

EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN PLANTAS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) INFECTADAS CON EL SÍNDROME PUNTA MORADA

ARELI GONZALEZ CORTES

T E S I S

Presentada como requisito parcial para

Obtener el grado de:

MAESTRO EN TECNOLOGÍA

DE GRANOS Y SEMILLAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Enero de 2012.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN PLANTAS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) INFECTADAS CON EL SÍNDROME PUNTA MORADA

TESIS

POR:

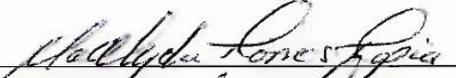
ARELI GONZALEZ CORTES

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
Aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

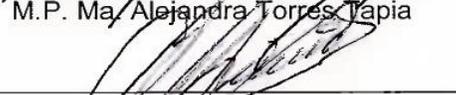
MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS

COMITÉ PARTICULAR

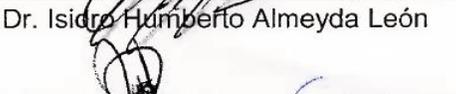
Asesor principal:


M.P. Ma. Alejandra Torres Tapia

Asesor:

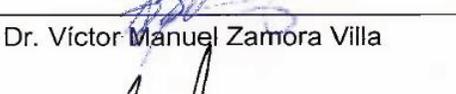

Dr. Isidro Humberto Almeyda León

Asesor:


M.C. E. Edith Villavicencio Gutiérrez

Asesor:


Dr. Víctor Manuel Zamora Villa


Dr. Fernando Ruíz Zárate
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Enero de 2012.

Agradecimientos.

A Dios por darme esa gran oportunidad de seguir superándome, por enseñarme el camino correcto y por darme la fortaleza para seguir adelante ante cualquier adversidad.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Mi Alma Terra Mater por abrirme sus puertas nuevamente y brindarme la oportunidad de cumplir uno de mis mayores sueños el de formarme como profesionalista en una de las mejores áreas de estudio, en la que hoy me encuentro orgullosa y con la confianza de poder devolver lo aprendido.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Saltillo, por permitir realizar mi trabajo de tesis y por proporcionar toda la herramienta necesaria para realizar esta investigación.

A la M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez, por todo su apoyo incondicional y por darme la oportunidad de participar en uno de sus proyectos al realizar esta investigación, transmitiéndome sus conocimientos, gracias por la dedicación de su tiempo, pero sobre todo por su valiosa amistad, comprensión y consejos, que sin duda me sirvieron para enfrentar muchos golpes de la vida con respeto y admiración para usted, nunca cambie es usted una gran persona gracias por permitirme conocerla.

Al Dr. Isidro Humberto Almeyda León, por su apoyo brindado durante esta investigación, por su valiosa amistad, y por toda su confianza depositada en mí para poder llevar a cabo esta investigación que forma parte de un proyecto tan importante dirigido por usted.

A la M.C. Alejandra Torres: por brindarme su amistad y por confiar en mí, por ser una gran persona, amable y sencilla que siempre genero en mí una gran confianza y por su buena disposición y tiempo en la participación de este trabajo y por las sugerencias brindadas gracias.

Al Dr. Victor Zamora Villa, por su valiosa participación en la parte estadística, por ser una persona humilde y sencilla, por ese gran apoyo.

Dedicatoria.

A mi Madre, Ninfa Cortes Zamora, con todo el amor y cariño que se merece por apoyarme y confiar en mí, brindándome su comprensión, por darme lo mejor durante toda mi vida, por permanecer junto a mí en mis triunfos y fracasos, porque sola me saco adelante y supo ser padre y madre gracias, no me alcanzara la vida para agradecerte todo lo que has hecho por mi.

A mis Abuelos, Marcelino Cortes R. y M. de Jesús Zamora H., que fueron el pilar de mi vida, al ser como mis padres y amarme como hija, por darme todo su amor, esfuerzo, dedicación y por su apoyo moral y económico que me han brindado a lo largo de mi vida por ser los mejores abuelos, que con su ejemplo de nobleza, sencillez, alegría y lucha, me enseñaron a salir adelante en los momentos más difíciles porque siempre estuvieron conmigo a pesar de la distancia y me dieron la confianza de seguir adelante con mi formación profesional, gracias de todo corazón.

A Miguel Ángel Machuca Campos, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por todo el apoyo y amor que me has dado, por ese ejemplo tan maravilloso de salir adelante y por esa ayuda tan grande en esta investigación que con tu granito de arena, se hizo más liviano este trabajo.

A mis amigos Rebeca, Fernando, Eli, Mel, Rusbel, Oscar, Marvin, Fausto, Gume, y a mi miguito Francisco Oviedo QED, por llenarme de gratos momentos al brindarme su apoyo, confianza y conocimientos, durante toda mi formación profesional y porque seguirán formando parte de mi vida por siempre. A todos aquellos que en parte me regalaron su amistad y apoyo, los llevo en mi mente y corazón.

Dedicada a todos los maestros de Tecnología de Granos y Semillas Gracias por su formación y consejos. Gracias.

COMPENDIO

**EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN PLANTAS DE PAPA (*Solanum tuberosum*
L.) INFECTADAS CON EL SÍNDROME PUNTA MORADA**

POR

ARELI GONZALEZ CORTES

**MAESTRÍA PROFESIONAL EN
TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. ENERO DE 2012**

M.P. MARÍA ALEJANDRA TORRES TAPIA --ASESOR--

RESUMEN

Palabras clave: Punta morada, papa, *Candidatus* Liberibacter solanasearum, fitoplasma, psílido y PCR.

Esta investigación se realizó en laboratorio e invernadero del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Saltillo (INIFAP-CESAL) y en los laboratorios de fitoquímica y biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el objetivo de evaluar el efecto de tres antioxidantes vs punta morada en el cultivo de papa variedad Vivaldi, desde trasplante de plántula hasta cosecha, como material vegetal se utilizaron plantas positivas y negativas a *Candidatus* Liberibacter solanacearum, provenientes de campo y del banco de germoplasma *in vitro* del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del INIFAP en Saltillo. Los tratamientos evaluados fueron ácido dehidroascorbico (600 ppm), ácido ascórbico (600 ppm) y peróxido de hidrogeno (1mM), en las siguientes combinaciones T1 Plantas con Punta Morada de la Papa (PMP) +Acido ascórbico, T2 Plantas con PMP+Acido dehidroascorbico, T3 Plantas con PMP+Peróxido de hidrogeno, T4 Plantas con PMP+Sin antioxidantes, T5 Plantas sana+psílicos+ Acido ascórbico, T6 Plantas sana+psílicos+Acido dehidroascorbico, T7 Plantas sana+psílicos+Peróxido de hidrogeno, T8 Plantas sana+psílicos Sinantioxidante, T9 Plantas con PMP+psílicos+Acido ascórbico, T10 Plantas con PMP+psílicos+Acido dehidroascorbico, T11 Plantas con PMP+psílicos+Peróxido de hidrogeno, T12 Plantas con PMP+psílicos Sin antioxidante, T13 Plantas sanas+Acido ascórbico+600 ppm, T14 Plantas sanas+Acido dehidroascorbico, T15 Plantas sanas+Peróxido de hidrogeno, T16 Plantas sanas sin antioxidante, cada tratamiento

consto de 3 repeticiones con tres unidades experimentales por repetición. Las variables evaluadas fueron: Longitud de la plántula (LP), numero de hojas (NH), numero de foliolos (NF), diámetro polar y ecuatorial de los tubérculos (DPET), peso de los tubérculos (PT), tipo de brote del tubérculo (TBT) y porcentaje de pardeamiento de los tubérculos (PPT). La información se analizó mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial con tres repeticiones, se utilizó el paquete estadístico SAS versión 6.0 (1989). Los resultados indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, en las variables estudiadas. Encontrándose que el Ac. Dehidroascorbico en una concentración de 600 ppm aplicado en plantas infectadas con PMP, aumenta la acumulación de biomasa al incrementar la altura foliar, el numero de hojas y de foliolos en plantas enfermas con PMP y reduce el daño producido por la enfermedad a diferencia del peróxido de hidrogeno que una concentración de 1 mM, incrementa la acumulación de biomasa al aumentar la altura foliar, así como el número de hojas y de foliolos en plantas sanas y posterior infestación con psílidos, sin embargo, al incrementarse el número de psílidos la protección de la planta se reduce, esta puede morir y no llegar a cosecha. El Ac. Ascórbico a una concentración de 600 ppm, aumenta la acumulación de biomasa al incrementar la altura foliar, el numero de hojas y de foliolos en plantas sanas, pero no confiere protección en plantas con PMP.

**EVALUATION OF ANTIOXIDANTS IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) INFECTED
WITH PURPLE TOP SYNDROME**

By

ARELI GONZALEZ CORTES

MASTER

GRAIN AND SEED TECHNOLOGY

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO, JANUARY 2012**

MP. MARÍA ALEJADRA TORRES TAPIA– ASESOR –

ABSTRACT

Key words: purple top, potato, *Candidatus Liberibacter solanacearum*, phytoplasma, psyllid and PCR (Polymerase Chain Reaction).

This investigation was made in Laboratory and Greenhouse of Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Saltillo (INIFAP-CESAL) and in the Laboratories of Phytochemical and Biotechnology of Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, with the objective of evaluate the effect of three antioxidants against purple top in potato culture Vivaldi variety, from transplanting of seedling to harvest, for plant material were used potato plants (*Solanum tuberosum* L.), Vivaldi variety positives and negatives to *Candidatus Liberibacter solanacearum* proceeding from field and from germplasm bank in vitro of laboratory of plant tissue culture of INIFAP in Saltillo. The treatments evaluated were dehydroascorbic acid (600 ppm), ascorbic acid (600ppm) and hydrogen peroxide (1 mM), in next combinations: T1 Plants with Potato Purple Top (PPT)+Ascorbic acid, T2 Plants with PPT+Dehydroascorbic acid, T3 Plants with PPT+Hydrogen peroxide, T4 Plants with PPT+without antioxidants, T5 Healthy Plants+psyllids+Ascorbic acid, T6 Healthy Plants+psyllids+Dehydroascorbic acid, T7 Healthy Plants+psyllids+Hydrogen peroxide, T8 Healthy Plants+psyllids Without antioxidant, T9 Plants with PPT+psyllids+Ascorbic acid, T10 Plants with PPT+psyllids+Dehydroascorbic acid, T11 Plants with PPT+psyllids+Hydrogen peroxide,

T12 Plants with PPT+psyllids Without antioxidant, T13 Healthy Plants+Ascorbic acid+600 ppm, T14 Healthy Plants+Dehydroascorbic acid, T15 Healthy Plants+Hydrogen peroxide, T16 Healthy Plants Without antioxidant, each treatment was formed by 3 replicates with three experimental units by replicate. The variables evaluated were: Seedling longitude (SL), leaves number (LN), leaflets number (LN), tuber polar and equatorial diameter (TPED), tubers weight (TW), tuber sprout kind (TSK) and tubers brown percentage (TBP). The information was analyzed by means a random complete design with factorial arrangement and three replicates, it was used the statistical SAS version 6.0 (1989). The results obtained point that there are very significant differences among treatments in variables studied. It was found that dehydroascorbic acid at 600 ppm applied on plants infested with PPT increases biomass accumulation with increase of foliar height, as soon as the leaves number and leaflets in healthy plants and posterior infestation with psyllids, however, when psyllids number is higher the protection of plant is reduced, it can to die and don't arrives to harvest. The Ascorbic Acid at 600 ppm, increases the biomass accumulation with increase of foliar height, number of leaves and leaflets in healthy plants, but don't gives protection to plants with PPT.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
COMPENDIO	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
I.- INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
Hipótesis.....	3
II REVISION DE LITERATURA	4
El cultivo de <i>Solanum tuberosum</i> L.....	4
Síndrome Punta Morada de la Papa (SPMP).....	6
<i>Candidatus Liberibacter</i> spp.....	9
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	11
Fitoplasmas.....	12
Vectores.....	13
<i>Bactericera cockerelli</i> Sulc.....	15
Técnicas para el diagnóstico de fitoplasmas.....	17
Defensa de las plantas ante el ataque de patógenos	18
III. MATERIALES Y METODOS	20
Localización del lugar de trabajo.....	20
Material vegetal.....	21
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	21
Extracción de ADN.....	21
Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> por medio de PCR.....	22

