



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## “ETIOLOGÍA DEL PARDEAMIENTO Y LA BROTACIÓN ANORMAL EN LOS TUBÉRCULOS DE PAPA EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO”

**MARGARITA DIAZ VALASIS**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: **ETIOLOGÍA DEL PARDEAMIENTO Y LA BROTACIÓN ANORMAL EN LOS TUBÉRCULOS DE PAPA EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO** realizada por el alumno **MARGARITA DÍAZ VALASIS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO: **DR. Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez**

ASESOR: **DR. Dr. Mateo Armando Cadena -Hinojosa**

ASESOR: **DR. Dra. Emma Zavaleta –Mejía**

ASESOR: **DR. Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez**

ASESOR: **DR. Dr. Rafael Bujanos Muñiz**

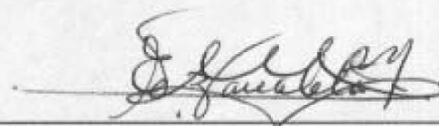
La presente tesis titulada: **ETIOLOGÍA DEL PARDEAMIENTO Y LA BROTACIÓN ANORMAL EN LOS TUBÉRCULOS DE PAPA EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO**, realizada por la alumna **MARGARITA DÍAZ VALASIS** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

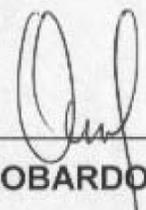
**DOCTORA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA: \_\_\_\_\_  
  
**DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ**

ASESOR: \_\_\_\_\_  
  
**DR. MATEO ARMANDO CADENA -HINOJOSA**

ASESORA: \_\_\_\_\_  
  
**DRA. EMMA ZAVALETA -MEJÍA**

ASESOR: \_\_\_\_\_  
  
**DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ**

ASESOR: \_\_\_\_\_  
  
**DR. RAFAEL BUJANOS MUÑIZ**

Montecillo, Texcoco, Estado, de México, julio 2008

## **AGRADECIMIENTOS**

**Expreso mi más sincero agradecimiento al pueblo de México** que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me apoyó económicamente durante esta etapa de mi formación.

**Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias INIFAP** que además del apoyo financiero brindado, me sostuvo con el consejo oportuno de compañeros investigadores y administrativos.

**Al Colegio de Postgraduados**, en especial al Instituto de Fitosanidad por todas las enseñanzas y las experiencias obtenidas.

**A los miembros de mi Consejo Particular:** Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Dr. Mateo A. Cadena-Hinojosa, Dra. Emma Zavaleta-Mejía, Dr. Daniel L. Ochoa Martínez y Dr. Rafael Bujanos Muñiz por su tiempo, paciencia y disposición para asesorarme cuando lo requerí, y por su consejo y amistad brindada.

**A mi esposo e hija**, por su apoyo e infinito amor y comprensión mostrados durante estos cuatro años y medio.

**A mi Alma mater Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Ciencias)** por haberme dotado de una formación académica que me ha permitido enfrentar con éxito los retos académicos presentes y seguramente también los futuros.

**A SENASICA Sanidad Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular** que a través de su personal especializado, MC. Rocío Hernández, Ing. Mario y MC. Jorge Aguilar me apoyaron con su asesoría en las pruebas de detección para fitoplasmas.

**A la Ing. Agrónoma Iobana Alanis Martínez** por su disposición y valioso apoyo en el diagnóstico de fitoplasmas así como por su amistad brindada.

**A mi amiga y colega Biol. Bárbara Hernández Macías** por compartir momentos agradables y algunos difíciles, propios de una verdadera amistad.

**A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular del CP. :** Celia, Yola, Damaris, Diana, Ruth, Elba Lidia y Ernesto, gracias por su apoyo y amistad !



## **DEDICATORIA**

**Al alfa y omega, principio y fin de todas las cosas.....Dios!**

**A mi querido esposo Javier...**compañero tierno e incansable de múltiples batallas!

**A mi única y adorada hija Irina,** quien con su vigor y alegría de vivir, representa gran parte de mi motivación para seguir adelante...

**A mis padres, Salvador y Margarita,** quienes con su continuo ejemplo de fe en Dios, cariño, trabajo y dedicación sembraron en mí la persona que soy.

**A mis hermanos, Alejandro y Mary Xenie,** por su espíritu de lucha y continuo esfuerzo en la vida.

**A mi tía Dimitrula,** por ser la “mujer fuerte” que menciona Salomón en la Biblia, fuente de inspiración y sabiduría para todos nosotros!

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1. Introducción y revisión de literatura.....	1
Introducción.....	1
Objetivos.....	2
Revisión de literatura.....	3
Punta morada de la papa.....	3
Importancia y distribución.....	3
Sintomatología.....	3
Agente causal.....	4
Manejo de la enfermedad.....	5
<i>Bactericera cockerelli</i> .....	6
Importancia y distribución.....	6
Sintomatología.....	7
Asociación de la sintomatología con “toxina” inyectada por el insecto.....	8
Distribución e Incidencia del pardeamiento y brotación anormal en el campo.....	10
Zebra chip, importancia y distribución.....	11
Medidas de Control para el Psílido de la Papa.....	11
Resistencia de la planta hospedera.....	11

Control Biológico.....	12
Control Químico.....	13
Literatura citada.....	15
CAPÍTULO 2. Etiología del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa en la región central de México.....	24
Resumen.....	24
Abstract.....	26
Introducción.....	28
Materiales y métodos.....	30
Colecta de aislamientos de PMP.....	30
Transmisión del agente infeccioso bajo condiciones de Invernadero.....	31
Injertos a partir de esquejes de clones con síntomas de PMP transmitidos por tubérculo-semilla en invernadero.....	33
Injertos a partir de esquejes de jitomate con síntomas de “popotillo”.....	34
Monitoreo de fitoplasmas en plantas de papa, chile y jitomate, mediante prueba de PCR.....	34
Análisis por RFLP.....	35
Secuenciación.....	36
Resultados.....	37
Colección de aislamientos y transmisión por injerto de punta morada de la papa (PMP).....	37
Transmisión de síntomas de “popotillo en jitomate”.....	40

Monitoreo de fitoplasmas en plantas de papa, chile y jitomate mediante PCR.....	43
Pardeamiento y brotación anormal en genotipos de papa.....	48
Análisis por RFLP de productos amplificados por PCR.....	52
Secuenciación.....	54
Discusión.....	60
Conclusiones.....	64
Literatura citada.....	65
Apéndice No.1.....	70
 CAPÍTULO 3. Comportamiento de genotipos de papa al psílido de la papa y del tomate ( <i>Bactericera cockerelli</i> , Sulc. Homoptera Psyllidae) bajo condiciones de invernadero.....	72
Resumen.....	72
Abstract.....	73
Introducción.....	74
Materiales y métodos.....	77
Establecimiento de la colonia de <i>B. cockerelli</i> libre de fitoplasmas.....	77
Detección de fitoplasmas en la colonia de insectos y plantas hospederas, mediante prueba de PCR.....	78
Evaluación de los genotipos de papa a <i>B. cockerelli</i> .....	79
Análisis estadístico de datos.....	81

Transmisión por semilla del “amarillamiento por psílicos” en invernadero.....	81
Transmisión por injerto a partir de plantas con síntomas de “amarillamiento por psílicos” en plantas sanas de papa.....	81
Resultados.....	82
Respuesta de los genotipos de papa a <i>B. cockerelli</i> .....	82
Transmisión por injerto a partir de plantas con síntomas de “amarillamiento por psílicos”, en plantas sanas de papa.....	84
Discusión.....	87
Conclusiones.....	90
Literatura citada.....	97

## ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

### CAPÍTULO 2

<b>Cuadro 1.</b> Porcentaje de transmisión y detección con PCR de punta morada de la papa en genotipos injertados en invernadero durante 2005 y 2006.....	38
<b>Cuadro 2.</b> Porcentaje de transmisión y severidad en follaje de punta morada de campo registrada en cuatro genotipos de papa injertados en invernadero con brotes de plantas de esta misma especie colectados en campo, 2005-2006.....	39
<b>Cuadro 3.</b> Detección de fitoplasmas mediante PCR en tubérculo con pardeamiento y/o follaje con síntomas de PMP, en el genotipo final de la transmisión seriada.....	41
<b>Cuadro 4.</b> Detección de fitoplasmas mediante PCR en follaje con síntomas de PMP y sin síntomas de pardeamiento en el tubérculo, en el genotipo final de la transmisión seriada.....	42
<b>Cuadro 5a.</b> Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR, 2004-2007.....	44
<b>Cuadro 5b.</b> Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR, 2004-2007.....	45
<b>Cuadro 5c.</b> Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR, 2004-2007.....	46

## ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

---

### CAPITULO 2

<b>Cuadro 6.</b> Detección de fitoplasmas mediante PCR en papa, chile y jitomate, 2004-2007.....	47
<b>Cuadro 7.</b> Severidad del pardeamiento y tipo de brotación en los tubérculos en genotipos procedentes de plantas con síntomas de punta morada en invernadero CEVAMEX 2004-2006.....	50
<b>Cuadro 8.</b> Efecto de la punta morada en severidad de pardeamiento, porcentaje de tubérculos con pardeamiento y brotación anormal en genotipos de papa bajo condiciones de invernadero.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

---

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** PCR-anidada con los iniciadores R16F2n/R2. Carril **M**, marcador de peso molecular  $\lambda$  Sty I. Carril **1**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectado con el fitoplasma del amarillamiento del áster. Carril **2**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Zafiro. Carril **3**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo NAU-6. Carril **4**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Lady Rosetta. Carril **5**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Norteña. Carril **6**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectado con el fitoplasma del amarillamiento del áster. Carril **7**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Zafiro. Carril **8**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo NAU6. Carril **9**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Lady Rosetta. Carril **10**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Norteña. Fragmentos amplificados de aproximadamente 1.2 Kb..... 48

**Figura 2.** PCR-anidada con el par de iniciadores R16F2n/R2, de muestras de follaje y tubérculos de papa con síntomas de PMP en invernadero y campo. Carril **M**, marcador de peso molecular 1Kb ADN. Carril **1**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con un aislamiento de fitoplasma que induce amarillamiento del áster. Carril **2-7**, muestras de follaje de papa de invernadero (41,42 y 43) con síntomas de PMP. Carril **8**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con un aislamiento de fitoplasma que induce amarillamiento del áster. Carril **9-10**, muestras de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP (44). Carril **11-12**, muestras de tubérculos de invernadero con síntomas de pardeamiento (31 y 1). Carril **14**, muestra de tubérculo de invernadero con síntomas de pardeamiento. Carril **15**, muestra de tubérculo de invernadero con síntomas de pardeamiento (32). Carril **16-19**, muestras de tubérculo de invernadero con pardeamiento. Carril **20-21**, muestras de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo San José; Carril **22**, testigo negativo de follaje de papa de invernadero sin síntomas..... 52

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

---

### CAPÍTULO 2

<p><b>Figura 3.</b> Análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia 16S ADNr amplificado por PCR, con los iniciadores R16F2n/R2, procedente de tubérculo de papa clon NAU-6 con síntomas leves de pardeamiento. El ADN producto fue digerido con las enzimas de restricción <i>Msel</i>, <i>HpaII</i>, <i>Tsp5091</i>, <i>HhaI</i>, <i>AluI</i>, <i>KpnI</i>, separado por electroforesis en gel de poliacrilamida 8%. Carril MPM; marcador del fago <math>\Phi</math>X174 <i>Haell</i>.pb = pares de bases.....</p>	53
<p><b>Figura 4.</b> Síntomas característicos de PMP observados en campo <b>A.</b> disminución en el crecimiento, enrollamiento de las hojas, clorosis, coloración roja o púrpura en la base de los folíolos <b>B.</b> engrosamiento de nudos y proliferación de brotes axilares con hinchamientos en la base.....</p>	55
<p><b>Figura 5. A,</b> injerto seriado de papa con síntomas de PMP. <b>B,</b> síntomas de PMP (amarillamientos y coloración purpúrea en los márgenes de la base de los folíolos) en planta de papa después de injertos seriados en invernadero.....</p>	56
<p><b>Figura 6.</b> Pardeamiento en el tubérculo por PMP. <b>A,</b> diferentes intensidades de pardeamiento en tubérculo de papa procedente del campo. Izq. superior muy leve (OL); der. superior testigo sin síntomas; izq. Inferior, ataque severo (F); der. inferior ataque moderado (M). <b>B,</b> corte superior; tubérculo de papa procedente de campo con ataque severo de pardeamiento (F); corte inferior; testigo sin síntomas. <b>C,</b> Pardeamiento moderado fuerte (MF) en el cultivar Zafiro, inducido por injerto seriado, bajo condiciones de invernadero.....</p>	57
<p><b>Figura 7.</b> Brotación anormal en tubérculos de papa. <b>A,</b> tubérculos de campo. Izq. sin brotar; centro, brote normal; der. brote fino. <b>B,</b> tubérculos de papa de invernadero. Izq. brote fino; centro, brote normal; der. brote fino. <b>C,</b> papa con brote fino de invernadero.....</p>	58
<p><b>Figura 8.</b> Síntomas de “popotillo” en jitomate. <b>A.</b> Superior der. “popotillo” en jitomate, se observa disminución en el crecimiento y amarillamiento en el ápice e inicio de proliferación de brotes. Izq testigo.....</p>	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

### CAPÍTULO 3

<p><b>Figura 1.</b> Número de ninfas de <i>Bactericera cockerelli</i> por planta de papa de 20 variedades y clones avanzados bajo condiciones de invernadero. 2004 (A) y 2005 (B). Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha = 0.05</math>). 1. Alpha, 2. Atlantic, 3. Bintje, 4. Gigant, 5. Granola, 6. Lady Rosetta, 7. Lupita, 8. Marciana, 9. Malinche, 10. Michoacán, 11. Mondial, 12. Montserrat, 13. NAU-6, 14. Norteña, 15. Sancal, 16. Sangema, 17. San José, 18. Zafiro, 19. 4-11, 20. 6760008 Roja.....</p>	91
<p><b>Figura 2.</b> A) Rendimiento en 20 variedades de papa y clones avanzados expuestos a <i>Bactericera cockerelli</i> bajo condiciones de invernadero B) Testigo sin insectos. 2004. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha = 0.05</math>). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4 11; 20. 6760008 Roja.....</p>	92
<p><b>Figura 3.</b> A) Número de tubérculos por planta producidos por 20 variedades y clones avanzados de papa expuestos a <i>Bactericera cockerelli</i> bajo condiciones de invernadero. B) Testigo sin insectos. 2004. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha=0.05</math>). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4 11; 20. 6760008 Roja.....</p>	93
<p><b>Figura 4</b> A) Rendimiento en 20 variedades y clones avanzados de papa expuestos a <i>Bactericera cockerelli</i> bajo condiciones de invernadero B) Testigo sin insectos. 2005. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha = 0.05</math>). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4 11; 20. 6760008 Roja.....</p>	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

---

### CAPÍTULO 3

<p><b>Figura 5.</b> A) Número de tubérculos por planta producidos por 20 variedades y clones avanzados de papa expuestos a <i>Bactericera cockerelli</i> bajo condiciones de invernadero B) Testigo sin insectos. 2005. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha = 0.05</math>). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4 11; 20. 6760008 Roja.....</p>	95
<p><b>Figura. 6.</b> Pardeamiento interno en tubérculos de 20 variedades y clones avanzados expuestos a <i>Bactericera cockerelli</i> bajo condiciones de invernadero 2004 (A) y 2005 (B). Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha = 0.05</math>). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4 11; 20. 6760008 Roja.....</p>	96
<p><b>Figura 7.</b> Síntomas de “amarillamientos por psílido”. <b>A</b>, en el cultivar Alpha <b>B</b>, en diferentes cultivares dentro de la jaula. Se observa retraso en el crecimiento y aumento en la intensidad de la clorosis.....</p>	85
<p><b>Figura 8.</b> Síntomas de pardeamiento y brotación anormal en papa. <b>A</b>, pardeamiento del tubérculo inducido por el psílido de la papa, superior izq.; testigo negativo, superior der. <b>B</b> y <b>C</b> brotación anormal mostrando brote fino o sin brotación (fila inferior), en contraste con brotación normal del tubérculo (fila superior).....</p>	86



