agentes causales de la PMP en las regiones paperas de Coahuila y Nuevo León es *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

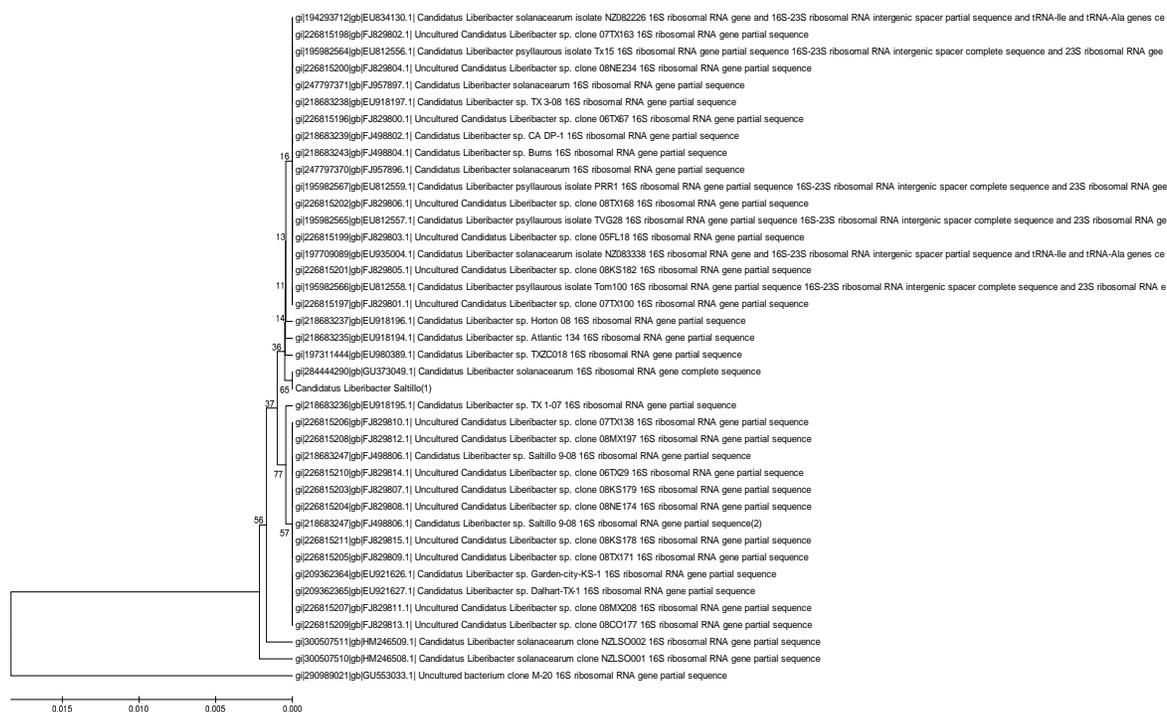


Figura 6. Arbol filogenético generado con la comparación de la secuencia del gen ribosomal 16S de *Ca. Liberibacter* spp, colectada en Saltillo, Coahuila, México y secuencias reportadas en la base datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Relación de la PMP con rendimiento y pérdidas. En el ciclo 2007, se observó que el rendimiento se incrementa y la incidencia se reduce conforme se aumenta la distancia a partir de la FI (Figura 7A); es decir existe una relación inversa entre porcentaje de incidencia y rendimiento, como era de esperarse para el caso de una enfermedad tan importante como la PMP; este resultado confirma la importancia de la semilla tubérculo como FI, no solo para la incidencia de la enfermedad, sino también para el rendimiento del cultivo.

Relación edad de la planta infección-rendimiento. Las pérdidas causadas por PMP se incrementan linealmente conforme se reduce de 73 a 30 DDE la fecha de aparición de los síntomas. Las plantas en las que los síntomas iniciaron a los 73 DDE tuvieron rendimientos de 23,198 Kg/Ha, similares a las plantas que no fueron expuestas a una FI

y que no presentaron síntomas durante todo el ciclo, cuyo rendimiento fue de 24,622 Kg/Ha (Figura 7B).