Establecimiento del experimento.....	23
Fase I: Multiplicación <i>in vitro</i> de las plántulas de papa.....	23
Fase II: Establecimiento en invernadero.....	24
Tratamientos evaluados.....	26
VARIABLES EVALUADAS.....	28
Longitud de la planta.....	28
Número de hojas.....	28
Número de folíolos.....	28
Número de tubérculos.....	29
Diámetro polar y ecuatorial.....	29
Peso de los tubérculos.....	30
Tipo de brote del tubérculo.....	30
Porcentaje de pardeamiento de los tubérculos.....	30
Diseño experimental.....	30
Análisis estadístico.....	31
IV RESULTADOS Y DISCUSION	32
Fase I: Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i>	32
Fase II: Producción en Invernadero.....	35
Fase II: Rendimientos de Producción.....	41
V CONCLUSIONES	45
VI RESUMEN	47
VII LITERATURA CITADA	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1.- Duración del ciclo biológico de <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc.....	16
Cuadro 3.2.- Tratamientos evaluados con tres antioxidantes diferentes, en plantas de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) sanas e infectadas con síndrome de la punta morada.....	27
Cuadro 4.3.- Comparación de medias de Altura foliar, Número de hojas, Número de folíolos, obtenidas durante el desarrollo del cultivo de <i>Solanum tuberosum</i> L. bajo condiciones de invernadero al aplicar diferentes tratamientos.....	35
Cuadro 4.4.- Comparación de medias de Número de tubérculos, Diámetro polar y ecuatorial de los tubérculos y peso total del tubérculo, obtenidos durante la etapa de cosecha de <i>Solanum tuberosum</i> L. bajo condiciones de invernadero al aplicar diferentes tratamientos.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1.- Aclimatación <i>in vivo</i> de vitroplantas de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) en sustrato estéril, bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.....	25
Figura 3.2.- Trasplante de plántulas de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) <i>in vivo</i> , después de aclimatación en sustrato estéril bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.....	26
Figura 3.3.- Vernier electrónico, que se utilizó para la determinación de los diámetros polares y ecuatoriales de los minitubérculos. de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) en sustrato estéril, bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.....	29
Figura 4.4.- Multiplicación <i>in vitro</i> a partir de una planta madre de papa var. Vivaldi sintomática a PMP proveniente de campo, y positiva a <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> . a) planta sintomática de PMP con tubérculos aéreos, entrenudos cortos y engrosados; b) Multiplicación <i>in vitro</i> de plántulas provenientes de plantas con PMP en envases de polipropileno con medio de cultivo MS.....	33
Figura 4.5.- Productos de amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R y DNA de plantas de papa var. Vivaldi desarrolladas <i>in vitro</i> con síntomas de PMP y planta sana. A. Carriles 1, 3, 4, 5 y 6: Plantas de papa var. Vivaldi desarrolladas <i>in vitro</i> a partir de plantas sintomáticas a PMP colectadas en campo, carril 2: Planta sana. B. Carriles del 7-17: Plantas de papa var. Vivaldi desarrolladas <i>in vitro</i> a partir de plantas sintomáticas a PMP colectadas en campo, indicando la presencia de <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en las muestras, Carril 18: Testigo positivo.....	34
Figura 4.6.- Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Altura Foliar (AF), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).....	38
Figura 4.7.- Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Número de Hojas (NH), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).....	40
Figura 4.8.- Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Número de Foliolos (NF), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).....	41
Figura 4.9.- Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Número de Tubérculos (NT), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).....	42

Figura 4.10.- Plantas de papa var. vivaldi desarrolladas en invernadero a) plantas sanas con 60 días de edad; b) plantas de papa enfermas de PMP colonizadas con psílicos vectores de PMP; c) Colonización de psílicos con la presencia de huevecillo y ninfas en desarrollo, infestando los folíolos de la planta de papa var. Vivaldi, bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010..... 43

I.INTRODUCCIÓN

La producción de papa es una actividad económica muy importante dentro de la agricultura en México. Es el cuarto cultivo básico después del maíz, trigo y arroz, produce mayor cantidad de materia seca y proteínas por hectárea que los principales cultivos de cereales (Fernie y Willmitzer, 2001). Sin embargo, existen diversos factores que limitan la rentabilidad de este cultivo, tal es el caso del síndrome de punta morada, conjunto de síntomas desarrollados principalmente por el ataque de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas (organismos pleomórficos sin pared celular que habitan en el floema de las plantas; Lee *et al.*, 2004). Este problema se presenta en las principales zonas paperas de México y disminuye el rendimiento y calidad comercial de semilla-tubérculo en un rango de 30 a 95%; durante los años 2003 y 2004 la incidencia de punta morada se incrementó notablemente en las regiones productoras de Coahuila y Nuevo León, con pérdidas de hasta el 100% (Flores *et al.*, 2004).

Actualmente las medidas empleadas para combatir la enfermedad no han sido eficientes. Los estudios realizados para la comprensión de mecanismos de patogenicidad de fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter solanacearum* son restrictivos y la incapacidad de reproducir estos fitopatogenos *in vitro* ha obstaculizado su caracterización a nivel molecular.

Por lo anterior, la presente investigación tuvo como finalidad evaluar la efectividad de tres antioxidantes (Ac. dehidroascorbico, Ac. Ascórbico y Peróxido de hidrogeno), para atenuar la expresión sintomática del síndrome de punta morada de la papa y determinar la asociación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* con la presencia de la enfermedad, planteando los siguientes objetivos:

Objetivo general

- ✓ Evaluar la eficiencia de tres antioxidantes para reducir el daño causado por el síndrome de punta morada de la papa.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de campo e invernadero.
- ✓ Cultivar *in vitro* plantas infectadas con el síndrome de punta morada de la papa.
- ✓ Evaluar bajo condiciones de invernadero el uso de antioxidantes para atenuar el daño ocasionado por el síndrome de punta morada de la papa.

Hipótesis

El uso de antioxidantes, proveen a las plantas mecanismos de defensa que impiden el desarrollo de patógenos, e inducen estrategias que permiten establecer respuestas hacia el estrés.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El cultivo de *Solanum tuberosum* L.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo importante en todo el mundo, y constituye en la actualidad el cuarto más importante después del trigo, maíz y arroz. En México es una de las hortalizas que se cultiva en todo el año agrícola, producto que forma parte de los principales alimentos para el ser humano.

La FAOSTAD (2008), menciona que en México el consumo *per cápita* de papa es de 17 kg y ocupa el quinto lugar en importancia dentro de los principales países productores de papa.

Por su parte Estrada (2000), señala que el cultivo es de gran valor alimenticio debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, lo cual no es común en las proteínas de otras plantas.

Este cultivo provee al menos 12 vitaminas esenciales, incluyendo altas cantidades de vitamina C, minerales y también proporciona cantidades significativas de hierro y carbohidratos (Bolaños, 2000).

La superficie sembrada de papa en México es de 65,617.05 ha, con una producción anual de 1'750,797.34 toneladas, que se destina al consumo interno, un rendimiento promedio de 27.06 t ha⁻¹, con un valor estimado de producción de \$7'762,137.76 (SIAP, 2007). No obstante, existen diversos factores que limitan su rentabilidad, siendo los fitosanitarios los de mayor importancia (Martínez *et al.*, 2007). El cultivo se ve severamente afectado por fitopatógenos (Salazar; 1997), lo que provoca una serie de enfermedades que afecta la rentabilidad del cultivo, entre las principales se encuentra el Síndrome Punta Morada de la Papa (SPMP), Amarillamiento del Psílido (AP) y Zebra Chip (ZC).

Al respecto, Cárdenas (1989), hace énfasis en la problemáticas que enfrenta el cultivo de la papa que es la insuficiencia de semillas de buena calidad, la transferencia de enfermedades por factores bióticos (fitopatógenos), elevados costos de importación de semilla élite, transporte, almacenamiento y refrigeración.

Hooker (1980) y Lecaros (1978), indican que la calidad fitosanitaria de la semilla – tubérculo de papa es uno de los factores importantes para un buen rendimiento.

Valdéz *et al.* (2009), mencionan que una gran superficie de papa es sembrada con tubérculos pequeños o de mala calidad sanitaria que no se comercializaron, lo cual trae como consecuencia, bajos rendimientos, una gran proliferación de enfermedades y sobre todo altos costos de producción.

Quiñones e Izquierdo (2002), mencionan que la producción de semilla para obtener un material de siembra con un alto grado de pureza varietal y calidad fitosanitaria, requiere de una alta exigencia tecnológica, debido a que la papa está expuesta al ataque de hongos, bacterias, fitoplasmas, virus, viroides y nematodos; estos patógenos son los causantes de las enfermedades que ocasionan grandes pérdidas del cultivo, como es el caso de la enfermedad conocida como Síndrome Punta Morada de la Papa (SPMP).

Síndrome Punta Morada de la Papa (SPMP)

En los últimos años el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) se ha visto afectado por el síndrome punta morada, que es ocasionado por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* y/o por fitoplasmas disminuyendo la calidad de los tubérculos al inducir la acumulación de metabolitos ocasionándoles un manchado interno que los hace inadecuados para la industria.

Los síntomas que presentan la planta en campo son achaparramiento, enrollamiento apical, entrenudos cortos, coloración purpura en los folíolos, clorosis, formación de tubérculos aéreos, proliferación de brotes axilares engrosados en la base. En cosecha los tubérculos presentan cierto grado de pardeamiento en la pulpa y producen brotes anormales o ningún brote (INIFAP, 2000).

Martínez *et al.* (2007), hacen énfasis en que los síntomas observados van a depender de ciertos factores como: la variedad, el estado fenológico, condiciones ambientales del cultivo, origen y tiempo de inicio de la infección, así como del tipo de órgano afectado.

Leyva *et al.* (2000), mencionan que la PMP es una enfermedad relacionada con los fitoplasmas punta morada de la papa (potato purple top) miembro del grupo 16Sr1 (Aster yellow), el brote ahilado (potato hair sprout) situado en el grupo 16SrII (peanut WB). Lee *et al.* (2004), lo asocian al Columbia basin potato purple top phytoplasma ubicado en el grupo Clover proliferación subgrupo A (16SrVI-A). Este síndrome también está asociado a factores abióticos y a la alimentación por el psilido de la papa particularmente de ninfas que al succionar la savia inyectan una toxina sistémica a la planta (Cranshaw, 2002).

La punta morada al igual que otras enfermedades produce desordenes metabólicos, que se reflejan en la disminución de crecimiento de la planta, así como en el desarrollo, calidad y rendimiento de los tubérculos, estos desordenes están relacionados con la interacción planta-fitoplasma y/o *Candidatus Liberibacter solanacearum* y con la toxina que inyecta al alimentarse el insecto vector *Bactericera cockerelli*.

La distribución del problema se encuentra presente en menor o mayor grado en las principales zonas productoras de papa del país (Rubio *et al.*, 2006). En la región de Coahuila y Nuevo León el problema de PMP como un factor limitante del cultivo de papa. Durante el 2004 los rendimientos se redujeron de

35 a 20 ton/ha, la calidad de la papa en cuanto a tamaño, manchado y freído se vio severamente mermada (Flores-Olivas *et al.*, 2004). Los intentos por reducir los efectos de la enfermedad (calidad de tubérculos afectados) mediante métodos tradicionales como el combate químico con frecuencia no logran interferir en la expresión de la enfermedad, por otra parte el mejoramiento genético en la actualidad no cuenta con fuentes de resistencia que permitan reducir el daño del problema (Flores-Olivas *et al.*, 2004).

Niderhauser (1980), considera el problema como nutricional, también, como daño de *Fusarium* y de nematodos, enmascarando los síntomas con la aplicación de fertilizantes foliares.

Actualmente, está comprobado científicamente que la punta morada es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* y por fitoplasma, transmitidos únicamente por chicharritas y psílidos como *Bactericera cockerelli*. Los síntomas son; amarillez, clorosis con los bordes de las hojas moradas, enchinamientos, achaparramiento, tubérculos aéreos y reducción del rendimiento debido a que los tubérculos no se desarrollan (Almeyda- León, 2002).