## RESUMEN

El cultivo de la papa ha sido afectado por una enfermedad que induce el pardeamiento y la brotación anormal en el tubérculo, a ésta se le ha denominado punta morada de la papa (PMP). La PMP, asociada con un fitoplasma y *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, se han encontrado relacionadas con este síndrome, son de importancia mundial y se presentan en las principales zonas paperas de México. El objetivo de esta investigación fue dilucidar con más precisión los agentes causales (*B. cockerelli* y fitoplasma) involucrados en el pardeamiento y en la brotación anormal de los tubérculos de papa, diferenciar el efecto independiente de los mismos en genotipos de interés nacional e identificar los que puedan servir como fuentes de tolerancia a estas enfermedades. El porcentaje de transmisión por injerto del pardeamiento y la brotación anormal en papa de invernadero fue de 37%. Estos síntomas fueron inducidos por un patógeno infeccioso, que logró ser transmitido mediante injertos sucesivos hasta seis veces a través de diferentes genotipos de papa y chile. Mosca B, Alpha, Gigant, Lady Rosetta y NAU-6, presentaron un pardeamiento de muy leve a leve, el resto de los genotipos un pardeamiento de mediano a fuerte. El tipo de brotación anormal varió desde la falta de brotes, hasta los brotes débiles. La detección de fitoplasmas asociados a esta sintomatología en follaje, tallo y tubérculo mediante PCR, fue errática e inconsistente en plantas mantenidas en invernadero. Sin embargo, el patrón de RFLP de tubérculo sintomático de invernadero así como las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados obtenidas de 2 muestras (follaje y tubérculo) con síntomas, sugieren la presencia de un fitoplasma asociado al grupo amarillamiento del áster. La respuesta en rendimiento y número de tubérculos fue drásticamente reducida en los 20 genotipos por efecto de *B. cockerelli*, durante los dos años de estudio. Los síntomas de “amarillamientos por psílido” en el follaje, pardeamiento interno en los tubérculos, brotación prematura, brote fino y ausencia de brotación fueron inducidos por el psílido bajo condiciones de invernadero y en ausencia de fitoplasmas asociados con la enfermedad de la PMP. NAU-6, Alpha, Gigant y Lady Rosetta fueron tolerantes al pardeamiento interno del tubérculo causado por el insecto, observándose similitud con la tolerancia para PMP en los mismos genotipos, por lo que podrían ser utilizados como fuentes de tolerancia. El síntoma de “amarillamiento por psílidos” no fue transmitido por tubérculo, ni por injerto sucesivo, lo cual refuerza la idea de que metabolitos producidos por el psílido son responsables de la sintomatología inducida.

## ABSTRACT

Potato cultivar has been affected by a disease that induces tuber browning and abnormal sprouting, it has been named as potato purple top (PPT). PPT, associated with a phytoplasma and *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, have been related to this syndrome, are considered being of worldwide importance and are present in the main potato regions of Mexico. The aim of this research was to elucidate with more precision the causal agents (*B. cockerelli* and phytoplasma) involved in browning and abnormal sprouting of potato tubers, to differentiate the independent effect of both in national genotypes of importance, and to identify the ones that could be used as sources of tolerance to these diseases. The transmission percentage of browning and abnormal sprouting of greenhouse potato tubers was of 37. These symptoms were induced by an infectious pathogen that succeeded successive grafting transmissions, up to six times through different potato genotypes and pepper. Tuber internal browning ranged from very low to low moderate in Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant and Alpha, and from medium to medium high in the rest of the genotypes. Abnormal sprouting ranged from lack of sprouts to the occurrence of weak ones. PCR detection of phytoplasmas associated with greenhouse symptoms on foliage, stems and tubers was erratic and inconsistent; nevertheless, RFLP pattern from a symptomatic greenhouse tuber, the same as nucleotide sequences of the amplified products from 2 samples (foliage and tuber) of potato, suggests the presence of an associated phytoplasma of the aster yellows group. Yield and number of tubers response of the 20 genotypes was drastically reduced by the effect of *B. cockerelli*, during the two years of study. Psyllid yellows symptoms on foliage, internal browning of tubers, premature sprouting, hairy sprouts and lack of sprouting were induced by the psyllid under greenhouse conditions and in the absence of phytoplasmas associated with PPT. NAU-6, Alpha, Gigant and Lady Rosetta were tolerant to tuber internal browning caused by the insect; a similar behavior to PMP tolerance for the same genotypes was found, so they could be used as tolerance sources. Psyllid yellows symptoms were neither tuber, nor successive grafting transmitted. This strengthens the idea that metabolites produced by the psyllid are responsible for the induced symptomatology.

## RESUMEN

El cultivo de la papa ha sido afectado por una enfermedad que induce el pardeamiento y la brotación anormal en el tubérculo, a ésta se le ha denominado punta morada de la papa (PMP). La PMP, asociada con un fitoplasma y *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, se han encontrado relacionadas con este síndrome, son de importancia mundial y se presentan en las principales zonas paperas de México. El objetivo de esta investigación fue dilucidar con más precisión los agentes causales (*B. cockerelli* y fitoplasma) involucrados en el pardeamiento y en la brotación anormal de los tubérculos de papa, diferenciar el efecto independiente de los mismos en genotipos de interés nacional e identificar los que puedan servir como fuentes de tolerancia a estas enfermedades. El porcentaje de transmisión por injerto del pardeamiento y la brotación anormal en papa de invernadero fue de 37%. Estos síntomas fueron inducidos por un patógeno infeccioso, que logró ser transmitido mediante injertos sucesivos hasta seis veces a través de diferentes genotipos de papa y chile. Mosca B, Alpha, Gigant, Lady Rosetta y NAU-6, presentaron un pardeamiento de muy leve a leve, el resto de los genotipos un pardeamiento de mediano a fuerte. El tipo de brotación anormal varió desde la falta de brotes, hasta los brotes débiles. La detección de fitoplasmas asociados a esta sintomatología en follaje, tallo y tubérculo mediante PCR, fue errática e inconsistente en plantas mantenidas en invernadero. Sin embargo, el patrón de RFLP de tubérculo sintomático de invernadero así como las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificadas obtenidas de 2 muestras (follaje y tubérculo) con síntomas, sugieren la presencia de un fitoplasma asociado al grupo amarillamiento del áster. La respuesta en rendimiento y número de tubérculos fue drásticamente reducida en los 20 genotipos por efecto de *B. cockerelli*, durante los dos años de estudio. Los síntomas de “amarillamientos por psílido” en el follaje, pardeamiento interno en los tubérculos, brotación prematura, brote fino y ausencia de brotación fueron inducidos por el psílido bajo condiciones de invernadero y en ausencia de fitoplasmas asociados con la enfermedad de la PMP. NAU-6, Alpha, Gigant y Lady Rosetta fueron tolerantes al pardeamiento interno del tubérculo causado por el insecto, observándose similitud con la tolerancia para PMP en los mismos genotipos, por lo que podrían ser utilizados como fuentes de tolerancia. El síntoma de “amarillamiento por psílidos” no fue transmitido por tubérculo, ni por injerto sucesivo, lo cual refuerza la idea de que metabolitos producidos por el psílido son responsables de la sintomatología inducida.