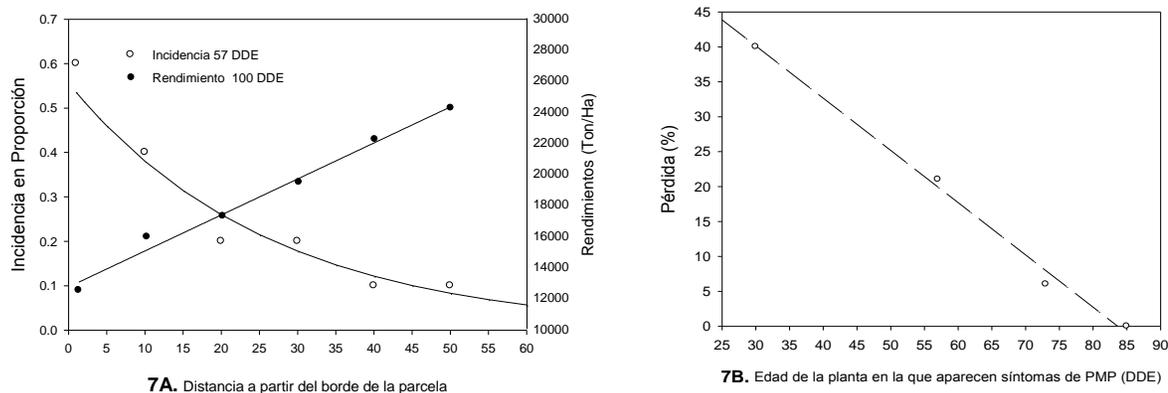


Figura 7. Relación de la distancia a partir de la fuente de inóculo (FI) y el tiempo de aparición de síntomas con la incidencia de PMP a los 57 DDE y el rendimiento de papa var. Gigant durante el año del 2007. A). Relación de la distancia a partir de la fuente de inóculo (FI) con la incidencia de PMP a los 57 DDE y el rendimiento de papa a los 100 DDE. B). Relación entre el tiempo de aparición de síntomas y el rendimiento de papa.

DISCUSIÓN

Cuatro características epidemiológicas importantes de la PMP fueron determinadas en éste estudio: El período de incubación de la enfermedad en campo, la importancia de la semilla-tubérculo como fuente de inóculo, la capacidad de dispersión de la PMP por sus vectores y el efecto de la enfermedad en el rendimiento. Este conocimiento nos permite diseñar con más elementos de juicio una estrategia para manejar eficientemente la enfermedad y reducir las pérdidas que causa.

Período de Incubación. La enfermedad tiene un período de incubación en campo de 23 a 30 días cuando las plantas se infectan recién emergidas. Otros autores han reportado un período de incubación de 26 días en ensayos de invernadero (Salas-Marina *et al.*, 2006). Esto implica que las estrategias de control deben ser preventivas y no deben estar

basadas en la detección de la enfermedad en campo; ya que cuando los síntomas se manifiestan, muchas otras plantas ya están infectadas y no existe posibilidad de ser curadas. La diferencia de 10 a 20% entre las plantas infectadas y las plantas con síntomas indica que no es posible iniciar las acciones de control cuando se detecten los primeros síntomas, pues los métodos con que actualmente se maneja esta enfermedad son preventivos y no curativos; esto implica que todas las plantas que están infectadas finalmente se enfermarán, aunque ya se hayan iniciado las acciones de control dirigidas principalmente sobre los vectores.

Capacidad de dispersión de la enfermedad. Los resultados de esta investigación indican que los vectores requieren de una FI cercana para poder introducir la enfermedad al cultivo de manera efectiva y que su capacidad para transportar el inóculo de fuentes a distancias mayores de los 80-100 m puede ser limitada. Esta hipótesis es respaldada por los resultados obtenidos en la parcela experimental en el ciclo 2008 en donde no se colocó FI y no se desarrolló la epidemia de PMP a pesar de que las poblaciones de psilidos y chicharritas fueron similares a las que se presentaron en el ciclo 2007 cuando se registraron incidencias de más del 90% de PMP. Cabe aclarar que no existieron cultivos de papa cercanos (5-10 Km) a la parcela experimental, aunque en los terrenos vecinos había presencia de maleza como la correhuela (*Ipomoea* spp) que es hospedera del fitoplasma y de vectores como los psilidos (Almeyda *et al.*, 2008).