La punta morada se presenta en la mayoría de las zonas productoras de papa, independientemente de la temperatura, humedad relativa y días nublados o con sol. Lo único que se requiere para que ésta enfermedad aparezca, es la presencia de chicharritas y/o psílidos (García, 1999).

El Amarillamiento del Psílido (AP) es ocasionado por la inyección de toxinas durante la alimentación del psílido *Bactericera cockerelli* Sulc (Severin, 1940; Wallis, 1948; Liu *et al.*, 2006), la PMP por fitoplasmas (Ramírez *et al.*, 1978; Cadena *et al.*, 1986; Cadena, 1996; Cadena *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Garzón *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Alarcón, 2007; Martínez *et al.*, 2007), y Zebra Chip (ZC) por *Candidatus Liberibacter psyllae* (Hansen *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2009; Liefing *et al.*, 2009). Los ensayos realizados por diversos investigadores mencionan una asociación del psílido *B. cockerelli* con la presencia y diseminación de las tres enfermedades antes mencionadas (AP, PMP y ZC); por lo que para asegurar el rendimiento y la calidad de la producción, se han implementado prácticas como el establecimiento de fechas de siembra, eliminación de focos de infestación, uso de semilla-tubérculo sano, de enemigos naturales y el uso intensivo de agroquímicos con la finalidad de disminuir las poblaciones del psílido y en consecuencia reducir la incidencia de las enfermedades (Avilés *et al.*, 2003).

Candidatus Liberibacter

Las bacterias no cultivables (BNC) descritas más recientemente se conocen como *Candidatus Liberibacter*, y se les considera las más importantes de todas por su amplia distribución en México y el grado de daño que le causan a las hortalizas como es el caso de la papa y el tomate.

Las bacterias agrupadas dentro del género *Candidatus Liberibacter* spp., colonizan el floema de sus plantas hospedantes y la dificulta para cultivarlas *in*

vitro ha imposibilitado su ubicación taxonómica y por tanto se mantiene bajo la condición de *Candidatus*, término que antecede al género y especie debido a que no se puede tener en una colección biológica. La bacteria fue observada por primera vez en 1970 afectando el floema de hojas de naranja (Lafleche y Bove, 1970), enfermedad que en ese entonces se considero que era inducida por un organismo tipo micoplasma (MLO). Mediante microscopia electrónica de transmisión se determino que su tamaño era mucho menor a un micoplasma y muy similar al de las bacterias, por lo que se le llamo organismo tipo bacteria (BLO) (Garnier *et al.*, 1984). Su caracterización bioquímica es nula dada la dificultada para aislarla en medio de cultivo puro. La microscopía electrónica y técnicas citoquímicas, ha revelado que la bacteria *Ca. Liberibacter*, está rodeada por una membrana celular compuesta de peptidoglicano, típica de las gram negativas (Garnier *et al.*, 1984). Después de comparar su secuencia de nucleótidos con otras bacterias registradas en el GenBank, se propuso como miembro de las *Eubacteria*. El análisis filogenético del gen 16S rRNA indica que estas bacterias pertenecen al grupo de las *Alphaproteobacterias* donde se encuentran otros miembros como *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Bradyrhizobium*, entre otras (Jagoueix *et al.*, 1994).

A finales del 2008 se reportaron nuevas especies de *Ca. Liberibacter* asociadas a solanáceas, como tomate, chile y papa; se indica que el psilido *Bactericera cockerelli* (Sulc), saltador de la papa, es el responsable de transmitir esta bacteria (Liefting *et al.*, 2008).

Candidatus Liberibacter solanacearum

En los últimos años se ha descrito en el sudoeste de EE.UU. un desorden en papas para fritura que causa el oscurecimiento interno de los tubérculos crudos y un color oscuro de las hojuelas. La decoloración se muestra a menudo como rayas o franjas y se ha usado el nombre común de “hojuelas zebra chip” (ZC) para describirla. La enfermedad ha sido asociada con el psílido de la papa *Bactericera cockerelli*, pero recientemente se ha descrito un patógeno que se sospecha está asociado con el ZC (James y Munyaneza, 2009).

Morris *et al.* (2009), informaron de una especie nueva de *Liberibacter*, a la que llamaron *Candidatus Liberibacter psyllaorous* y *Candidatus Liberibacter solanacearum*, actualmente son considerados sinónimos. Esta nueva especie ocasiona la enfermedad llamada comúnmente permanente del tomate, y posee características diferentes a las especies ya conocidas, pues infecta solamente solanáceas: papa, tomate y chile, principalmente, además de haber sido hallado en su supuesto vector, el psílido *Bactericera cockerelli*. El papel que juega el psílido en su transmisión fue confirmado por Garzón-Tiznado *et al.* (2009).

Candidatus Liberibacter solanacearum es una bacteria no cultivable (BNC), Gram-negativa (Garnier y col., 1984, Jagoueix y col., 1994), que se aloja en los vasos conductores de savia del floema de algunos géneros de plantas de la familia de las rutáceas. Su tamaño varía de 350-550 x 600-1500 nm y un grosor de 20-25 nm. Generalmente son cuerpos en forma de barras y pleomórficas

durante su crecimiento (Batool *et al.*, 2007). Tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivales de su vector, *B. cockerelli*.

Entre los hospedantes cultivados de *Ca. Liberibacter solanacearum*, se encuentran: Chile (*Capsicum annuum*), papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), tomate de cáscara (*Physalis* spp.) (Hansen *et al.*, 2008).

El vector de la enfermedad es el psílido, *Bactericera cockerelli* (Garzón *et al.*, 2009). Su transmisión es circulativa. Se ha encontrado el patógeno en los huevecillos del psílido, lo cual deja abierta la posibilidad de que el patógeno se transmita a la descendencia de este insecto.

La forma de transmisión del patógeno es persistente, y se puede realizar de un día para otro. De esta forma, el psílido adquiere el patógeno de una planta enferma en 15 a 30 minutos y puede transmitirlo al día siguiente, también en unos cuantos minutos.

Fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular que se agrupan en la clase Mollicutes, habitan en los tubos cribosos del floema y en raras ocasiones en células del parénquima flemático de las plantas infectadas y causan enfermedades en varias especies vegetales (Lietting *et al.*, 2004). Los cuerpos de estos fitopatógenos contienen un enrejado fibrilar de hebras que se supone

son ADN y áreas con gránulos semejantes a ribosomas, son los procariontes más pequeños capaces de autoreplicarse (Lee *et al.*, 2000).

Al respecto Salazar (1996), menciona que los fitoplasmas son considerados agentes causales de más de 300 enfermedades en cientos de especies de plantas (Chang, 1998), sin embargo, en la papa se han reportado varias enfermedades producidas por estos organismos, tales como escoba de bruja (WB), filodia de la papa (PP), marchites de la punta morada (PTW). En México, Almeyda *et al.* (1999) y Leyva *et al.* (2002), registraron dos tipos diferentes de fitoplasmas asociados con los síntomas de la PMP.

Entre los agentes causales de mayor incidencia de la PMP está el fitoplasma asociado con el Western aster yellows del Grupo I, con base en la clasificación internacional de fitoplasmas (Leyva *et al.*, 2002; Salazar, 1997; Munyaneza *et al.*, 2005) y a su vector (*Bactericera cockerelli*). Los fitoplasmas en las plantas presentan títulos muy bajos y su distribución en el hospedante no es uniforme, por lo que su identificación y clasificación requiere usar técnicas moleculares (Levy *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Bertaccini *et al.*, 1996). Los fitoplasmas se transmiten mediante insectos que se alimentan de la savia de las plantas (Mc Coy *et al.*, 1998).

Vectores

Los insectos, en particular los áfidos son los vectores más importantes de los virus, mientras que las chicharritas son los principales vectores de fitoplasmas

y/o *Ca. Liberibacter solanacearum*. Cada uno de estos patógenos es transmitido por vía interna por una o unas cuantas especies de insectos, cuando éstos se alimentan o desplazan de planta en planta. En todas las enfermedades en las que el patógeno es transportado interna o externamente por uno o varios vectores específicos, la dispersión del patógeno depende en gran medida o por completo de su(s) vector(es).

Lee *et al.* (1998), señalan que las especies de plantas que pueden ser infectadas por un tipo de fitoplasmas en la naturaleza están en función del número de insectos vectores que son capaces de transmitirlo. Hasta ahora los vectores reconocidos de fitoplasmas son principalmente chicharritas, insectos pertenecientes a las familias Cicadellide y Fulgoroidea que se alimentan de la savia de las plantas y al hacerlo adquieren o inoculan a los fitoplasmas (Martínez – Soriano *et al.*, 2007).

En el cultivo de la papa se han reportado 12 especies de insectos vectores de fitoplasmas; algunas especies son: *Macrosteles orientalis*, *M. mascifrons*, *M. striifrons*, *Scleroracus flavopictus*, *Orosius albicinctus* y *Alebroides dravidamus* (Maramorosch, 1998). *Empoasca* spp., *Aceratagallia* spp. y la especie *Bactericera cockerelli* son vectores de fitoplasmas en México (Almeyda *et al.*, 2004; Garzón *et al.*, 2004).

Los fitoplasmas son organismos que en relación con su vector, son considerados patógenos transmitidos en forma persistente; por lo tanto requieren de largos periodos de adquisición. La gran mayoría son transmitidos

en periodos de 2 a más de 30 días de adquisición, aunque algunas variantes del amarillamiento del áster pueden ser transmitidas entre 8 y 24 horas. En todos los casos hasta ahora estudiados, los vectores de fitoplasmas requieren de un periodo de incubación (desde la adquisición hasta la transmisión) (Salazar, 1996).

El psílido de la papa, *Bactericera cockerelli*, causa daños a las plantas de papa alimentándose en ellas y infectándolas con la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Esta bacteria es la culpable de la enfermedad conocida como “hojuelas de cebra” (zebra chip). Este nombre se refiere a las rayas oscuras que se forman dentro de los tubérculos cuando estos se cortan y preparan como hojuelas de papas fritas. Los brotes de ZC causados por la alimentación de los psílicos han causado millones de dólares en pérdidas para el sector de la papa en EE.UU. y México (UCDavis, 2008).

***Bactericera cockerelli* Sulc.**

La paratrioza o pulgón saltador (*Bactericera cockerelli* Sulc.) es una plaga que se alimenta de la savia de las plantas hospederas, el insecto se reproduce sexualmente y pasa por los estados de huevecillo, ninfa (cinco estadíos) y adulto, la duración de cada estadio se muestra en el Cuadro 2.1, la temperatura ideal para su desarrollo es a 23° C., ocasionando dos tipos de daños:

1. Daño directo: Es provocado por la inyección de una toxina, la cual es transmitida únicamente por las ninfas. Esta toxina ocasiona que las plantas se

vean amarillentas y raquílicas, afectando el rendimiento y la calidad de frutos y tubérculos.

2. Daño indirecto: Es considerado más importante que el daño directo, ya que es ocasionado por los fitoplasmas, los cuales son transmitidos tanto por las ninfas como por los adultos. Estos son los responsables de las enfermedades conocidas comúnmente como la punta morada de la papa en dicho cultivo y del permanente del tomate en el cultivo de jitomate (CESAVEM, 2010).

El psílido tiene hábitos migratorios, alcanzando vuelos de hasta 1.5 km de altura. Se presenta con mayor incidencia en zonas agrícolas de monocultivo de papa, jitomate, tomate de cáscara y chile, llegando a éstos desde cultivos de otras regiones y sus hospedantes silvestres. En algunos lugares el insecto desaparece durante el invierno, emigrando a grandes distancias en busca de alimento (CESAVEM, 2010).

Cuadro 2.1 Duración del ciclo biológico de *Bactericera cockerelli* Sulc.