## ABSTRACT

Potato cultivar has been affected by a disease that induces tuber browning and abnormal sprouting, it has been named as potato purple top (PPT). PPT, associated with a phytoplasma and *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, have been related to this syndrome, are considered being of worldwide importance, and are present in the main potato regions of Mexico. The aim of this research was to elucidate with more precision the causal agents (*B. cockerelli* and phytoplasma) involved in browning and abnormal sprouting of potato tubers, to differentiate the independent effect of both in national genotypes of importance, and to identify the ones that could be used as sources of tolerance to these diseases. The transmission percentage of browning and abnormal sprouting of greenhouse potato tubers was of 37. These symptoms were induced by an infectious pathogen that succeeded successive grafting transmissions, up to six times through different potato genotypes and pepper. Tuber internal browning ranged from very low to low moderate in Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant and Alpha, and from medium to medium high in the rest of the genotypes. Abnormal sprouting ranged from lack of sprouts to the occurrence of weak ones. PCR detection of phytoplasmas associated with symptoms on foliage, stems and tubers in the greenhouse was erratic and inconsistent; nevertheless, RFLP pattern from a symptomatic tuber, the same as nucleotide sequences of the amplified products from 2 samples (foliage and tuber) of potato, suggests the presence of an associated phytoplasma of the aster yellows group. Yield and number of tubers response of the 20 genotypes was drastically reduced by the effect of *B. cockerelli*, during the two years of study. Psyllid yellows symptoms on foliage, internal browning of tubers, premature sprouting, hairy sprouts and lack of sprouting were all induced by the psyllid under greenhouse conditions and in the absence of phytoplasmas associated with PPT. NAU-6, Alpha, Gigant and Lady Rosetta were tolerant to tuber internal browning caused by the insect; a similar behavior to PMP tolerance for the same genotypes was found, so they could be used as tolerance sources. Psyllid yellows symptoms were neither tuber, nor successive grafting transmitted. This strengthens the idea that metabolites produced by the psyllid are responsible for the induced symptomatology.



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

### INTRODUCCIÓN

Últimamente, se ha visto que la papa ha sido sumamente afectada por enfermedades que inducen el pardeamiento y la brotación anormal en el tubérculo. La punta morada de la papa (PMP) asociada con un fitoplasma y *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, que se cree causa un desorden en el metabolismo de la planta, se han encontrado relacionadas con este síndrome. Ambas enfermedades son de importancia mundial, se presentan en las principales zonas paperas de México y son una seria limitante en la producción de este cultivo.

La PMP, en algunos estados (Hidalgo, Tlaxcala y México) ha presentado incidencias que fluctúan entre el 30-90% de brotación anormal y en algunas localidades (Huamantla, Tlax.) los porcentajes son superiores al 50% en la variedad Atlantic. Esta enfermedad al afectar la parte interna de los tubérculos (haces vasculares) produce pardeamiento interno de los mismos, deteriorando su calidad industrial. Por otra parte, después de estar almacenados los tubérculos no brotan o producen brotes débiles o finos que al sembrarse pueden o no emerger, afectando de esta forma la calidad de la semilla. Se cree que el agente causal de ésta enfermedad es un fitoplasma; sin embargo, los postulados de Koch no han sido debidamente probados.

El psílido *B. cockerelli* (Sulc.), produce síntomas parecidos a los de la PMP. En algunos trabajos se menciona que éstos son inducidos por una toxina. El término de “amarillamientos por psílido” o “psyllid yellows” fue sugerido para la descripción

de este desorden que ha sido clasificado como una fitotoxemia sistémica y que parece estar relacionada con hormonas que promueven el crecimiento de la planta después de que el insecto en su estado ninfal, se ha alimentado de la misma (Carter 1939, 1962; Daniels, 1954). Desde 1920 se detectaron los problemas ocasionados por este insecto en Estados Unidos de América, actualmente está ampliamente distribuido en ese país y es una de las plagas más importantes en este cultivo (Cranshaw, 1994, 2002). En México, se han detectado daños por *B. cockerelli* en casi todas las zonas productoras de papa (Estado de México, Tlaxcala, Jalisco, Coahuila-Nuevo León y en Sonora) con excepción de Tapalpa, Jalisco en donde no se detectó (Rubio *et al.*, 2006,2007). Se le ha encontrado en el Distrito Federal y en Río Frío Edo. de México (Cranshaw, 1994), así como, en otras localidades de esta entidad y en los estados de Guanajuato, Chihuahua, Michoacán, Puebla, Veracruz, Durango, Coahuila, Tamaulipas, Baja California Norte, Aguascalientes y Nuevo León (López Flores, 2002; Zavala Quintana, 2002; Fuentes del Valle *et al.*, 1960). También se han reportado fuertes daños en cultivos de tomate del estado de California, E.U.A. y en Baja California, México (Cranshaw, 1994). Tomando en consideración lo anterior, y dado que en México se desconoce cuál es el papel de *B. cockerelli* y de fitoplasmas en el síndrome de la punta morada en papa, los **objetivos** del presente trabajo fueron: contribuir al esclarecimiento del papel que tienen ambos organismos (*B. cockerelli* y el fitoplasma), diferenciar el efecto independiente de los mismos en genotipos de papa de interés Nacional, e identificar los que puedan servir como fuentes de tolerancia a estas enfermedades.

## **REVISION DE LITERATURA**

### **Punta Morada de la Papa**

#### **Importancia y Distribución**

La PMP está distribuida mundialmente y es problema en algunos países de Asia. En los E.U.A. ha disminuido su importancia en los últimos años y no se sabe cuál es la causa (Maramorosh, 1998a, b). En México es uno de los principales problemas fitopatológicos de la papa en las principales zonas productoras de papa y en los valles y sierras del eje neo volcánico de México (Cadena-Hinojosa, 1974, 1987, 1993, 1996, 1999; Zavala Quintana, 2002; Zavala y Cadena-Hinojosa, 1998). En 1993 en algunas zonas paperas de los Estados de Hidalgo, Tlaxcala y México, se presentaron incidencias del 30% en brotación anormal (machos). En estos estados y en algunas áreas rurales altas del Distrito Federal existen localidades con incidencias bajas de PMP, con buenas condiciones para la producción de semilla, las cuales podrían ser utilizadas para esta actividad. Durante 1992, en Huamantla, Tlax., se presentaron incidencias superiores al 50% en la variedad Atlantic, lo cual repercutió seriamente en la calidad fritanguera de ésta (Cadena-Hinojosa, 1993).

#### **Sintomatología**

En la PMP se detiene el crecimiento, se presenta un enrollamiento apical y coloración purpúrea en los folíolos. Los tubérculos procedentes de las plantas afectadas pueden presentar diferentes grados de pardeamiento en la parte interna; se produce una brotación anormal, la cual consiste en brotes finos,

débiles o ausencia de brotación. En algunas variedades infectadas ocurre brotación aparentemente normal. A los tubérculos afectados se les llama machos (Cadena-Hinojosa, 1974, 1993); cuando estos son sembrados, producen plantas débiles o no brotan lo que da lugar a fallas en el cultivo (Cadena-Hinojosa, 1974, 1993; Cadena-Hinojosa y Galindo, 1986).

### **Agente Causal**

En trabajos iniciales el agente causal de la "Punta Morada de la Papa" en los E.U.A. (Leach, 1939) fue considerado por varios investigadores como el mismo que causa los amarillamientos del áster (Kunkel, 1926; Leach, 1939; Youkin, 1943; Leach y Bishop, 1944; Self y Darling, 1953) el cual es transmitido por la chicharrita *Macrosteles quadrilineatus* Forbes (Hirumi y Maramorosh, 1968; Maramorosh *et al.*, 1968). En 1967 se reportó evidencia de una posible etiología de origen fitoplásmico (Doi *et al.*, 1967). Se han encontrado fitoplasmas en el floema de plantas enfermas y en las glándulas salivales de los vectores infectivos (Maramorosh *et al.*, 1968). En México, en un estudio conjunto entre INIFAP y el Departamento de Agricultura de los E.U.A. (Cadena-Hinojosa, 1974; Maramorosh, 1998a) se observaron fitoplasmas al microscopio electrónico en ultracortes de tejido enfermo de plantas con síntomas de punta morada, procedentes de transmisión seriada por injerto, por lo cual se propuso que este tipo de patógenos pudiera ser el agente causal de esta enfermedad. Posteriormente se presentó evidencia adicional de la asociación de fitoplasmas con la PMP (Cárdenas *et al.*, 1992; Almeyda *et al.*, 1999, 2001; Martínez Soriano *et al.*, 1999). Almeyda *et al.*, (1999), encontraron que es posible la detección de fitoplasmas asociados con la punta morada en etapas tempranas de la enfermedad aún en plantas

asintomáticas. En investigaciones subsecuentes se ha determinado que por lo menos existen dos grupos de fitoplasmas asociados con la PMP en México (Almeyda *et al.*, 1999; Martínez Soriano *et al.*, 1999; Leyva López *et al.*, 2002). A la fecha, esta enfermedad es generalmente considerada de origen fitoplásmico, a pesar de que los postulados de Koch no han sido debidamente probados. La detección de éstos patógenos se realiza por inspecciones visuales (Cadena-Hinojosa, 1974 y 1993) o mediante hibridización de ácidos nucleicos y PCR (Lee *et al.*, 1993); sin embargo, a la fecha no se cuenta con una técnica de rutina práctica y de fácil manejo para la detección de los mismos.