Importancia de fuentes de inóculo. Los resultados indican que la semilla tubérculo es una importante fuente de inóculo para el inicio de la epidemia de PMP. En la literatura se menciona que la semilla infectada con el fitoplasma no es una importante fuente de inóculo para la epidemia de PMP (Henne *et al.*, 2010), sin embargo, en esta investigación fue claro y evidente que esta fuente de inóculo puede provocar una

epidemia severa de PMP y que su importancia como FI es muy superior que la que pueden tener otras formas de arribo de la enfermedad como por ejemplo insectos infectivos que por su propio movimiento o acareados por las corrientes de aire lleguen a la parcela. Es por eso que una de las formas más efectivas de prevenir daños por PMP es la siembra de semilla sana y es deseable que todo productor analice su semilla y que los programas de certificación de semilla establezcan regulaciones para evitar la venta de semilla certificada contaminada con estos importantes patógenos (bacteria y fitoplasma). Si la semilla tubérculo es importante para la aparición y dispersión de la PMP, no menos importantes resultan las plantas mostrencas que brotan de los tubérculos que quedan en el suelo del ciclo de cultivo anterior y también se constituyen como fuente de inóculo para la epidemia de la PMP, sobre todo si están en lotes aledaños (80-100 m) al cultivo de papa.

No se encontraron evidencias de que la maleza cilindrillo sea una fuente de inóculo importante para el inicio de la epidemia de PMP causada por fitoplasmas y la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*; así lo indica la ausencia de gradiente cuando las plantas de papa se expusieron a una FI formada por esta maleza infectada con la bacteria. Sin embargo, la incidencia aleatoria de PMP a lo largo de la parcela indica que otra fuente de inóculo existió en el ciclo 2009. En este ciclo en particular la parcela experimental estaba rodeada de maíz con una alta incidencia de correhuela. Es posible que los vectores no puedan transmitir directamente del cilindrillo a la papa, pero sí de la correhuela a la papa; es decir que primero los vectores transmitieron al patógeno del cilindrillo a la correhuela y una vez infectada, el vector lo transmitiera de la correhuela a la papa. Esta hipótesis coincide con la tardía aparición de la enfermedad y con la distribución aleatoria de las plantas enfermas en la parcela experimental. Algunos

insectos tienen la habilidad de adquirir patógenos de las plantas infectadas, pero no son capaces de transmitirlo a plantas sanas de diferente cultivo o especies (Albanese *et al.*, 1997; Danielli *et al.*, 1996) o bien sirven únicamente para la reproducción de los vectores en etapas cuando no hay hospederos de su preferencia.

Es por lo tanto importante eliminar malezas hospederas de PMP y plantas mostrencas de papa en un radio de 100 m alrededor del cultivo de papa y/o aplicar agentes de control biológico en los alrededores de la parcela para reducir las poblaciones de los vectores infectivos que pueden arribar al cultivo y transmitir la bacteria y el fitoplasma que causa la PMP en las regiones paperas de Coahuila y Nuevo León.

Rendimientos y pérdidas. El rendimiento de las plantas que presentan síntomas después de los 73 DDE, fue similar al de las plantas sanas, por lo tanto la etapa crítica en la que debe protegerse el cultivo es desde la emergencia hasta los 43 DDE, con énfasis en las primeras semanas cuando la PMP puede reducir el 40% del rendimiento del cultivo (Figura 7B).

Caracterización de la bacteria *Ca. Liberibacter* spp. Con base en el análisis filogenético, se determinó que la secuencia generada en este estudio tuvo un 100% de similitud con la secuencia que tiene el número de accesión GU373049 en el Banco de Genes y que corresponde a la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Figura 6). Por lo tanto podemos inferir que la bacteria que ocasiona el síndrome de punta morada de la papa en la región de Saltillo pertenece a *Ca. L. solanacearum*, coincidiendo con lo reportado por Secor *et al.* (2009), y probablemente sea la misma que se encuentra infectando a otras Solanáceas como el tomate en la misma región. Hansen *et al.* (2008), asociaron a la sintomatología del amarillamiento del psilido a la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllauros*. Sin embargo, debido a que la secuencia del gen que codifica