Estado/estadio	Días *
Huevo a Ninfa 1	5.50
Ninfa 1 a Ninfa 2	4.10
Ninfa 2 a Ninfa 3	3.60
Ninfa 3 a Ninfa 4	4.10
Ninfa 4 a Ninfa 5	3.60
Ninfa 5 a Adulto	6.10
Total	27

Fuente: CESAVEM, 2010

Técnicas para el diagnóstico de fitoplasmas

Regularmente los fitoplasmas en plantas infectadas se presentan en cantidades muy bajas y su distribución en el hospedero no es uniforme; por tal motivo, su identificación y clasificación es difícil. Los métodos tradicionales de detección de fitoplasmas usan la sintomatología conocida asociada con la cepa en cuestión, y la microscopía para localizar los organismos. Poghosyan y Lebsky (2009) proponen que la microscopía electrónica de barrido es una herramienta para la detección de fitoplasmas en el floema de plantas infectadas por su alta resolución y por mostrar estructuras en tercera dimensión aparte de ser una técnica rápida y precisa.

Las pruebas serológicas de ELISA (Ensayos Inmunoabsorbentes de Enzimas Ligadas), permitieron la detección e identificación de cepas de fitoplasmas específicos, dando como resultado el reconocimiento de varios grupos y subgrupos (Martínez – Soriano *et al.*, 2007).

Actualmente, los sistemas de clasificación basados en técnicas moleculares han reemplazado a la taxonomía biológica tradicional; como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es una herramienta que permite una detección rápida y sencilla con alto nivel de sensibilidad para el diagnóstico de plantas e insectos vectores (Lee *et al.*, 1998; Seemuller *et al.*, 1998).

Defensa de las plantas ante el ataque de patógenos

En general, las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo.

La primera línea de defensa de las plantas ante el ataque de los patógenos es su superficie, la cual estos últimos deben penetrar para causar infección. Algunas defensas estructurales se encuentran ya en las plantas incluso antes de que el patógeno entre en contacto con ellas. Esas estructuras incluyen la cantidad y la calidad de la cera y de la cutícula que cubren a las células epidérmicas, la estructura de las paredes celulares de estas últimas, el tamaño, localización y forma de los estomas, lenticelas y por último, la presencia en la planta de tejidos protegidos por paredes celulares gruesas que obstaculizan el avance del patógeno (Agrios, 1998).

En las plantas, algunos metabolitos como el ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno están involucrados en el establecimiento de resistencia sistémica adquirida (RSA) para la activación de genes de defensa y producción de barreras físicas después del ataque de algún patógeno (Camarena *et al.*, 2007).

Algunos autores reportan que la aplicación exógena de ácido salicílico en plantas infectadas por diversos patógenos (virus, bacterias y hongos) induce la

expresión de genes y promueve la resistencia (Murphy *et al.*, 2001). También es extenso el conocimiento sobre el efecto de la aplicación exógena de ácido salicílico en diversas especies vegetales en procesos de productividad, crecimiento, fotosíntesis y actividad enzimática en plantas expuestas a varios tipos de estrés bióticos y abióticos (Hayat *et al.*, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del lugar de trabajo

El presente trabajo de investigación se llevo a cabo durante los años 2009-2011, y se dividió en dos fases: Laboratorio e invernadero.

La primera fase se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Saltillo (INIFAP-CESAL) ubicado en la Delegación de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en Saltillo Coahuila, México, que tiene una ubicación geográfica de 25° 26' 11.86" latitud y 100° 55' 26.02" de longitud, a 1577 msnm. y en los laboratorios de fitoquímica y biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la cual tiene una ubicación geográfica de 25° 72' 47" latitud N y 100° 31' 47" longitud E, a 512 msnm

La segunda fase se realizó en el invernadero de producción de semilla de papa del INIFAP-CESAL, con una ubicación geográfica de 25° 27' 55.2" latitud N y 101° 00' 09.1" longitud O, a 1521.

Material vegetal

Se utilizaron plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Vivaldi positivas y negativas a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, provenientes del campo y del banco de germoplasma *in vitro* del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.-Campo Experimental Saltillo (INIFAP-CESAL).

Para realizar la micropropagación de las plantas infectadas con PMP, se colectaron en campo en el municipio de Galeana, Nuevo León, en el año 2009, diez muestras de plantas con síntomas de PMP, a estas muestras se les realizó una extracción de ADN y un análisis de PCR, para verificar si realmente estaban infectadas con la bacteria *Ca. Liberibacter solanacearum*, las técnicas aplicadas para cada análisis se mencionan a continuación:

Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Extracción de ADN

Para poder realizar la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* por medio de la PCR, a las plantas colectadas se les realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito por Almeyda (2007), que consistió en triturar 250 mg de tejido en 2 mL de solución 2-ME/CTAB precalentada a 65°C, con β mercaptoetanol a una concentración de 0.2%, alrededor de 750 ml de la

muestra macerada se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y se sometieron a incubación durante 45 min (minutos) a 65 °C, después del período de incubación se agregó un volumen de sevag (cloroformo-álcohol isoamílico 24:1) y se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, después se recupero la fase acuosa y se le agrego 1 volumen de sevag y posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, nuevamente se recupero la fase acuosa y se le agrego 0.5 volumen de acetato de amonio (7.5 M), y se dejo 10 min en hielo y después se centrifugo por 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Para precipitar el ADN, al volumen recuperado se le agrego 0.6 volumen de isopropanol y se dejo precipitar toda la noche a temperatura ambiente. Después de la precipitación se centrifugo a 10,000 rpm durante 20 minutos y después se elimino el sobrenadante, el precipitado se lavo dos veces con etanol al 70% frío (centrifugando a 10,000 rpm durante 15 min), el precipitado se seco a temperatura ambiente y se re suspendió en 100 µL de agua mQ estéril y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Detección de *Ca. Liberibacter solanacearum*. por medio de PCR

El ADN de las diez plantas colectadas fue sometido a la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo el protocolo descrito por Almeyda, 2007-, en el cual se utilizaron el par de iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R: (5'-CTGATCATGGCTCAGAACGA-3'/5'-CGGCGAAAGAGCTTTACAAC-3'), que

amplifican un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de *Ca. Liberibacter solanacearum*.

La reacción de PCR se preparó en un tubo Ependorf con un volumen final de 25 μ L que contenía: Buffer de reacción 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP's 200 μ M, Iniciadores 0.5 μ M, Taq Polimerasa 1.5 U y 50 ng de ADN. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Px2 Thermal cycler) y las condiciones de amplificación fueron: Un ciclo a 94°C por 2 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min y un ciclo final a 72°C por 10 min. Las muestras de PCR se fraccionaron en geles de agarosa al 1.5 %, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μ g por ml de buffer) y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

Establecimiento del experimento

Fase I: Multiplicación *in vitro* de las plántulas de papa

Como material vegetal para el experimento se micropropagaron vitroplantas positivas y negativas a *Ca. Liberibacter* y a fitoplasmas bajo el esquema descrito por Espinoza (1985) y Villavicencio *et al* (2009), seleccionando segmentos de tallo y yema (explantes), que fueron establecidos en envases de polipropileno con medio semisólido Murashige y Skoog (1962), que constó de los siguientes compuestos orgánicos por litro: sacarosa 30 g, glicina 2mg, tiamina 0.10mg, mio-inositol 100 mg y como agente gelificante: Agar (6 g). A cada envase se le colocaron 25 explantes los cuales fueron incubados a 25 ± 2

°C, con un fotoperiodo de 16 h luz, y una intensidad lumínica de 4000 lux. Se efectuaron 5 etapas de micropropagación exponencial de dichos explantes.

Fase II: Establecimiento en invernadero (Segunda fase)

Para poder someter a aclimatación las vitroplántulas, se siguió el protocolo de Villavicencio *et al.* (2009) en el cual mencionan que para poder aclimatar una vitroplanta, esta tiene que tener una altura de 5 a 7 cm, con raíces bien formadas y por lo menos tres hojas verdaderas. A los 30 días de edad la mayoría de las vitroplantas presentaron las características antes mencionadas, a estas se les extrajo de sus contenedores, para posteriormente ser lavadas con abundante agua para eliminar del sistema radicular los restos del medio de cultivo y evitar su contaminación en el sustrato. Se acomodaron en papel húmedo y se llevaron al invernadero, para su transplante, se transfirieron a suelo utilizando un sustrato esterilizado que se colocó en charolas de polipropileno de 72 cavidades acondicionadas con un domo. Se establecieron 72 plantas/contenedor. Como sustrato para el enraizamiento se utilizó peat moss y agrolita en una relación 2:1, durante este proceso se cuidaron los factores que controlan el ambiente de crecimiento, como la temperatura del invernadero y se aplicaron riegos por nebulización periódicamente con una solución nutritiva, las plantas se colocaron en un minitunel cubierto de Agribón, como se muestra en la Figura 3.1.



Figura 3.1 Aclimatación *in vivo* de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*) en sustrato estéril, bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.

Este proceso se realizó durante 20 días que fue el periodo en que las vitroplantas desarrollaron tres yemas axilares y hojas bien desarrolladas, posteriormente estas fueron transplantadas en macetas (16 cm de ancho por 12 cm de profundidad) en una mezcla 2:1 de “peat moss” y agrolita v/v y con un peso conocido como sustrato (Figura 3.2). Las plantas se mantuvieron con temperatura de 14-26°C bajo fotoperíodo natural.

Se realizaron las labores necesarias como riego aforques y fertilización hasta alcanzar el tiempo y madurez requerida la cual duro 120 ddt. En el desvare se taparon los tubérculos para evitar en lo posible su deshidratación, después de quince días se procedió a cosechar, esta se realizó de manera manual.



Figura 3.2 Trasplante de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) in vivo, después de aclimatación en sustrato estéril bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.

Tratamientos evaluados

Los antioxidantes o señalizadores evaluados fueron; ácido dehidroascorbico (600 ppm), ácido ascórbico (600 ppm) y peróxido de hidrogeno (1mM). La aplicación de los productos se realizó con una aspersora manual Cybor, con capacidad de 2 L, esta cuenta con una boquilla de aspersion regulable, en cada planta se asperjaron 20 mL del producto a evaluar, las aplicaciones se realizaron dos veces por semana a partir de los 20 días después del trasplante (ddt) hasta cosecha, realizando un total de 32 aplicaciones durante el desarrollo del cultivo, los testigos positivos y negativos se asperjaron con 20 mL/planta de agua destilada, en todos los tratamientos se homogenizo el pH a 5.7 (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2 Tratamientos evaluados con tres antioxidantes diferentes, en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) sanas e infectadas con síndrome de la punta morada.

No. Tratamiento	Estado de la planta	Antioxidante	Cantidad/Lt.
1	Plantas con PMP	Acido ascórbico	600 ppm
2	Plantas con PMP	Acido dehidroascorbico	600 ppm
3	Plantas con PMP	Peróxido de hidrogeno	1 mM
4	Plantas con PMP	Sin antioxidante	---
5	Plantas sana+psílicos	Acido ascórbico	600 ppm
6	Plantas sana+psílicos	Acido dehidroascorbico	600 ppm
7	Plantas sana+psílicos	Peróxido de hidrogeno	1 mM
8	Plantas sana+psílicos	Sin antioxidante	---
9	Plantas con PMP+psílicos	Acido ascórbico	600 ppm
10	Plantas con PMP+psílicos	Acido dehidroascorbico	600 ppm
11	Plantas con PMP+psílicos	Peróxido de hidrogeno	1 mM
12	Plantas con PMP+psílicos	Sin antioxidante	---
13	Plantas sanas	Acido ascórbico	600 ppm
14	Plantas sanas	Acido dehidroascorbico	600 ppm
15	Plantas sanas	Peróxido de hidrogeno	1 mM
16	Plantas sanas	Sin antioxidante	---

Variables evaluadas

A partir de la primera aplicación de los tratamientos, la cual se realizó a los 20 ddt, cuando la planta tenía 50 días de edad se empezaron a evaluar las siguientes variables:

Longitud de la planta

Para determinar el efecto de los tratamientos, durante todo el ciclo del cultivo a partir de los tres días después de la primera aplicación de los tratamientos, se empezó a medir la longitud de la planta, esta medición se realizó desde el cuello de la planta hasta la axila de la hoja más joven, esta se midió con una regla graduada de 50 cm, posteriormente las mediciones se realizaron cada 3 días hasta llegar al desvare, para la preparación de la etapa de cosecha.

Número de hojas

A los 23 ddt se empezó a evaluar el número de hojas simples, mediante observación, el número de hojas se contabilizó a partir de la tercera hoja desarrollada para posteriormente contabilizar hasta desvare, con un total de 32 evaluaciones.