### **Manejo de la Enfermedad**

En el área donde está ubicado el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX-INIFAP), se presentan todos los años incidencias altas de la PMP, situación que se ha utilizado para establecer estudios enfocados a su control en esta localidad (Cadena-Hinojosa, 1974, 1987). En evaluaciones de materiales genéticos se encontraron algunos clones con cierta tolerancia al pardeamiento asociado con la enfermedad (Cadena-Hinojosa, 1974, 1987, 1993, 1996; Cadena-Hinojosa y Galindo, 1986). En evaluaciones de insecticidas se encontró que el forato y aldicarb aplicados al momento de la siembra y el ometoato y otros insecticidas sistémicos en aplicaciones foliares disminuyeron considerablemente la incidencia y severidad de la PMP (Cadena-Hinojosa, 1974, 1996). Posteriormente se encontró que con la aplicación de imidacloprid combinada con una alta densidad de siembra se redujo también la incidencia de la enfermedad (Cadena-Hinojosa, 1999).

## ***Bactericera cockerelli***

### **Importancia y Distribución**

El psílido *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Sulc.) es uno de los insectos más importantes en el cultivo de la papa en el oeste de los Estados Unidos de América (Cranshaw, 1993, 1994, 2002). Se le ha reportado en los estados de Minnesota, North and South Dakota, Nebraska, Kansas, Oklahoma, Texas y en todos los estados del oeste, excepto Oregon y Washington (Pletsch, 1947). Cranshaw (1993, 1994) menciona que desde 1920 se detectaron los problemas ocasionados por el psílido de la papa en E.U.A. y que actualmente está ampliamente distribuido en este país. En años recientes el daño en papa ha sido más consistente en Colorado, Wyoming y Nebraska, aunque también se han reportado daños severos en Montana, Texas, Nuevo México, Arizona, Utah y California. En Canadá se ha reportado en Alberta y Saskatchewan (Cranshaw, 1994). En México, en años recientes se han detectado daños por *B. cockerelli* en casi todas las zonas productoras de papa, con excepción de Sonora y Sinaloa, por lo que se estima que afecta el 70% de la superficie sembrada con papa en México (Rubio *et al.*, 2002). Se le ha encontrado en el Distrito Federal y en Río Frío, Puebla (Cranshaw, 1994), así como en otras localidades de esta entidad y en los estados de Guanajuato, Chihuahua, Michoacán, Puebla, Veracruz, Durango, Coahuila, Tamaulipas, Baja California Norte, Aguascalientes y Nuevo León (López Flores, 2002; Zavala Quintana, 2002; Fuentes del Valle *et al.*, 1960).

La población de este insecto se ha incrementado aceleradamente en los últimos 10 años en el centro de la República Mexicana. Una de las causas ha sido el uso exagerado de insecticidas, con los cuales se han matado muchos enemigos naturales del psílido de la papa y consecuentemente se ha provocado un desequilibrio en el control natural de los insectos. Por otro lado, el uso intensivo de insecticidas ha inducido resistencia en este insecto por lo que actualmente ha disminuido el efecto de muchos insecticidas sobre su control (Rubio *et al.*, 2006).

También se han reportado fuertes daños en cultivos de tomate del estado de California, EUA, y en Baja California, México (Cranshaw, 1994). En Perú (Comunicación personal, Luis Salazar, Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú) se ha encontrado un psílido que parasita papa (*Russelliana solanicola*), el cual es diferente al identificado en México (*B. cockerelli*) (Fuentes del Valle *et al.*, 1960; Sifuentes, 1977). *B. cockerelli* es un insecto que puede atacar varios cultivos (Pletsch, 1947; Wallis, 1955). Pletsch (1947), reportó que la papa es el hospedero favorito para la oviposición, comparada con otras solanáceas.

### **Sintomatología**

Los síntomas atribuidos al psílido en el follaje de la papa son: retraso en el crecimiento, clorosis, posteriormente la hojas se enrollan y presentan un acopamiento, los entrenudos se acortan, se engrosan los nudos y se producen tubérculos aéreos. Se presenta amarillamiento marginal de las hojas jóvenes con subsecuente necrosis y degeneración, hay elongación de tallos en brotes aéreos y tubérculos axilares o pequeñas rosetas de hojas malformadas, pueden desarrollarse en el entrenudo, a manera de “escoba de bruja” (Carter, 1939). Una respuesta característica es la formación de pequeños tubérculos subterráneos,

muchos de los cuales brotan prematuramente (Carter, 1939). En los tubérculos subterráneos se presenta un pardeamiento, que puede llegar a necrosis (Díaz Valasis y Cadena-Hinojosa, datos no publicados) y una brotación anormal cuando estos se colocan en el almacén (Cranshaw, 1994, 2002), la cual consiste en la brotación prematura y en la producción de brotes débiles.

En un experimento realizado bajo condiciones semicontroladas en el invernadero del Campo Experimental Valle de México, INIFAP, los tubérculos afectados por este insecto, al ser almacenados, produjeron brotes finos y algunas veces no brotaron (Díaz-Valasis y Cadena- Hinojosa, datos no publicados).

### **Asociación de la sintomatología con “toxina” inyectada por el insecto.**

Se ha asociado el síntoma de amarillamientos por psílido en plantas de papa y tomate con una “toxina” que es introducida por el insecto al momento de alimentarse (Carter, 1950; Arslan *et al.*, 1985). Los amarillamientos por psílido pertenecen al pequeño grupo de toxicosis complejas en las cuales el efecto de la secreción tóxica del insecto es sistémica. Los efectos sistémicos son probablemente más desarrollados en esta enfermedad que en cualquier otra de su tipo, debido a que toda la planta se ve afectada (Carter, 1939). Se ha reportado que dicho síntoma en las plantas hospederas del psílido es ocasionado por la alimentación del insecto en su estadio ninfal y el uso de poblaciones de adultos de arriba de 1000 individuos por planta no produjo amarillamientos por psílido (Richards, 1931). El tiempo requerido para producir síntomas, así como la intensidad de estos se relaciona con el número de ninfas utilizadas. Aunque los primeros síntomas aparecen después de los tres días de estarse alimentando las

ninfas, un cuadro sintomático completo no se obtiene, a menos que estas se alimenten continuamente por 36 días. Si el período de alimentación es menor a 26 días, las plantas expuestas se recuperan (Richards, 1931). Carter (1950) encontró que no todas las ninfas tienen la capacidad de producir una reacción tóxica; sin embargo, existe evidencia positiva de la “infectividad” de las ninfas procedentes de huevecillos en plantas sanas las cuales resultaron ser más intensas en su “infectividad” que las que crecieron en plantas enfermas. Esto indica que el insecto puede ser inherentemente toxicogénico (Richards y Blood, 1933). Blood *et al.*, (1933) reportaron que los síntomas de amarillamiento fueron inducidos en las plantas cuando se alimentaron al menos 30 ninfas de psílido; si los insectos eran removidos las plantas recuperaban su desarrollo normal. Sin embargo, la habilidad para producir una reacción tóxica es irregular. Algunas ninfas nunca son tóxicas, mientras otras pueden inducir enfermedad por corto tiempo y después volverse no tóxicas (Carter, 1950). La naturaleza sistémica de la toxina que produce “amarillamientos por psílido” se ha demostrado por su habilidad de ser transmitida a través del injerto. Al realizar injertos subsecuentes, resulta una recuperación gradual en forma de una reacción reversible (Daniels, 1954).