para el RNA ribosomal 16S de *Ca. L. psyllaourous* es idéntico a la secuencia del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de *Ca. L. solanacearum*, es probable que ambos nombres sean sinónimos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de incidencia de la enfermedad a los 30/57 DDE, la distancia máxima a la que puede dispersarse la enfermedad es de 80 a 100 m. La semilla tubérculo proveniente de lotes infectados con PMP, es una importante FI para iniciar la epidemia con esta enfermedad. El periodo de incubación de la PMP es de 30 días bajo condiciones de campo. El rendimiento de las plantas que presentan síntomas después de los 73 DDE (infectadas después de 43 DDE) es similar al de las plantas sanas. La etapa crítica en la que debe protegerse el cultivo es desde la emergencia hasta los 43 DDE, con énfasis en las primeras semanas cuando la PMP puede reducir en un 40% el rendimiento del cultivo. La bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* está implicada en la sintomatología del síndrome de punta morada en papa, al menos en las regiones productoras de papa de Coahuila y Nuevo León. En las muestras analizadas por PCR, se detectaron muestras positivas al fitoplasmas y a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, así como muestras con infecciones mixtas.

LITERAURA CITADA

Albanese, G.D., Urso, U., Granata, G., and Colladoro, S. 1997. Individuazione di un fitoplasma in asemplari di *Psamatettix striatus* catturati in vignati. Inform. Phytopathology 7(8):57-60.

Almeyda-León I. H., Sánchez-Salas, J. A. y Garzón-Tiznado, J. A. 2004. Detección molecular de fitoplasmas en papa. *In*: Flores, O. A.; Gallegos, M. G y García, M. O. (eds.). Memorias de Simposio Punta Morada de la Papa. pp. 4-14.

Almeyda-León, I.H., Sánchez-Salas, J.A. y Garzón-Tiznado, J.A. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica en México* 34:141-150.

Almeyda-León, I.H., Cázares-Alonso, N. P., Rubio-Covarrubias, O. y Villavicencio-Gutiérrez E. E. 2009. Detección de *Candidatus Liberibacter psyllauros* en papa con síntomas de punta morada. XI Congreso Internacional / XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Acapulco, Guerrero, México. Resumen Corto, C-81.

Berger, R.D.; H. H. Luke. 1979. Spatial and temporal spread of oat crown rust. *Phytopathology* 69:1199-1201.

Cazáres-Méndez, I.G., Cadena-Hinojosa, M.A., Rodríguez, D.M.A., De la Jara, A.F. y Zerón, B. F. 2004. Determinación de prolina y ácido ascórbico en tubérculos sanos y con síntomas de punta morada de siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). Memorias del VI/XXXI Congreso Internacional/Congreso Nacional Congreso del la Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Boca del Río, Veracruz, México. Resumen L-1.

CESAVECO, 2009. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Coahuila A.C. “Informe Anual del Monitoreo de insectos vectores de fitoplasma de punta morada de la papa de la región papera de Coahuila y Nuevo León, dentro de la “Campaña Manejo Fitosanitario de Hortalizas” 32 p.

Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Mori, N., Murari, E., Posenato, G., and Girolami, V. 1996. Detection and molecular characterization of phytoplasmas in the planthopper

Metcalfa pruinosa (Say) (Homoptera: Flatidae). *Phytopathology Mediterraneo* 35:62–75.

Flores-Olivas A. y Lira-Saldivar H. 2008. Detección, diagnóstico y manejo de la punta morada de la papa. UAAAN. Ediciones Parnaso. Málaga, España. 135 p

Gundersen, D. E., and I. M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144 - 151.

Hansen, A.K., Trumble, J. T., Stouthamer, R and Paine, T. D. 2008. A New Huanglongbing Species, “*Candidatus Liberibacter psyllauros*,” Found To Infect Tomato and Potato, Is Vectored by the Psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5862–5865.

Henne, D. C., Workneh, F., Wen, A., Price, J. A., Pasche, J. S., Gudmestad, N. C., and Rush, C. M. 2010. Characterization and epidemiological significance of potato plants grown from seed tubers affected by Zebra Chip disease. *Plant Disease* 94:659-665.

Lee, I. M., Gundersen, R. D. E., and Betaccini, A. 1998. Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology* 88:1359-1366.