Número de folíolos

A los 40 ddt la planta empieza a desarrollar los folíolos, por esta razón a esa edad se evaluó el número de folíolos por planta, partiendo del tercer hasta el último folíolo que se encuentra en el ápice de la planta, ya que los primeros tres

foliolos se cubren en el aporque, esta evaluación se realiza por medio de observación.

Número de tubérculos

La cosecha de tubérculos se realizó a los 120 ddt, en esta etapa se contabilizó el número de tubérculos que se obtuvieron por planta, cada tubérculo se marcó para realizar otras mediciones, después de haber marcado los tubérculos, se sumó la cantidad total que se obtuvo por tratamiento, para posteriormente ser analizado estadísticamente.

Diámetro polar y ecuatorial

Después de haber contabilizado los tubérculos durante la cosecha, los mini tubérculos fueron separados de acuerdo a su categoría dimétrica, esta evaluación se realizó con la ayuda de un vernier digital (Figura 3.3)



Figura 3.3 Vernier electrónico, que se utilizó para la determinación de los diámetros polares y ecuatoriales de los minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) en sustrato estéril, bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.

Peso de los tubérculos

Cada tubérculo se peso en una balanza analítica, para determinar la cantidad de biomasa obtenida por tratamiento.

Tipo de brote del tubérculo

A los 30 días después de la cosecha (ddc), se empezaron a observar los brotes de la mayoría de los tubérculos cosechados, por lo tanto se empezó a contabilizar el tipo de brote emergido, tomando en cuenta dos tipos de brote (normales y ahilados)

Porcentaje de pardeamiento de los tubérculos

Para esta variable se tomaron 5 tubérculos por tratamiento los cuales representaban un 100% en cada tratamiento, estos se partieron a la mitad y se observo si presentaban o no pardeamiento, para posteriormente sacar el porcentaje por tratamiento.

Diseño experimental

Se utilizo un diseño experimental de bloques completamente al azar con arreglo factorial.

El experimento constó de cuatro bloques, cada bloque con cuatro tratamientos. Cada tratamiento constó de tres plantas con tres repeticiones por tratamiento, considerando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta

μ = Efecto de la media general.

α_i = Efecto verdadero del i-ésimo tipo de hospedante.

β_j = Efecto verdadero del j-ésimo tipo de antioxidantes.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción del i-ésimo tipo de hospedante y el j-ésimo tipo de antioxidante.

E_{ijk} = Error experimental en la ijk-ésima unidad experimental.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de cada variable medida se llevo a cabo con el paquete estadístico SAS versión 6.0 (1989) con un nivel de confianza de 95-99 %, con un ANOVA y una prueba de comparación de medias con Tukey 0.05 para los tratamientos con diferencias significativas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Fase I

Detección de *C. Liberibacter solanacearum*

El par de iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R, utilizados en la técnica de PCR son específicos para detectar a la bacteria *Ca. Liberibacter solanacearum*. Las 10 muestras de papa provenientes de campo fueron analizadas resultando positivas a esta bacteria y amplificaron un fragmento esperado de un tamaño aproximado de 400 pb, el cual codifica el RNA-ribosomal 16S de *Ca. Liberibacter solanacearum*. Las plantas positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum* se propagaron *in vitro* (Figura 4.4) y fueron utilizadas como material vegetal positivo en este trabajo.

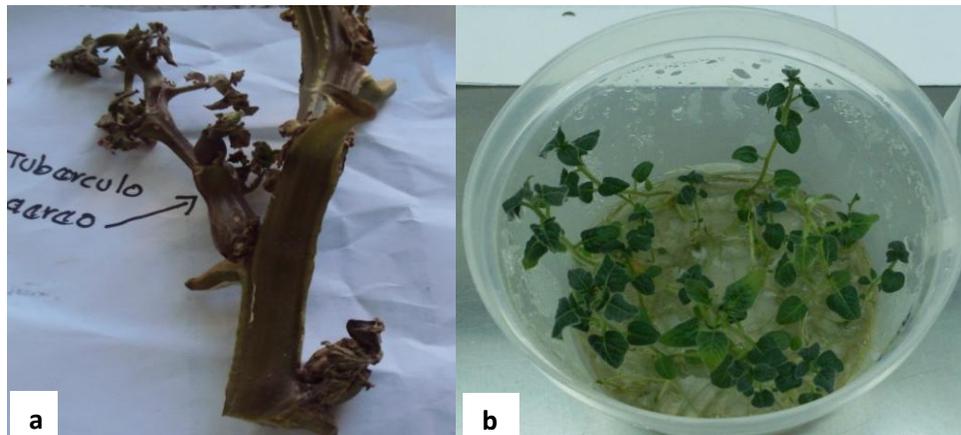


Figura 4.4 Multiplicación *in vitro* a partir de una planta madre de papa var. Vivaldi sintomática a PMP proveniente de campo, y positiva a *Ca. Liberibacter solanacearum*. a) planta sintomática de PMP con tubérculos aéreos, entrenudos cortos y engrosados; b) Multiplicación *in vitro* de plántulas provenientes de plantas con PMP en envases de polipropileno con medio de cultivo MS.

De las plántulas desarrolladas *in vitro*, se obtuvieron 625 vitroplantas a partir de plantas provenientes de campo que resultaron positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum*. La tasa de multiplicación fue de 5 brotes/explante; que representa una relación de 1:5, esta tasa de multiplicación es semejante a la reportada en laboratorios comerciales y de investigación (López, 1999), lo cual se considera aceptable.

Los resultados del análisis por PCR de las vitroplantas, indican que más del 87% de las vitroplantas analizadas fueron positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum*, como se observa en la Figura 4.5, donde se puede ver que

dentro de las 17 muestras evaluadas, solo una resultado negativa a este patógeno. Estos resultados demuestran que la bacteria *Ca. Liberibacter solanacearum*, se puede transmitir en un alto porcentaje por medio del cultivo *in vitro*; estos resultados concuerdan con Sánchez- Rojo, que en el 2010 obtuvo una transmisión del 70% con fitoplasmas en la variedad Alpha. De igual manera estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, que indican que los patógenos vasculares pueden transmitirse mediante propagación *in vitro*, ya que reportan la detección de fitoplasmas en clones sintomáticos y asintomáticos de papa var. Alpha mediante la técnica de PCR anidada (Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2009).

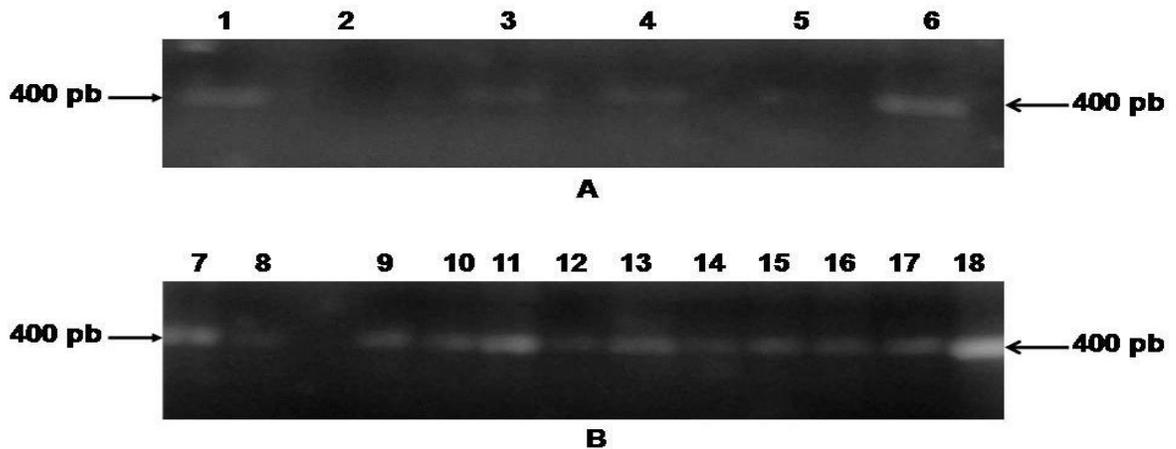


Figura 4.5 Productos de amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R y DNA de plantas de papa var. Vivaldi desarrolladas *in vitro* con síntomas de PMP y planta sana. A. Carriles 1, 3, 4, 5 y 6: Plantas de papa var. Vivaldi desarrolladas *in vitro* a partir de plantas sintomáticas a PMP colectadas en campo, carril 2: Planta sana. B. Carriles del 7-17: Plantas de papa var. Vivaldi desarrolladas *in vitro* a partir de plantas sintomáticas a PMP colectadas en campo, indicando la presencia de *C. Liberibacter solanacearum* en las muestras, Carril 18: Testigo positivo.

Cuadro 4.3 Comparación de medias de Altura foliar, Número de hojas, Número de folíolos, obtenidas durante el desarrollo del cultivo de *Solanum tuberosum* L. bajo condiciones de invernadero al aplicar diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	AF (cm)	NH	NF
T1= Ac. Dehidroascorbico/Plantas enfermas	40.55 a	14.44 a	43.33 a
T2= Ac. Ascorbico/planta enferma	29.00 de	10.88 def	32.77 efg
T3= Peroxido de hidrogeno/plantas enfermas	34.77 bc	12.00 cde	36.77 cde
T4= Sin antioxidantes/plantas enfermas	28.11 e	10.44 efg	31.55 fgh
T5= Ac. Dehidroascorbico/plantas sanas + psílicos	26.77 ef	9.77 fg	30.44 fgh
T6= Ac. Ascorbico/plantas sanas + psílicos	36 bc	11.88 cde	36.44 cde
T7= Peroxido de hidrogeno/plantas sanas + psílicos	39.11 ab	14.44 a	42.44 ab
T8= Sin antioxidantes/plantas sanas+psílicos	36.33 abc	13.11 abc	36.89 cde
T9=Ac. Dehidroascorbico/Plantas enfermas+psílicos	25.66 efg	9.66 fg	30.33 fgh
T10=Ac. Ascorbico/planta enferma+psílicos	33.22 cd	11.55 cde	34.77 def
T11=Peroxido de hidrogeno/plantas enfermas+psílicos	35.88 bc	12.44 bcd	37.78 bcd
T12= Sin antioxidantes/plantas enfermas+psílicos	21.44 g	8 h	25.22 i
T13=Ac. Dehidroascorbico/plantas sanas	23.66 fg	8.88 gh	27.55 hi
T14=Ac. Ascorbico/plantas sanas	38.44 ab	13.66 ab	40.44 abc
T15=Peroxido de hidrogeno/plantas sanas	35.77 bc	13.11 abc	37.77 bcd
T16=Sin antioxidantes/plantas sana	24.88 efg	9.49 fgh	29.33 i
Nivel de Significancia.	**	**	**
Media	31.83	11.48	34.61
Coeficiente de Variación	8.37	8.52	8.25

AF= Altura foliar; NH=Número de hojas; NF= Número de folíolos; **= Altamente Significativo (0.01 % de probabilidad); *= Significativo (0.05 % de probabilidad); NS= Nivel de Significancia; CV= Coeficiente de Variación (porcentaje).