Los síntomas de “amarillamientos por psílido” no se han podido inducir mediante inyección (Daniels, 1954) en tomate o papa. Tampoco la aplicación tópica de soluciones de macerados de psílido o extractos salivales colectados en sistemas de membrana durante la alimentación (Abernathy, 1991) causaron síntomas consistentes. Sin embargo, los extractos de ninfas de psílido introducidos en plantas sanas produjeron síntomas similares a los que se observan en el campo (Schaal, 1938). La naturaleza real del principio infectivo inyectado a las plantas de papa por *B. cockerelli* permanece aún oscuro y sin resolver. Se sugiere la

posible existencia de alguna sustancia tóxica involucrada la cual es producida de alguna manera durante el proceso de alimentación de la ninfa del psílido (Richards y Blood, 1933).

### **Distribución e Incidencia del pardeamiento y brotación anormal en el campo.**

Los síntomas que causa *B. cockerelli* en el follaje y en los tubérculos son similares a los que causa la punta morada de la papa, sin embargo, los daños que causa el insecto son parcialmente reversibles (Cranshaw, 1994, 2002) y los que causa la PMP no los son (Cadena-Hinojosa, 1974). La prevalencia de PMP y de los desórdenes fisiológicos causados por *B. cockerelli* han ido en aumento en la región central de México, aunque también se han detectado localidades con baja incidencia. Sin embargo, no existen reportes publicados que consignen resultados de evaluaciones formales enfocadas a estimar su incidencia real. En el trabajo de Cadena-Hinojosa *et al.* (2003) se analizó la distribución espacial regional de la incidencia y severidad de la brotación anormal y el pardeamiento de tubérculos de papa asociados con PMP y *B. cockerelli*, en diferentes genotipos cultivados en los valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, con el objeto de identificar localidades de baja, mediana o alta incidencia que pudiesen ser utilizados en el futuro para la producción de papa (comercial o para semilla) o para la evaluación de genotipos o sistemas de manejo integrado del cultivo que permitan el control de estas enfermedades. En este mismo estudio encontraron que el pardeamiento en la parte interna de los tubérculos varió de leve a leve-moderado en NAU-6, Alpha y Gigant, y de moderado a moderado-fuerte en el resto de las variedades. El tipo de brotación anormal observada en los

tubérculos de todas las variedades varió desde la falta de brotes, hasta los brotes débiles. Los brotes finos fueron más comunes en NAU-6, Alpha y Gigant. En la variedad Norteña generalmente hubo ausencia de brotación y en algunas ocasiones se presentaron brotes finos y brotes aparentemente normales en el mismo tubérculo (Cadena-Hinojosa *et al.* 2003).

### **Zebra chip, importancia y distribución.**

En 2004, Secor y Rivera-Varas reportaron el efecto “zebra chip” en hojuelas de papa fritas. Este desorden consiste en un patrón de bandeo (striped pattern), el cual se hace más evidente después de la fritura. Se observó en el sur de los E.U.A., México y Guatemala (Secor y Rivera-Varas, 2004). Recientemente, Munyanesa *et al.* (2007) reportaron la asociación de *B. cockerelli* con los síntomas del “zebra chip”; sin embargo, no mencionan que tipo de brotación producen en el almacén los tubérculos afectados por este problema.

### **Medidas de Control para el Psílido de la Papa**

#### **Resistencia de la planta hospedera**

Se ha reportado resistencia parcial al amarillamiento por psílicos entre cultivares de papa (Schaal, 1947; Starr, 1939); sin embargo, no ha sido suficiente como para tener alguna importancia comercial (Starr, 1939). Una evaluación de ocho cultivares mostró una disminución en el rendimiento de 19-65% por efecto de daño inducido por el insecto al alimentarse (Cranshaw, 1989). Las poblaciones de insectos en varios cultivares de papa difirieron en un rango de solamente el doble de estos, sugiriendo esto que hay pequeñas diferencias en mecanismos de

antixenosis o antibiosis en estos cultivares. Sin embargo, hay evidencia de que existe tolerancia al efecto de la toxina del psílido porque la susceptibilidad relativa a estos fue pobremente correlacionada con el rendimiento. El cultivar que mostró la mínima respuesta al control por psílicos fue Norland, el cual es un cultivar de maduración temprana y el efecto mínimo del insecto es probablemente debido al escape que a la tolerancia. En el Campo Experimental del Valle de México, INIFAP, la incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal de los tubérculos fueron altos, por lo que esta localidad podría utilizarse para la evaluación de genotipos y de tecnologías para su control. En Calimaya, Edo. de México y algunas localidades circunvecinas, en los sitios Panteón parte alta de Juchitepec, Edo. de México y en La Presa, Calpulalpan, Tlaxcala, los porcentajes fueron bajos por lo que podrían servir para continuar y/o establecer lotes para la producción de papa (Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003).

### **Control Biológico**

El control biológico se basa principalmente en el uso de insectos entomófagos como es la crisopa *Chrisoperla carnea*, cuya larva es un depredador de huevecillos y ninfas de *B. cockerelli*. Se recomienda liberar 3000 larvas/Ha en su segundo estadio, teniendo cuidado de no aplicar insecticidas inmediatamente después de su liberación (Maya *et al.*, 2003). Las aspersiones con microorganismos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecani* se pueden utilizar como control biológico (Al-Jabr, 1999), sin embargo su uso restringe la aplicación de los fungicidas que normalmente se aplican al cultivo de papa. La siembra de variedades resistentes al tizón tardío es un elemento importante en el control biológico, ya que el uso de

fungicidas se disminuye notablemente y permite la utilización de microorganismos entomopatógenos. Se ha reportado a insectos depredadores que se alimentan de varios estadios del psílido de la papa entre los que se incluyen a las larvas de los crisópidos, diversos coccinélidos, y una variedad de hemípteros que incluyen a *Nabis ferus* (L.), *Geocoris decoratus* Uhler, *Orius tristicolor* (White), *Anthocoris melanocerus* Reut., y *Daraeocoris brevis* (Uhler) (Knowlton, 1933 a,b,c; 1934,1936; Pletsch, 1947). Aunque estos depredadores se alimentan de los psílidos en el campo, sus efectos en la regulación de la población son leves y considerablemente menos importantes que los factores abióticos, tales como el clima. Según Pletsch (1947) solo los crisópidos justifican investigación más profunda. El psílido de la papa también es comúnmente atacado por una avispa parasítica, *Tetrastichus triozae* Burks. La avispa hembra paraliza estadios avanzados y deposita huevecillos en la superficie ventral del psílido. Las avispas en desarrollo permanecen fuera de las paredes del cuerpo, cortando un hoyo de emergencia a través del escudo de la ninfa parasitada del insecto (Jensen, 1957; Pletsch, 1947). Bajo condiciones de campo, la liberación de estas avispas no se sincronizó con el ciclo biológico del psílido de la papa y fueron poco prometedoras para el control natural de este insecto (Johnson, 1971; Pletsch, 1947).

### **Control Químico**

Durante los años 30's y 40's se utilizaron ampliamente mezclas de cal y azufre; sin embargo, este tratamiento fue fitotóxico (List, 1935). Los insecticidas sistémicos a base de organofosfatos aplicados al suelo como forato (Gerhardt y Turley, 1961) y disulfoton son eficaces para el control de los psílidos (Harding, 1962) y continúan usándose para el manejo del insecto en papa (Cranshaw,

1989). Gerhardt (1966) también logró buen control con aldicarb, aunque en años recientes en pruebas realizadas en Colorado E.U.A. se ha visto control pobre e inaceptable con este producto y otros insecticidas a base de carbamatos (Cranshaw, datos no publicados). Insecticidas sintéticos alternativos que incluyen piretroides y organofosfatos, así como endosulfan aplicado mediante aspersiones foliares proveen un control aceptable; sin embargo, se requiere de una cobertura total para cubrir a las ninfas del psílido que se alimentan en el envés de las hojas.