Lee, I. M., Bottner, K. D., Secor, G. A. and Viviana R. V. 2006. ‘*Candidatus Phytoplasma americanum*’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1593–1597.

Lee, I. M., Bottner, K. D., Munyaneza, J. E., Secor, G. A. and Gudmestad, N. C. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease* 88: 429.

Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S. & Martínez-Soriano, J. P. (2002). Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal Microbiology* 48:1062–1068.

Madden, L.V. 1980. Quantification of disease Progression. *Prot. Ecology* 2:159-176.

Martínez-Soriano, J.P., Leyva-López, N.E., Zavala-Soto, M.E., Beres, M., and Leal-Klevezas, D.S. 1999. Detección molecular del agente causal del síndrome “bola de hilo” de la papa en semillas infectadas y asintomaticas. *Biotechnología Aplicada* 16:93-96.

Munyaneza, J.E., Crosslin, J.M., and Upton, J.E. 2006. The beet leafhopper (Hemiptera: *Cicadellidae*) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. *Journal of Economic Entomology* 99: 268-272.

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

Munyaneza, J.E., Buchman, J.L., Upton, J.E., Goolsby, J., Crosslin, J., Bester, G., Miles, G.P., Sengoda, V.G. 2008. Impact of Different Potato Psyllid Populations on Zebra Chip Disease Incidence, Severity, and Potato Yield. *Subtropical Plant Science* 60:27-37.

Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., De la Rosa-Lozano, G., and Sánchez, A. 2009. First report of ‘*Candidatus Liberibacter psyllauros*’ in potato tubers with Zebra Chip disease in Mexico. *Plant Disease* 93:552.

Salas-Marina, M. A., Flores-Olivas, A., Sánchez-Arizpe, A., García-Martínez, O., Almeida-León, I. H., y Garzón-Tiznado J. A. 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de Fitoplasmas de la punta morada de la papa, pp. O-1. In Memoria de XXII

Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa, 30 Julio - 4 Agosto 2006. ALAP, Toluca, México.

Secor, G. A., Rivera, V. V., Abad, J. A., Lee, I.-M., Clover, G. R. G., Liefting, L. W., Li, X., and De Boer, S. H. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93:574-583.

Smart, C.D., Schneider, B., Bomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.

Van der Plank, J.E. 1963. *Plant diseases: Epidemics and control*. Academic Press. New York. 349 p.

Vargas, C. I. 2005. *Especies y fluctuación poblacional de cicadelidos y psillidos positivos a fitoplasma en el cultivo de la papa y malezas aledañas en Arteaga, Coahuila*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista. Saltillo, Coahuila, México. 52 p.

Zavala, Q. T. E. 2002. *Experiencias en el Valle de Toluca sobre Punta Morada*. Memorias del XI Congreso Nacional de la Papa. León Guanajuato, México. pp. 81-97.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los objetivos planteados y resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- ❖ Existe una relación directa entre la incidencia anual de PMP y las poblaciones de *B. cockerelli* y Chicharritas en tres lotes comerciales de papa en cuatro ciclos de cultivo en las regiones productoras de papa de Coahuila y Nuevo León; así como su importancia de éstos insectos vectores en la diseminación de la PMP.
- ❖ Según los resultados de la incidencia en lotes comerciales de papa, la enfermedad es introducida a las parcelas en la semilla-tubérculo y a partir de esta diseminada por los vectores.
- ❖ El menor riesgo de diseminación de la enfermedad ocurre cuando la planta de papa emerge entre Junio y Julio, cuando las poblaciones de cicadelidos y *B. cockerelli* son relativamente bajas, es decir cuando las siembras son a finales de mayo con emergencia a principios de junio.
- ❖ Se requirieron de 40 a 50 DDE promedio para la aparición de los primeros síntomas de PMP y los primeros picos poblacionales de vectores de PMP se presentaron de marzo a mayo.
- ❖ La distancia máxima a la que puede dispersarse la enfermedad a partir de una fuente de inóculo es de 80 a 100 m, de acuerdo a los datos de incidencia de la enfermedad a los 30/57 DDE.