Cuadro 4.4 Comparación de medias de Número de tubérculos, Diámetro polar y ecuatorial de los tubérculos y peso total del tubérculo, obtenidos durante la etapa de cosecha de *Solanum tuberosum* L. bajo condiciones de invernadero al aplicar diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	NT	DPT (cm)	DET (cm)	PT (gr)
T1= Ac. Dehidroascorbico/Plantas enfermas	12 d	0.86 b	1.19 bcd	0.67 bc
T2= Ac. Ascorbico/planta enferma	15 c	0.78 bc	1.07 c	0.52 c
T3= Peroxido de hidrogeno/plantas enfermas	18 b	0.68 bc	0.93 cd	0.34 cd
T4= Sin antioxidantes/plantas enfermas	6 d	0.88 ab	1.27 bc	0.97 b
T5= Ac. Dehidroascorbico/plantas sanas + psílicos	0	0	0	0
T6= Ac. Ascorbico/plantas sanas + psílicos	0	0	0	0
T7= Peroxido de hidrogeno/plantas sanas + psílicos	0	0	0	0
T8= Sin antioxidantes/plantas sanas+psílicos	0	0	0	0
T9=Ac. Dehidroascorbico/Plantas enfermas+psílicos	0	0	0	0
T10=Ac. Ascorbico/planta enferma+psílicos	0	0	0	0
T11=Peroxido de hidrogeno/plantas enfermas+psílicos	0	0	0	0
T12= Sin antioxidantes/plantas enfermas+psílicos	0	0	0	0
T13=Ac. Dehidroascorbico/plantas sanas	14 c	1.07 a	1.51 bc	1.1 ab
T14=Ac. Ascorbico/plantas sanas	18 b	1.03 a	1.53 ab	1.07 ab
T15=Peroxido de hidrogeno/plantas sanas	27 a	1.32 a	1.8 a	1.97 a
T16=Sin antioxidantes/plantas sana	11 cd	1.33 a	1.88 a	1.93 a
Nivel de Significancia.	**	**	**	**
Media	7.56	0.49	0.70	0.53
Coefficiente de Variación	39.75	50.38	29.53	30.69

NT= Número de tubérculos; DPT= Diámetro polar de los tubérculos; DET= Diámetro ecuatorial de los tubérculos; PT= Peso de tubérculos; **= Altamente Significativo (0.01 % de probabilidad); *= Significativo (0.05 % de probabilidad); NS= Nivel de Significancia; CV= Coeficiente de Variación (porcentaje).

Altura foliar

Las plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum*, presentaron algunos síntomas que han sido reportados bajo condiciones de campo (entrenudos cortos y engrosados en la base del tallo, desarrollo de minitubérculos y pigmentación clorótica de los folíolos apicales).

En las 14 fechas de monitoreo se observaron diferencias de síntomas entre los tratamientos con infestación y sin infestación con psílidos. En el tratamiento con Ácido dehidroascórbico se observó un efecto en la inhibición del desarrollo foliar. Se observó diferencia altamente significativa entre tratamientos para la altura foliar (Cuadro 4.3).

El T1 (Ac. Dehidroascorbico a 600 ppm), generó una respuesta positiva en las plantas enfermas con PMP sin infestación con psílidos, obteniendo un promedio de altura de 40 cm, a la etapa de cosecha sin embargo, en el T5, donde se aplicó este antioxidante en plantas sanas y posteriormente se infestó con psílidos, no se obtuvo una buena respuesta en el desarrollo foliar, ya que el promedio de altura de las plantas fue de 26 cm, lo mismo ocurrió cuando se aplicó este antioxidante en plantas enfermas con psílidos (T9), registrándose en este tratamiento una altura promedio de las plantas de 25 cm (Figura 4.6).

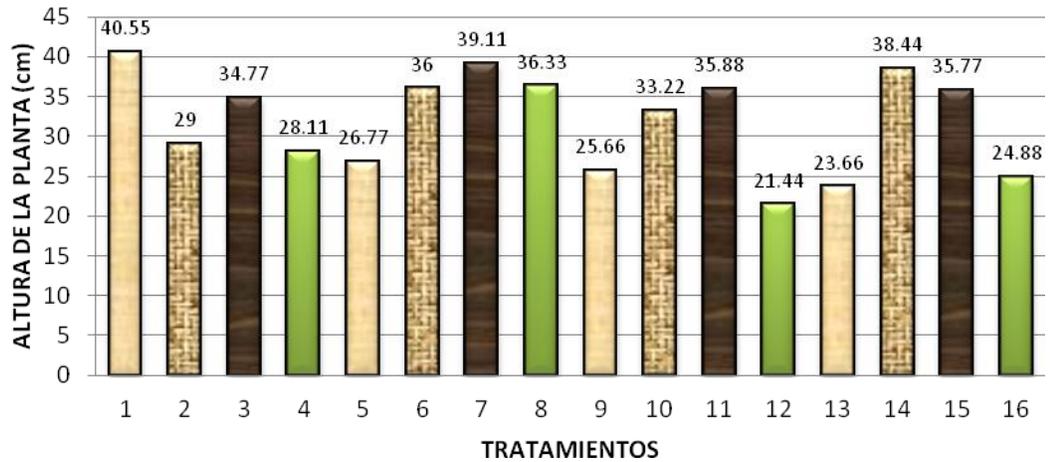


Figura 4.6 Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Altura Foliar (AF), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).

Cuando se aplicó el ácido ascórbico (T14) en plantas sanas sin psílicos se obtuvo una altura promedio de las plantas media de 38 cm, similar al del T1, lo mismo ocurre con el peróxido de hidrogeno (T7) al aplicarlo en plantas sanas pero infestadas con psílicos, con una altura promedio de 39 cm; respuesta similar a la observada en el T1; por lo que se puede establecer que los tres antioxidantes dan resultados positivos con respecto a la variable de altura foliar, pero bajo diferentes condiciones. El ac. dehidroascorbico funciona al aplicarlo en plantas enfermas pero sin psílicos, el Peróxido de hidrógeno favorece el desarrollo foliar en plantas sanas y con posterior infestación de psílicos y el ácido ascórbico solo funciona al aplicarlo en plantas sanas (Figura 4.6).

Número de hojas

Los resultados observados en el número de hojas por planta son similares a los obtenidos en la altura foliar, los tratamientos con mayor promedio del número de hoja fueron el T1 con un promedio de 14.4 hojas/planta, seguido del T7 con un valor promedio de hojas igual que el T1, es decir, de igual manera que en la altura foliar, tanto el ácido dehidroascorbico como el peróxido de hidrógeno presentaron los mejores resultados pero bajo diferentes condiciones, el Ac. Dehidroascorbico funcionó bien aplicándolo a plantas ya enfermas de PMP, mientras que el peróxido de hidrogeno genero el mismo resultado pero en plantas sanas con la presencia de los insectos vectores de la PMP (psílidos), por otra parte, el T14 también presentó buenos resultados con una diferencia mínima a la de los dos tratamientos anteriores, como ocurrió en la variable altura foliar, ya que obtuvo un promedio de 13.6 hojas por planta, esto ocurre cuando se aplica ácido ascórbico en plantas sanas (Figura 4.7).

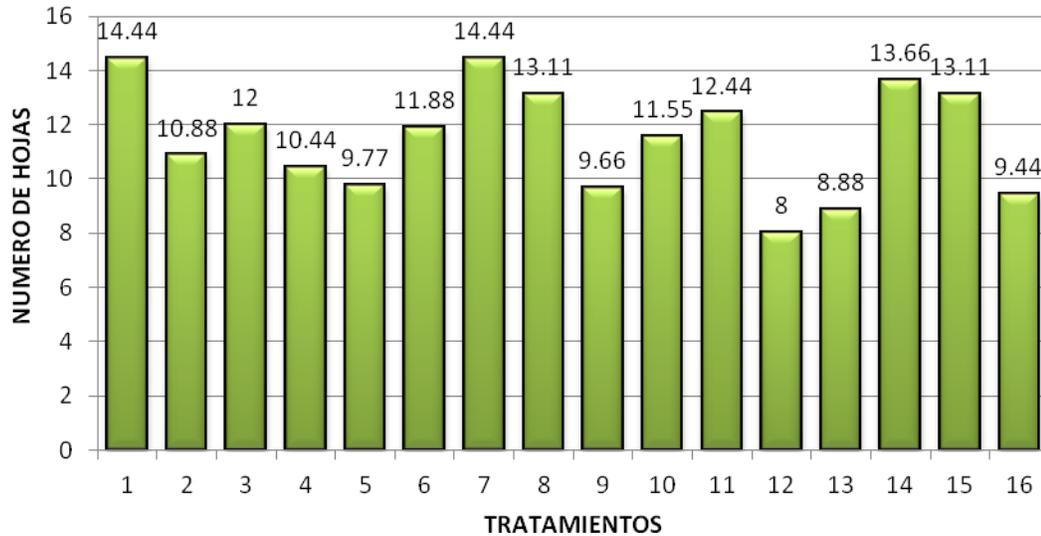


Figura 4.7 Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Número de Hojas (NH), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).

Número de foliolos

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos para la variable número de foliolos (Figura 4.8), Los mejores resultados se obtuvieron en el T1, el cual presentó una media de 43.3 foliolos/planta, seguido del Tratamiento 7, con un promedio de 42.4 foliolos/planta, lo que indica que estos dos tratamientos tuvieron un comportamiento similar, seguidos por el T14, el cual alcanzó un promedio de 40.4 foliolos/planta, estos resultados son similares a los generados en las primeras dos variables antes mencionadas, en donde los mejores tratamientos fueron el T1, T7, y el T14, por lo tanto, para las primeras

tres variables (AF, NH y NF), estos tres tratamientos son los más eficientes para atenuar la expresión sintomática de la punta morada de la papa.

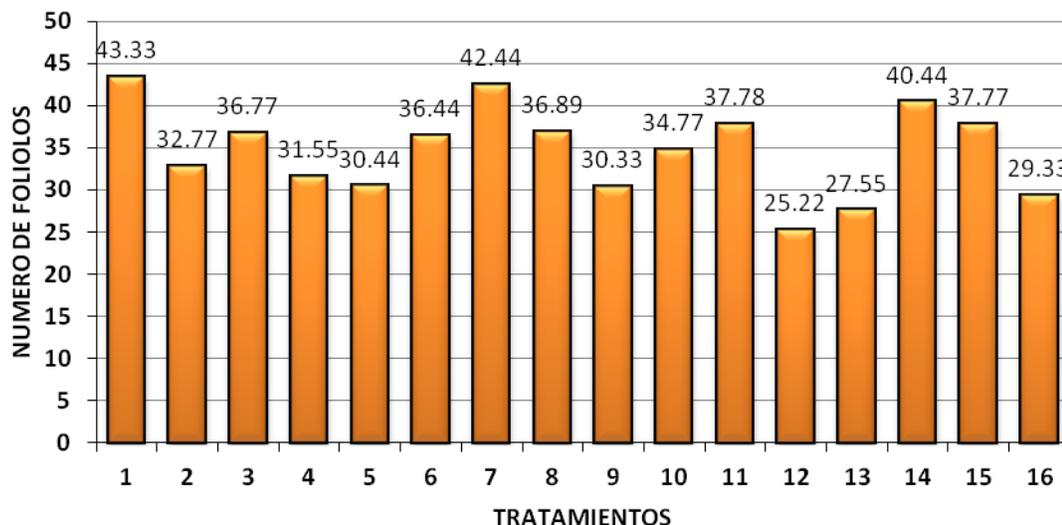


Figura 4.8 Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Número de Foliolos (NF), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).

Número de tubérculos

Para el número de tubérculos se obtuvieron diferencias altamente significativas entre tratamientos, es importante señalar que de los 16 tratamientos evaluados, solo ocho presentaron tubérculos, ya que los cuatro restantes a los cuales se realizó la infestación con psíidos no llegaron a cosecha debido a la presencia de estos insectos que terminaron por matar a la planta. Por otra parte, los tratamientos que no fueron infestados con psíidos generaron una respuesta positiva en relación al número de tubérculos, siendo el T15 (aplicación de

peróxido de hidrogeno en plantas sanas) el que obtuvo mayor número de tubérculos (27), con una diferencia del 66% con el T3 y T14, que obtuvieron un total de 18 tubérculos con una diferencia del 34% con respecto al T15, que en este caso fue el tratamiento que favoreció el rendimiento en plantas sanas a diferencia del T3 que fue el que obtuvo un buen rendimiento con plantas enfermas (Figura 4.9), cabe mencionar que tanto en plantas sanas como enfermas el peróxido de hidrogeno ayudo a generar un buen rendimiento de tubérculos. En los tratamientos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, y 12 no se registró ningún tubérculo, esto pudo deberse a la alta colonización de psíidos, a los cuales no se les realizó ningún control posterior a su infestación, ocasionando la muerte de la planta antes de llegar a cosecha (Figura 4.10).