La aplicación de insecticidas se debe iniciar inmediatamente después de que se detecten los primeros insectos adultos, los cuales se pueden monitorear con trampas pegajosas amarillas o con trampas hechas con charolas de color amarillo que contienen agua. Entre los insecticidas que han dado mejores resultados en diferentes pruebas de campo y laboratorio se encuentran: Abamectina, Clorpirifos, Clothianidin, Thiacloprid, Imidacloprid, Azufre y Pyriproxifen. De estos insecticidas, Abamectina, Azufre, Pyriproxifen y Spiromesifen son los que menos daños causan a la fauna benéfica. En el control de todos los insectos es muy importante hacer rotación de los insecticidas para evitar que los insectos desarrollen resistencia a los mismos. Un factor que dificulta el control del insecto es el hecho de que las ninfas se desarrollan preferentemente en el envés de las hojas inferiores, por lo que es difícil que los insecticidas alcancen estas partes de la planta cuando el follaje es muy abundante. Por esta razón, la aplicación de insecticidas debe ser dirigida a las partes inferiores de las plantas, preferentemente con bombas de motor o con aspersoras que crean un flujo de aire (Maya *et al.*, 2003; Avilés *et al.*, 2005; Bujanos *et al.*, 2005).

**LITERATURA CITADA**

- Abernathy, R.L. 1991. Investigations into the nature of the potato psyllid toxin. M.S. Thesis. Colorado State University, Ft. Collins, CO. 54 p.
- Al-Jabr, A. M. 1999. Integrated Pest Management of Tomato / Potato Psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Homoptera: *Psyllidae*) with Emphasis on its Importance in Greenhouse Grown Tomatoes. Ph. D. Dissertation. Colorado State University. 76p.
- Almeyda-León, I.H., Rubio, O., Cadena-Hinojosa, M.A., Díaz, M., Zavala, T.E., Rocha, M.A., y 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, Produce. Informe de Avances. 19p.
- Almeyda-León, I. H., Rocha-Peña, M. A., Piña\_Razo, J., and Martínez-Soriano, J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:1-9.
- Arslan, A., Bessey, P.M., Matsuda, K., and Oebker, N.F. 1985. Physiological effects of psyllid (*Paratrioza cockerelli*) on potato. *American Potato Journal* 62:9-22.
- Avilés, G. M.C., Domínguez, A. F., Nava, C. U., Wong, P. J. de J., Pérez, J. J., y Velarde, F. S. 2005. Evaluación de la efectividad biológica de varios insecticidas para el control del psílido del tomate *Bactericera* (= *Paratrioza*) *cockerelli* (Sulc.) (Homóptera: *Psyllidae*) en el cultivo de chile Bell en la Cruz de Elota, Sinaloa, México. pp. 86-92.

- Blood, H.L., Richards, B.L., and Wann, F.B. 1933. Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology* 23:930.
- Bujanos, M. R., Garzón, T.J.A., y Marín, J. A. 2005. Manejo integrado del pulgón saltador *Bactericera* (=Paratrioza) *cockerelli* (Sulc.) (Hemíptera: Triozidae) en los cultivos de solanáceas en México. *Memorias de la Segunda Convención Mundial de Chile. Plagas*. pp. 93-99.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1974. Estudios sobre la "Punta Morada de la Papa". Tesis de Maestría. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. 70 p.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1987. Efecto de genotipos de plantas, aplicaciones de antibióticos e insecticidas en el control de la "Punta Morada de la Papa". *Agricultura Técnica en México* 13:3-13.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1993. La Punta Morada de la Papa en México: Incidencia y búsqueda de resistencia. *Agrociencia* 4:247-256.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1996. La punta morada de la papa en México: II Efecto de cubiertas flotantes, cultivares y productos químicos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14:20-24.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1999. Potato Purple Top in Mexico: Effects of plant spacing and insecticide application. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:91-95.
- Cadena-Hinojosa, 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 planta y aplicación de insecticidas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3:100-104.

- Cadena-Hinojosa, M. A., Guzmán-Plazola, R., Díaz-Valasis, M., Zavala Quintana, T.E., Magaña-Torres, O.S., Almeyda-León, I.H., López-Delgado, H., Rivera-Peña, A., y Rubio-Covarrubias, O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:248-259.
- Cárdenas, S.E., Valdovinos, P.G., Cadena, H.M., y Estañol, B.E. 1992. Detección de organismos tipo micoplasmas en plantas de papa con los síntomas de "punta morada". *Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Cuernavaca, Morelos, México.pp.62.
- Carter, R.D. 1950. Toxicity of *Paratrioza cockerelli* to certain solanaceous, Ph.D. Dissertation. University of California Berkeley California,USA. 128 p.
- Carter, W.1939. Injuries to plants caused by insect toxins. *Botanical Review*. 5(5): 273- 326.
- Carter, W. 1962. *Insects in Relation to Plant Disease*. Interscience Pub. New York. 705p.
- Cranshaw, W.S. 1993. An Annotated bibliography of Potato/Tomato Psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae). Colorado State University. Agricultural Experiment Station Bulletin TB93-5. 52p.
- Cranshaw, W.S. 1989. The potato/tomato psyllid as a vegetable insect pest. *Proc., 18th Ann. Crop Prot. Inst., Colorado State University*.pp 69-76.
- Cranshaw, W.S. 1994. The Potato (Tomato) Psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) as a pest of potatoes. In: G.W. Szender, L.M., Powelson, R.K. Jansson, and K.V. Raman (eds.). *Advances in Potato Pest Biology and*

- Management. The American Phytopathological Society St. Paul Minnesota. pp. 83-94.
- Cranshaw, W.S. 2002. Manejo del psílido de la papa /tomate en el cultivo de la papa. Memorias del XI congreso Nacional de Productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002. León, Guanajuato, México. pp. 46-51.
- Daniels, L.B. 1954. The nature of the toxicogenic condition resulting from the feeding of the tomato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc.). Ph. D. Dissertation. University of Minnesota. 119 p.
- Doi, M., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT group like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry Dwarf, Potato Witches broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches broom. Annals of the Phytopathological Society of Japan 33:259-266.
- Fuentes del Valle, O., García Palacios, O., y Mercado, Guerrero A. 1960 Control de plagas y del amarillamiento de la papa con Thimet al 10% granulado en la región de Navidad Nuevo León. II Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología Escuela Nacional de Agricultura Chapingo, Edo. de México. pp.199-205.
- Gerhardt, P.D., and Turley, D.L. 1961. Control of certain potato insects in Arizona with soil applications of granulated phorate. Journal of Economic Entomology 54:1217-1221.
- Gerhardt, P.D. 1966. Potato psyllid and green peach aphid control on Kennebec potatoes with Temik and other insecticides. Journal of Economic Entomology 59:9-11.

- Harding, J.A. 1962. Tests with systemic insecticides for control of insects and certain diseases on potatoes. *Journal of Economic Entomology* 55:62-64.
- Hirumi, H., and Maramorosh, K. 1968. Mycoplasma like bodies in the salivary glands of insect vectors carrying the Aster Yellow Agent. *Journal of Virology* 3:82-84.
- Jensen, D. D. 1957. Parasites of the Psyllidae. *Hilgardia*. 27:71-98.
- Johnson, T. E. 1971. The effectiveness of *Tetrastichus triozae* Burks (Hymenoptera: Eulophidae) as a biological control agent of *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae) in north central Colorado. M.S. Thesis. 45p.
- Knowlton, G.F.1933a. Aphis lion predators of the potato psyllid. *Journal of Economic Entomology* 26:977.
- Knowlton, G.F.1933b. Ladybird beetles as predators of the potato psyllid. *Canadian Entomologist* 65:241-243.
- Knowlton, G.F.1933c. Notes of injurious Utah insects: Potato psyllid *Proc.Utah Academy of Science* 10:153.
- Knowlton, G.F.1934. A big-eyed bug predator of the potato psyllid. *Florida Entomol.* 18:40-43.
- Knowlton, G.F., and Allen, M. 1936. Three hemipterous predators of the potato psyllid. *Proc. Utah Academy of Science* 13:293-294.
- Kunkel, L.O. 1926. Studies on Aster Yellows. *American Journal of Botany* 13:646-705.
- Leach, J.G. 1939. Further experiments on the cause of "purple top wilt" of potatoes. *Phytopathology* 29:14. (Abstract).