- ❖ La semilla tubérculo infectada con PMP, es una importante FI para iniciar la epidemia con esta enfermedad.
- ❖ El periodo de incubación de la PMP es de 30 días bajo condiciones de campo.
- ❖ El rendimiento de las plantas que presentan síntomas después de los 73 DDE es similar al de las plantas sanas.
- ❖ La etapa crítica en la que debe protegerse el cultivo es desde la emergencia hasta los 43 DDE, con énfasis en las primeras semanas cuando la PMP puede reducir en un 40% el rendimiento del cultivo.
- ❖ La bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* está implicada en la sintomatología del síndrome de PMP, al menos en las regiones productoras de papa de Coahuila y Nuevo León, ya que en muestras analizadas por PCR, se detectaron muestras positivas al fitoplasmas y a *Candidatus Liberibacter solanacearum*.
- ❖ No se encontraron evidencias de que la maleza cilindrillo (*Lycium berlandieri*) infectado con PMP sea una FI importante para el inicio de la epidemia de PMP causada por fitoplasmas y la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

LITERATURA CITADA:

- Ahrens, U. y Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Almeyda-León, I.H., Sánchez-Salas, J.A. y Garzón-Tiznado, J.A. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica en México* 34:141-150.

- Alonso, A.F. 1996. El cultivo de la papata. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 272 p.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88:7–37.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1974. Estudio sobre la “Punta Morada de la Papa” en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México. 70 p.
- Cadena, H. M y A. J. Galindo. 1985. Reducción de la incidencia de la “Punta morada de la papa” por medio de fechas de siembra, genotipo de la planta y aplicaciones de insecticidas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 3:100-104.
- Cadena, H, M. A. 1993. La punta morada de la papa en México: I. Incidencia y Búsqueda de Resistencia. *Agrociencia* 4(2): 247-256.
- Cadena, H. M. 1996. La punta morada de la papa en México: Efecto de cubiertas flotantes, genotipos y productos químicos. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 14 (1): 20-24.
- Campbell, C.L., Madden L.P. and Pennypacker, S.P. 1980. Structural characterization of bean root rot epidemics. *Phytopathology* 70:152-155.
- Campbell, C.L. and Madden L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons Inc. 532 p.
- Cutter, E.Z. 1978. Structure and development of the potato Plant. In: Harris, P.M. (Ed9). *The Potato Crop. The scientific basis for improvement.* Chapman and Hall. London. pp. 70-151.
- Chang, C.J. 1998. Pathogenicity of Aster Yellows *Phytoplasma* and *Spiroplasma citri* on Periwinkle. *Phytopathology*, 88, 1347-1350.
- Chaube, H.S. and Singh, U.S. 1991. Plant Disease Management: Principles and practices. CRC Press Inc. 319 p.
- Davis, R.E. y Sinclair, W.A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88, 1372-1376.
- Errampalli, D. Fletcher, J. y Claypol, P.L. 1991. Incidence of yellows in carrot and lettuce and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Disease*, 75:579-584.

- Flores, O. A., I. A. Alemán y M. I. Notario. 2004. Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. En memorias del Simposio punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila. pp. 40-44.
- García-Quijano, J.R. 1996. Etiología y transmisión del oscurecimiento del tubérculo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) para industria. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado. de México. 65 p.
- Gaunt, R.E. 1987. Measurement of disease and pathogens. In: Teng, P.S. (Ed). Crop Loss Assessment and Pest Management. APS Press. St Paul, Minnesota. pp. 6-18.
- Gharalari, A.H., Nansen, C., Lawson, D.S., Gilley, J., Munyaneza, J.E. and Vaughn, K. Knockdown Mortality, Repellency, and Residual Effects of Insecticides for Control of Adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). Ecology y Behavior. Journal Entomology. 102 (3): 1032-1038.
- Gibb, K. S., Padovan, A.C. y Mogan, B.D. 1995. Studies on sweet potato Little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species in northern Australia. *Phytopathology* 85, 169-174
- Guigon, L.C. 1994. Epidemiología de las enfermedades de la papa causadas por Hongos Fitopatógenos del suelo en el Sur de Coahuila y Nuevo León. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 103 p.
- Gundersen, D. E. y Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive setecction of phytoplasmas by nested-PCR assals using two universal primer pairs. Phtopath. Medit., 35, 144-151.
- Gundersen, D.E., Lee, I.M., Rehener, S.A., Davis, R.E., and Kingsbury, D.T., 1994. Phylogeny of mycoplasmalikeorganism (phytoplasmas): a basic for their classification. J. bacterial. 176: 5244-5254.
- Hansen, A.K., Trumble, J. T., Stouthamer, R and Paine, T. D. 2008. A New Huanglongbing Species, “*Candidatus* Liberibacter psyllaourous,” Found To Infect Tomato and Potato, Is Vectored by the Psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Applied and Enviromental Microbiology 74: 5862–5865.
- Hawkes, J.G. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Smithsonian Institution Press. Washington D.C.
- Jagoueix, S, Bové JM, Garnier M (1996) PCR detection of the two ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and cellular Probes* 10, 43–50.