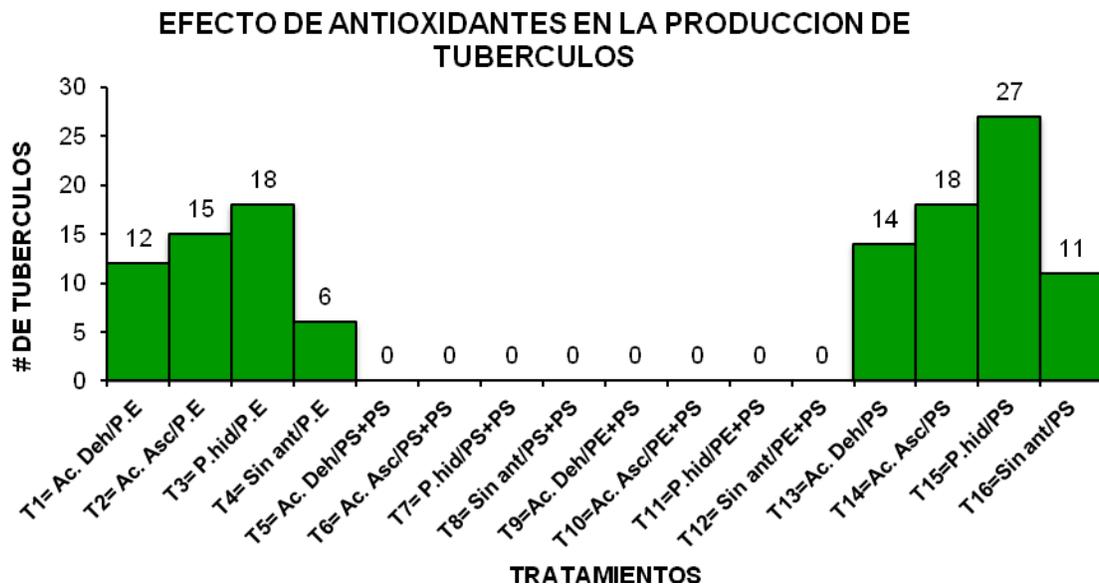


Figura 4.9. Comportamiento de los dieciséis tratamientos evaluados dependientes de la variable Número de Tubérculos (NT), de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico (SAS, 2001).

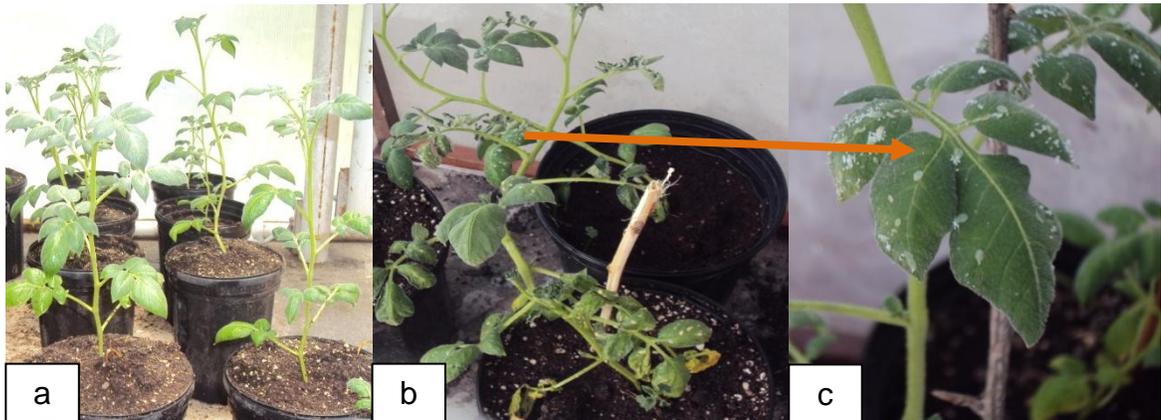


Figura 4.10 Plantas de papa var. vivaldi desarrolladas en invernadero a) plantas sanas con 60 días de edad; b) plantas de papa enfermas de PMP colonizadas con psílidos vectores de PMP; c) Colonización de psílidos con la presencia de huevecillo y ninfas en desarrollo, infestando los folíolos de la planta de papa var. Vivaldi, bajo condiciones de invernadero. INIFAP-Campo Experimental Saltillo (CESAL), Ciclo P-V 2010.

Por otra parte, la diferencia entre los tratamientos fue altamente significativa encontrando que para AF, NH y NF el mejor tratamiento fue el T1 (Plantas enfermas + Ác. dehidroascorbico), sin embargo para NT el T15 (Plantas sanas, sin Psílidos con peróxido de hidrógeno) fue el que mejor funciona. Estos resultados indican que los antioxidantes inducen cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas lo que les ayuda a generar respuesta de defensa para atenuar la expresión sintomática de la PMP.

El estudio de la naturaleza, función y modo de acción de los agentes causales de la PMP como patógenos de diversos cultivos vegetales es muy difícil ya que

a la fecha no existen métodos de aislamiento y cultivo para su experimentación sobre métodos de control. La estrategia básica de prevención consiste en la eliminación de las plantas que presenten síntomas y aplicación de insecticidas para controlar la presencia de los insectos vectores. Un método auxiliar para incrementar la eficiencia de estas medidas de control consiste en la reducción del potencial de infección e incremento en la resistencia o tolerancia de las plantas a estos organismos, ya que la eliminación del patógeno hasta el momento no ha sido posible con ningún tratamiento. Por ello este trabajo se enfoca a la aplicación de Ácido ascórbico, dehidroascorbico y peróxido de hidrogeno en la inducción de tolerancia al estrés biótico por los factores causantes de la PMP, para incrementar la productividad del cultivo de papa.

Algunos de los síntomas típicos de la infección por agentes causales de la PMP en campo (INIFAP, 2000; Martínez-Soriano *et al.*, 2007; Secor *et al.*, 2006) no se presentaron en invernadero, dichos síntomas fueron: pigmentación clorítica de los folíolos apicales, brotación en la parte aérea del tallo y brotes ahilados en los tubérculos. Posiblemente estos síntomas además de estar asociados al ataque de PMP, también estén relacionados con factores abióticos que se dan en el ambiente, los cuales no se presentan en el invernadero ya que las condiciones son controladas, esto concuerda con lo reportado por Sanchez-Rojo (2010), quien encontró los mismos resultados pero en la variedad Alpha al aplicar Ac. Indolacético.

V. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir que:

- El Ac. Dehidroascorbico en una concentración de 600 ppm aplicado en plantas infectadas con PMP, aumenta la acumulación de biomasa al incrementar la altura foliar, el numero de hojas y de foliolos en plantas enfermas con PMP y reduce el daño producido por la enfermedad.
- El peróxido de hidrogeno a una concentración de 1 mM, incrementa la acumulación de biomasa al aumentar la altura foliar, así como el número de hojas y de foliolos en plantas sanas y posterior infestación con psílicos, sin embargo, al incrementarse el número de psílicos la protección de la planta se reduce, esta puede morir y no llegar a cosecha.
- El Ac. Ascórbico a una concentración de 600 ppm, aumenta la acumulación de biomasa al incrementar la altura foliar, el numero de hojas y de foliolos en plantas sanas, pero no confiere protección en plantas con PMP.

- Se puede inferir que la aplicación de cualquiera de los tres antioxidantes evaluados (Ac. Ascórbico, Dehidroascorbico y Peróxido de Hidrógeno), en fases tempranas de desarrollo del cultivo de papa, es fundamental para estimular la capacidad de defensa de la planta al ataque de la PMP.
- Con base en los resultados obtenidos, se puede inferir que la mejor combinación a nivel de campo sería la utilización del peróxido de hidrógeno, combinado con aplicaciones de insecticidas, ya que en este trabajo proporcionaron mayor protección de la planta a la PMP y se obtiene un mayor número de tubérculos sin manchado interno.

VI. RESUMEN

La producción de papa es una actividad económica importante en la agricultura de México. Aunque, existen factores que limitan su rentabilidad, como es el Síndrome de Punta Morada (SPM). Este problema se presenta en las principales zonas paperas de México disminuyendo el rendimiento y calidad comercial de semilla-tubérculo en un rango de 30 a 95%. Partiendo de esta problemática, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de tres antioxidantes para reducir el daño causado por este síndrome, por lo que plantas *in vitro* sanas e infectadas con PM, de 30 días de edad se trasplantaron en macetas (16x12cm de profundidad) en una mezcla 2:1 de "peat moss" y agrolita v/v. El diseño utilizado fue de bloques al azar con arreglo factorial. El experimento consto de dieciséis tratamientos, cada uno consto de 3 tres repeticiones con tres unidades experimentales por repetición. Los señalizadores y/o antioxidantes evaluados fueron ácido dehidroascorbico (600ppm), ácido ascórbico (600ppm), peróxido de hidrogeno (1mM), y sin aplicación de antioxidantes. La aplicación de los productos se realizo dos veces por semana. Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, generando una respuesta positiva en el número de tubérculos producidos, el peróxido de hidrogeno en plantas sanas, fue el que obtuvo el mayor número de tubérculos, con una diferencia del 66% con respecto al peróxido de hidrógeno aplicado en plantas infectadas de PM y ácido dehidroascórbico en plantas sanas, con una diferencia del 34% con respecto al tratamiento sin antioxidantes en plantas sanas. El tratamiento del peróxido de hidrógeno en plantas infectadas, fue el que obtuvo mayor rendimiento en relación a los otros tratamientos que incluyeron plantas enfermas. Este tratamiento, tanto en plantas sanas como enfermas, genero una buena producción de tubérculos. Con estos resultados, se puede inferir que el mejor tratamiento en campo, sería la aplicación de peróxido de hidrógeno, combinado con aplicaciones racionales de insecticidas.

VII. LITERATURA CITADA

- Abad, J. A., M. Bandlia, R. D. French-Monar, L. W. Liefiting and G. R. G. Clover.** 2009. First report of the detection of “candidatus liberibacter” species in zebra chip disease-infected potato plant in the united states. *Plant Disease*. 93:1:108 p.
- Agrios, N. G.** 1998. *Fitopatología*; 2ª edición; Editorial Limusa, México. 838 p.
- Alarcón, R. N. M.** 2007. Caracterización de DNA de clones de papa y fitoplasmas asociados en el valle de Toluca, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Chapingo, México. 71 p.
- Alarcón-Rodríguez N., M., H. Lozoya-Saldaña, y E. Valadez-Moctezuma.** 2009. Caracterización de ADN de clones de papa e identificación de fitoplasmas asociados al síndrome de la punta morada. *Agrociencia* 43: 357-370.
- Almeyda-León, H. I.** 2002, Detección Molecular del Agente Etiológico de la Punta Morada de la Papa. *Memorias del XI Congreso Nacional de Productores de Papa*. León, Guanajuato. México.
- Almeyda L., I. H.; Rubio C., O. A. y Zavala Q., T.** 1999. Determinación de la implicación de fitoplasmas con la expresión sintomatológica de punta morada en papa (*Solanum tuberosum* L.). *In: IV Simposio de Ciencia y Tecnología. Desarrollo Agropecuario. Secretaría de Educación Pública, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Monterrey, Nuevo León.* p. 45.
- Almeyda, L., I. H.; Rubio C., O.; Díaz M., Z.; Rocha P., M. A.; Díaz A.** 1999. Implementación de técnicas moleculares para la detección del agente causal de la punta morada de la papa en plantas e insectos vectores. Proyecto de investigación, Laboratorio de Patología Molecular-Monterrey. INIFAP, Informe de Avances. 19 p.
- Almeyda, L., I.H., J. A. Sánchez S., y J. A. Garzón T.** 2004. Detección molecular de fitoplasmas en papa. *In: XXI Semana Internacional del Parasitólogo. Memorias del Simposio Punta Morada de la Papa. Buenavista, Saltillo, Coahuila.* P. 4-13.

- Aviles, G. M. C., Garzón T. J. A., Marin J. A., Caro M. P. H.** 2003. El psilido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc.): biología, ecología y su control. Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sin., México. Primera Edición 21-35 p.
- Batool, A., Iftikhar Y, Mughal S. M, Khan M. M y Jaskani M. J.** 2007. Citrus Greening Disease —A major cause of citrus decline in the world— A Review. Horticultural Sciences (Prague) 34, 159-166.
- Bertaccini, A., Vibio, M., Bellardi, M. G., and Danielli, A.** 1996. Identification of phytoplasmas in alstroemeria. Acta Horticulturae 432:312-316.
- Bolaños, L. E.E.** 2000. Efecto de 3 auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de 10 clones de papa (*Solanum tuberosum* L). Universidad de San Carlos Guatemala. Facultad de agronomía. Tesis de Licenciatura.
- Cadena, H. M. A. y Galindo, A. J. 1986.** Reducción de la incidencia de la Punta Morada de la Papa por medio de fechas de siembra, genotipo de la planta y aplicación de insecticidas. Rev. Mex. de Fitopatología. 3:100-104.
- Cadena, H. M. A., P. R. Guzmán, M. Díaz, T. E. Zavala, L. H. Almeyda, H. López D., A. Rivera, P., y C. O. Rubio.** 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21: 248-258.
- Cadena-Hinojosa, M.A., and J. Galindo-Alonso.** 1986. Reducción de la incidencia de la “punta morada de la papa” por medio de fechas de siembra, genotipo de planta y aplicación de insecticidas. Revista Mexicana de Fitopatología 3: 100–104.
- Camarena-Gutierrez G, y R. de la Torre-Almaráz.** 2007. Resistencia sistémica adquirida: estado actual. Revista Chapingo, Serie ciencias forestales y del ambiente 13: 157-162.
- Cárdenas, D., L. M. 1989.** Embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis en Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 119 p.

- CESAVEM.** 2010. Folleto de Manejo Integrado de la Paratrioza (*Bactericera cockerelli* Sulc.) Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México. Consultado en: <http://www.cesavem.org/?accion=divulgacion> (Fecha de consulta, Noviembre 2010).
- Chang, C. J., y I-M. Lee.** 1998. Pathogenesis of diseases associated with mycoplasma-like organisms. En: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, ed. Singh U., S., R. P. Singh, y K. Kohmoto. Elsevier. New York pp: 237-46.
- Cranshaw, W.S.** 2002. Manejo del psílido de la papa y tomate en los cultivos de papa. Memorias del xi Congreso Nacional de productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002 León, Guanajuato, México pp 46-51.
- Espinoza N., Estrada N., Tovar P., Bryan J., Dodds H. J.** 1985. Cultivo de Tejidos, Micropropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de Papa. Dcto. Tecn. Especializada 1. Centro Internacional de la Papa (CIP). 17p.
- Estrada, N. 2000.** La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa., PROINPA-CID-Centro Internacional de la Papa. La Paz, Bolivia. 372 p.
- FAOSTAD,** 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Consultado a través de <http://www.potato2008.org/es/index.html> (fecha de consulta: Julio, 2011).
- Fernie, A., R., y L. Willmitzer.** 2001. Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development. Plant Physiology 127:1459-1465.
- Flores, O. A.; Alemán, N. I. A.; y Notario, Z. M. I.** 2004. Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. In: Flores, O. A.; Gallegos, M., G. y García, M., O. (eds.). Memorias de Simposio Punta Morada de la Papa p.40–63.
- García de la Rosa, J.** 1999. Hongos del Suelo: ¿Patógenos o Saprófitos? División Agrícola. Pfizer, México.
- Garnier, M., Danel, N., Bové, J. M.,** 1984. The greening organism is a gram-negative bacterium, p. 115-124. In: (S.M. Garnsey, L. W. Timmers, and J.

A, Dodds editors), Proceedings of the 9th International Conference of Citrus Virologist. University of California, Riverside.

Garzón T. J. A., M. R. Bujanos, F. S. Velarde, J. A. Marín, T. V. M. Parga, G. M. C. Aviles, I. H. Almeyda L., A. J. Sánchez S., J. L. Martínez C., y J. A. Garzón C. 2004. *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* Sulc., vector de fitoplasmas en México. *En:* Flores O. A., M. G. Gallegos y O. M. Garcia (eds.) Memorias del Simposio Punta Morada de la Papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro pp: 64-83.

Garzón, T. J. A., Garzón C. J. A., Velarde F. S., Marín J. A. y Cardenas V. O. G. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al “Permanente del Tomate” por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. en México. *In* Memorias del Congreso Nacional de Entomología. 672-675 pp.

Garzón-Tiznado J. A., Cárdenas-Valenzuela O. G., Bujanos-Muñiz R., Marín-Jarillo A., Becerra-Flora A., Velarde-Felix S., Reyes-Moreno C., González-Chavira M. y Martínez-Carrillo J. L., 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae) con la enfermedad “Permanente del tomate” (*Solanum lycopersicum* L.), en México. *Agricultura Técnica en México.* 31(1): 58-69.

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). Department of Entomology, University of California, Riverside, California. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5862-5865.

Hayat, Q. S. Hayat, Irfan, y A. Ahmad. 2009. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* doi:10.1016/j.envexpbot. 2009.08.005.

Hernández, M., J.; Ochoa M., D.; Sandoval I., J. S. 2001. Evento de aprobación en certificación fitosanitaria de papa. Tomo I “Base Técnica”. Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. pp. 1-11.

Hooker, W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, p. 145-149.

- INIFAP** 2000. Manual para la producción de papa en las sierras y valles altos del centro de México. Centro de investigación nacional del centro. Programa nacional de Investigaciones en el cultivo de la papa. No. 1, 81 pp.
- Jagoueix, S., Bove J. M. and Garnier, M.,** 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the *Proteobacteria*. *Internacional Journal Systematic Bacteriology* 44:379-386.
- Lafèche, D., and Bove, J. M.** 1970. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 270:1915-1917.
- Lecaros, J.** 1978. Mejoramiento para resistencia a virus. Colloquium de mejoramiento genético, Lima, Perú, 5 p.
- Lee I. M., K.D. Bottner, J. E. Munyaneza, G. A. Secor, y N. C. Gudmestad.** 2004. Clover proliferation group (16SrVI), subgrup a (16SrVI-A) phytoplasma is probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant disease* 88:429.
- Lee, I. M., E. Dawn, D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis, and I. M. Bartoszyk.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bact.* 48: 1153-1159.
- Lee, I.-M., Davis, R. E. & Gundersen-Rindal, D. E.** 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54, 221–255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E. & Bartoszyk, I. M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48, 1153–1169.
- Lee, I.-M.; Bottner, K. D., Secor, G. A. and Rivera-Varas, V.** 2006. "*Candidatus* phytoplasma americanum", a phytoplasma associated with potato purple top disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1593-1597.

- Levy, L., I. M. Lee, and A. Hadidi.** 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J. Virol. Meth.* 49: 295-304.
- Leyva, L. N. E., S. J. C. Ochoa, K. D. S. Leal, and J. P. Martínez.** 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México. *Can. J. Microbiol.* 48: 1062-1068.
- Liefting, L. W., Perez-Egusquiza, C.Z., Clover, G. R. G. and Anderson J. A. D.,** 2008. A New *Candidatus Liberibacter* Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92:1474.
- Liefting, L. W., M. Shaw, y B. C. Kirkpatrick.** 2004. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper transmitted virescence agent. *Microbiology* 150:1809-1817.
- Liefting, L. W., P. W. Sutherland, L. I. Ward, K. L. Paice, B. S. Weir and G. R. G. Clover.** 2009. A new “*Candidatus Liberibacter*” species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease.* 93:3:208-214.
- Liu, D.; Trumble, J. T. and Stouthamer, R.** 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomological Experimental Application* 118:177-183.
- Liu, D.; Trumble, J. T. and Stouthamer, R.** 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomological Experimental Application* 118:177–183.
- Lopez-Delgado, H.,** 1999. Micropropagacion en Papa. En: Taller de Micropropagación de Cultivos Hortícolas. VIII Congreso de Horticultura pp 12-15.
- Lorenz, K. H., B. Schneider, U. Ahrens, E. Seemüller.** 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 83: 971-976.
- Maramorosch, K.** 1998. Potato purple top wilt. Segundo Simposium Internacional de Papa. Toluca, Estado de México. p. 13-15.

- Martinez-Soriano J. P., N. E. Leyva-López, K. Aviña-Padilla, y J. C. Ochoa-Sánchez.** 2007. La punta morada de la papa en México. Claridades agropecuarias Febrero: 27-33.
- Mc Coy, R. E., A. Caudwell, C. J. Chang, T. A. Chen, L. N. Chiykowski, M. T. Cousin, J. L. Dale, G. T. De Leeuw, D. A. Golino, K. J. Hackett, B. C. Kirkpatrick, R. Marwitz, H. Petzold, R. C. Sinha, M. Suguira, R. F. Whitcomb, I. L. Yang, B. M. Zhu, y E. Seemuller.** 1989. The mycoplasmas, 5o vol. Academic Press, San Diego, California.
- Morris J, Reed P y Sansford C.** 2009. CSL information note: *Candidatus Liberibacter solanacearum* —a new bacterium associated with a disease of tomatoes, apsicums, and potatoes in New Zealand. <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/canLibSol.pdf>.
- Munyaneza, J. E., A. S. Jensen, P. B. Hamm, and J. M. Crosslin.** 2005. Phenology of the beet leafhopper, major vector of the potato purple top phytoplasma in the Columbia Basin. Potato Assoc. Am. Annual Meeting (abstract G73).
- Murashige, T.; Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant. 15: 473-497.
- Murphy, A. M., A. Gilliland, C. E. Wong, J. West, D. P. Singh, y J. P. Carr.** 2001. Signal transduction in resistance to plant viruses. European Journal of Plant Pathology 107: 121-128.
- Poghosyan, A., y V. Lebshy.** 2009. Microscopía electrónica de barrido: una herramienta esencial para el diagnóstico de fitoplasmas. Congreso internacional de ciencias agrícolas. Baja California, México.
- Quiñones, Y., H. Izquierdo, O. Martínez, P. Alcantara y E. Rodríguez.** 2002. Metodos Alternativos para la Producción de Semilla Prebásica de Papa (*Solanum tuberosum*, L.). Cultivos Tropicales, 2004, vol. 25, no. 2, p. 23-27.
- Ramírez, M. M. Ramos, E. C. J.** 1978. Populations of leafhoppers (Homoptera-Cicadellidae) on 12 varieties of potato in Chapigo, México, and their possible relation to “purple-top wilt” disease. Agrocienia. 34:79-90 p.

- Rubio C., O. Á.; Almeyda L., I. H.; Ireta M., J.; Sánchez S., J. A.; Fernández S., R.; Borbón S., J. T.; Díaz H., C.; Garzón T., J. A.; Rocha R., R. y Cadena H., M. A.** 2006. Distribución de la Punta Morada y *Bactericera cockerelli* sulc. En las Principales Zonas Productoras de papa en México. Agricultura Técnica en México Vol. 32 Núm. 2. p. 201-211.
- Sánchez, R. S.** 2010. Respuesta antioxidante al tratamiento con ácido salicílico en plantas de papa infectadas con fitoplasma. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México.
- Salazar, L. F.** 1997. Identificación y control de enfermedades y fitoplasmas de la papa. Simposium Internacional de la Papa. Metepec, Estado de México. (<http://www.redepapa.org/salazar1.pdf>).
- Salazar, M. F.** 1996. Los virus de la papa y su control. Centro internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. 226p.
- SAS Institute Inc.** 2001. SAS/IML User's Guide. Version 8. SAS Institute Inc. Cary NC. 856 p.
- Secor, G. A., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Rivera-Varas, V. & Gudmestad, N. C.** 2006. First report of a defect of processing potatoes in Texas and Nebraska associated with a new phytoplasma. Plant Dis 90, 377.
- Seemüller, E., C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino, and M. Göschl.** 1998. Current status of molecular classifications of the phytoplasmas. J. Plant Pathol. 80: 3-26.
- Severin, H. H. P.** 1940. Potato naturally infected with California Aster Yellow. Phytopathology. 30:1049-1051.
- SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.** 2007. SAGARPA México; siap.gob.mx.
- Valdez O. A., A. G. Leopoldo y F. P. Federico.** 2009. Producción y calidad de semilla-tuberculo de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad atlantic, cosechada en diferentes fechas. UAAAN.Tesis Maestría en Ciencias Departamento de fitomejoramiento CCTGS.
- Villavicencio, G. E. E., Arellano G. M. A., García, G. S., Juárez, S. A.** 2009. Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de

papa libres de enfermedades Instituto nacional de investigaciones forestales agrícolas y pecuarias. Dcto. Tecn. No. 41. 15-25pp.

Wallis, R. L. 1948. Time of planting potatoes as a factor in prevention of potato psyllid attack. *Journal of Economic Entomology*. 41:1:4-5 pp.