- Kaloostian, G. H. 1980. Psyllids. In: Vectors of plant pathogens. Harris, K. F. and K. Maramorosh Ed. New York, Academic Press. pp. 87-91.
- Ko, H.C. y Lin, C.P. 1994. Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches'-broom. *Phytopathology* 84: 468-473.
- Kranz, J. 1974. Comparison of epidemics. *Ann. Rev. Phytopathology*. 12:355-374.
- Kranz, J. 1988. The methodology of comparative epidemiology. In: Experimental techniques in plant disease epidemiology. Springer, Berlín. pp. 279-289.
- Kuboyama, T., Huang, C.C., Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, T., Tsuchizaki, T. y Namba, S. 1998. A plasmid isolate from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 1031-1037.
- Llácer, G., López, M. M. Trapero, A. y Bello, A. 1996. Patología Vegetal. Tomo I. 2da. Edición. Sociedad Española de Fitopatología. Editorial Grupo Mundi Prensa. Barcelona, España. 695 p.
- Lee, I.M., Davis, R.E and Gunderson-Rindal, D. E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Ann. Rev. Microbiol.* 54:221-555.
- Lee, I. M., Gundersen, R. D. E., and Betaccini, A. 1998. Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology* 88:1359-1366.
- Lee, I.M., Gundersen, R., Hammond, R.W., and Davis, E.E., 1994. Use of mycoplasma-like organism(MLO) group- specific oligonucleotide primers for Nested- PCR assays to detected mixed- MLO infections in a single host plant. *Molecular plant pathology* 84: 559-566.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Sinclair, W.A., De Witt, D.D. y M., C. 1993. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in ulmus spp. In the United States and Italy by means of DNA probes and Polymerase Chain Reactions. *Phytopathology*, 83: 829-833.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C. y Schaff, D.A. 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organism (MLOs) in the aster yellow MLO strain cluster. *Phytopathology*, 82, 977-986.
- Lee, I.M. y Davis, R.E 1992. Micoplasmas which infect plants and insects. Páginas 379-390 en: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*.

- Maniloff J., McElhanev R.N., Finch L.R. y Baseman, J.B. Eds. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S. & Martínez-Soriano, J. P. (2002). Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal Microbiology* 48:1062–1068.
- Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S. & Martínez-Soriano, J. P. 2002 (a). Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal Microbiology* 48:1062–1068.
- Leyva-López, 2002 (b). Detección y caracterización molecular de fitoplasmas asociados a enfermedades de la papa. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Superiores Avanzados de Instituto Politécnico Nacional. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas. Dto. De Biotecnología y Bioquímica. Irapuato, Guanajuato, México. 92 p.
- Liefting, L. W., Z. C. Perez-Egusquiza, G.R.G. Clover, and J.A.D. Anderson. 2008. A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92: 1474.
- López S.A., Frare GF (2008) Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus*' *Liberibacter americanus*'. *Plant Disease* 92, 21–24.
- Madden, L.V. 1980. Quantification of disease Progression. *Prot. Ecol.* 2:159-176.
- Malik, J.N., Dwelle, R.B., Thornton, M.K., and Pavek, J.J. 1992. Dry matter accumulation in potato clones under seasonal high temperature conditions in Pakistan. *Amer. Pot. J.* 69:667-676.
- Marín, J. A. 2003. Características morfológicas y aspectos biológicos del Psílido del tomate *Bactericera cockerelli* (Sulc) (= *Paratrioza cockerelli*). En taller de *Paratrioza cockerelli*. Bayer Crop Science. Ixtapa, Zihuatanejo, Gro. pp 47-55.
- Metcalf, C. L y W. P. Flint. 1984. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y control. 4ª Edic. Edit. Continental, México. 1208p.
- Moorby, J. 1978. The physiology of growth and tuber yield. In: Harris, P.M. (Ed). *The Potato. The scientific basis for improvement.* Chapman and may. London. pp. 153-194.
- Munyanenza, J.E., Buchman, J.L., Upton, J.E., Goolsby, J., Crosslin, J., Bester, G., Miles, G.P., Sengoda, V.G. 2008. Impact of Different Potato Psyllid

Populations on Zebra Chip Disease Incidence, Severity, and Potato Yield. *Subtropical Plant Science* 60:27-37.

- Munyaneza, J.E., Crosslin, J. M., and Upton, J.E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United States potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100: 656-663.
- Munyaneza, J.E., Buchman, J.L., Upton, J.E., Goolsby, J., Crosslin, J., Bester, G., Miles, G.P., Sengoda, V.G. 2008. Impact of Different Potato Psyllid Populations on Zebra Chip Disease Incidence, Severity, and Potato Yield. *Subtropical Plant Science* 60:27-37.
- Oman, P. W., W. J. Knight, and M. W. Nielson. 1990. Leafhoppers (Cicadellidae): A bibliography, generic checklist and index to the world literature 1956 – 1985. C.A.B. international, Wallingford, UK. 368 pp.
- Rangel, C.V. 1995. Control de malezas para retardar el arribo de mosquita blanca en el cultivo de papa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 50 p.
- Razin, S., Yogev, D. y Naot, Y. 1998. Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1094-1156.
- Rocha, R.R. 1985. Guía para cultivar papa en el Bajío. SARH. INIA (CIAB) CAEB. Celaya, Guanajuato, México. 14 p.
- Rojas-Martínez, R.I. Fitoplasmas. 1999. *Fitopatología*, 34 (3), 102-115.
- Rousselle, P., Robert, Y., y Crosnier, J.C.1999. La patata. Ediciones Mundi Prensa. México. 30 p.
- Rubio-Cobarrubias, O.A., Almeida-León. H., Díaz, H.C., Garzón-Tiznado, A., Rocha, R.R., y Cadena, H.M. 2002. Importancia y distribución de la punta morada de la papa en México. Memorias del Taller Internacional de Trabajo sobre la Punta Morada de la Papa y *Paratrioza cockerelli*. INIFAP y CONPAPA. Toluca, Edo. de México. pp. 1–11.
- Santiago, C.V. 2004. Epidemiología de la punta morada de la papa en la región sur de Coahuila y Nuevo León, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Secor, G. A., and V. V. Rivera-Varas. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Latinoam. Papa*. 1: 1-8.

- Seem, R.C. 1984. Disease Incidence and severity relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22:133-150.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, C., Ragozzino, A. y Göschl. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.
- SIAP, 2010. Producción agrícola de papa en México. Servicio de Información agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México, D.F. Consultado el 20 de julio del 2011.
- Schneider, B., Gibb, K.S. y Seemuller, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasma. *Microbiology*, 143, 3381-3389.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C. y Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen Microbiol*, 139, 519-527.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemuller, E., y Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol*, 62, 2988-2993.
- Stone, N.D., Loulson, R.N., Frisbie, R.E. and Loh., D.K. 1986. Expert system in entomology: Three approaches to problem solving. *Bul. Entomol. Soc. Amer.* 32:161-166.
- Triplehorn, C. A and N. F. Johnson. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the study of insects. 7th edition. Thomson books/cole. United States of America. pp. 310.
- Van der Plank, J.E. 1963. Plant diseases: Epidemics and control. Academic Press. New York. 349 p.
- Yu, Y.I., Yeh, K.W. y Lin, C.P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology*, 144, 1257-1267.
- Zadoks, J.C. and R.D. Shein. 1979. Epidemiology and Plant Disease Management. Oxford Univ. Press. New York. 427 p.
- Zúñiga-López, L. N., Molina-Gálan, J.D., Cadena-Hinojosa, A.C. y Rivera-Peña, A.R. 2002. Resistencia al tizón tardío de la papa (*Phytohthora infestans*) en cruzamiento de cultivares y clones de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(1): 1-9.