- Leach, J.G., and Bishop, C.F. 1944. Further studies on the nature and cause of purple top wilt of potatoes. *Phytopathology* 34:1006-1007 (Abstract).
- Lee, I.-M., Hammond, R., Davis, R.E., and Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Leyva-López, N.E. y Martínez-Soriano, J.P. 2002. Diagnóstico diferencial de fitoplasmas en papa y su aplicación en la búsqueda de vectores. Memorias del Taller Internacional de Trabajo sobre la Punta Morada de la Papa y *Paratrysoza cockerelli*. INIFAP Y CONPAPA. Enero 17, 2002. Toluca, Edo. de México. pp. 34-51.
- List, G. M. 1935. Psyllid yellows of tomatoes and control of the psyllid *Paratrysoza cockerelli* (Sulc.), by the use of sulfur. *Journal of Economic Entomology* 28:431-436.
- López Flores C.I. 2002 Estudios sobre el psílido de la papa (*Paratrysoza cockerelli*) en la Región del Bajío. Memorias del XI Congreso Nacional de Productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002. León, Guanajuato, México. pp. 98-109.
- Maramorosch, K. 1998a. Potato Purple Top Wilt. Memorias del 2º Simposio Internacional de la Papa. Agosto 13-15, 1998. Toluca, Edo. de México. pp. 21-31.
- Maramorosch, K. 1998b. Current status of potato purple top wilt. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 16:61-72.
- Maramorosch, K., Shikata, E., and Granados, R. 1968. Structures resembling Mycoplasma in diseased plants vectors. *Transactions of the New York Academy of Sciences* 30:841-855.

- Martínez, Soriano, J.P., Leyva-López, N.E., Zavala-Soto, M.E., Beres, M., y Leal-Klevezas, D.S. 1999. Detección molecular del agente causal de la “bola de hilo” de la papa en semillas infectadas y asintomáticas. *Biotecnología Aplicada* 16:93.
- Maya, H. V., Ramírez O. J., Cortez O. R., Vega M. R., y Moreno Ch. J.G. 2003. Manejo integrado del pulgón saltador en jitomate en el estado de San Luís Potosí. Folleto técnico No. 22. Campo Experimental Palma de la Cruz, S.L.P. INIFAP.
- Munyanenza, J.E., Crosslin, J.M., and Upton, J.E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “Zebra Chip,” a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100:656-663.
- Pletsch, D.J. 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc.), its biology and control. Montana Agricultural Experiment Station Bulletin 446. 95 p.
- Richards, B.L. 1931. Further studies with psyllid yellows of the potato. *Phytopathology* 21:103 (Abstract).
- Richards, B.L. and Blood, H.L. 1933. Psyllid yellows of the potato. *Journal of Agricultural Research* 46:189-216.
- Rubio Covarrubias, O.A., Almeyda, L.H., Sánchez, S.A., Ireta, M.J., Fernández, R., Borbón, S.J.T., López, D.H., Díaz, H.C., Garzón, T.A., Rocha, R.R., Cadena, H.M. 2002. Importancia y distribución de la punta morada de la papa en México. Memorias del Taller Internacional de Trabajo sobre la Punta Morada de la Papa y *Paratrioza cockerelli*. INIFAP y CONPAPA. Enero 17, 2002. Toluca, Edo. de México. pp. 1-11.
- Rubio Covarrubias, O. A., 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. Importancia de la punta morada y *Bactericera cockerelli* en las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura Técnica en México* 32:201-211.
- Rubio Covarrubias, O. A., Fernández, S. R., Magallanes, G. V., Díaz, H.C., Cadena, H. M. A. 2007. El Cultivo de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Estado de Tlaxcala. Folleto Técnico. 31 INIFAP CIRCE-Tlaxcala 52 p.
- Schaal, L.A. 1938. Some factors affecting the symptoms of the psyllid yellows disease of potatoes. *American Potato Journal* 15:193-212.
- Secor, G.A., and V.V. Rivera-Varas. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Rev. Latinoamericana de la Papa (Suppl.)* 1:1-8.
- Self, R.L., and Darling, H.M. 1953. Purple top disease of the potato in Wisconsin. *Research Bulletin* 184. University of Wisconsin. Madison, USA. 24p.
- Sifuentes, J.A. 1977. Plagas de algunas hortalizas en México. Folleto de Divulgación No. 53. INIFAP, México D.F. 48p.
- Starr, G.H. 1939. Psyllid yellows unusually severe in Wyoming. *Plant Disease Reporter* 23:2-3.
- Wallis, R.L. 1955. Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin 1107:25.
- Youkin, S.G. 1943. Purple top wilt caused by the Aster Yellows virus. *American Potato Journal* 20:117-183.

Zavala Quintana, T.E. y Cadena-Hinojosa, M.A. 1998. Punta Morada de la Papa. Resúmenes, Tecnología de Cultivo de Papa, CONPAPA, INIFAP, Toluca Edo. de México. pp. 17-19.

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



**Figura 4.** Síntomas característicos de PMP observados en campo **A.** disminución en el crecimiento, enrollamiento de las hojas, clorosis, coloración roja o púrpura en la base de los folíolos **B.** engrosamiento de nudos y proliferación de brotes axilares con hinchamientos en la base.



**Figura 5. A**, injerto seriado de papa con síntomas de PMP. **B**, síntomas de PMP (amarillamientos y coloración purpúrea en los márgenes de la base de los folíolos) en planta de papa después de injertos seriados en invernadero.

**A****B****C**

**Figura 6.** Pardeamiento en el tubérculo por PMP. **A**, diferentes intensidades de pardeamiento en tubérculo de papa procedente del campo. Izq. superior muy leve (0L); der. superior testigo sin síntomas; izq. inferior, ataque severo (F); der. inferior ataque moderado (M). **B**, corte superior; tubérculo de papa procedente de campo con ataque severo de pardeamiento (F); corte inferior; testigo sin síntomas. **C**, Pardeamiento moderado fuerte (MF) en el cultivar Zafiro, inducido por injerto seriado, bajo condiciones de invernadero.

**B****C**

**Figura 7.** Brotación anormal en tubérculos de papa. **A**, tubérculos de campo. Izq. sin brotar; centro, brote normal; der. brote fino. **B**, tubérculos de papa de invernadero. Izq. brote fino; centro, brote normal; der. brote fino. **C**, papa con brote fino de invernadero.



**Figura 8.** Síntomas de “popotillo” en jitomate. **A.** Superior der. “popotillo” en jitomate, se observa disminución en el crecimiento y amarillamiento en el ápice e inicio de proliferación de brotes. Izq testigo.



**B**

**B.** amarillamientos, proliferación de brotes, disminución del tamaño de las hojas y del rendimiento. Estos síntomas se presentaron después de injertar jitomate con esquejes de papa con síntomas de PMP procedente de invernadero.

## CAPÍTULO 2

### ETIOLOGÍA DEL PARDEAMIENTO Y LA BROTAÇÃO ANORMAL EN LOS TUBÉRCULOS DE PAPA EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO

#### RESUMEN

La punta morada de la papa (PMP) es un problema fitosanitario importante en México. Afecta el rendimiento y la calidad de los tubérculos por el pardeamiento y la brotación anormal asociados con ésta. A la fecha, esta enfermedad es considerada de origen fitoplásmico, a pesar de que los postulados de Koch no han sido debidamente probados, por lo que el propósito de esta investigación fue determinar la etiología del pardeamiento y la brotación anormal y caracterizar la sintomatología inducida por PMP en las principales variedades y clones avanzados de papa en México. Para aislar al agente causal de la PMP, se realizaron durante 2005 y 2006 muestreos y colección de aislamientos de PMP a partir de esquejes con síntomas de 19 genotipos en campo, con los cuales se injertaron plantas de papa, chile y jitomate en invernadero. Se realizaron injertos seriados de clones con síntomas de PMP, transmitidos por tubérculo-semilla. Se monitoreó la presencia de fitoplasmas en plantas de papa, chile y jitomate mediante prueba de PCR, se realizó análisis por RFLP y secuenciación de los productos de PCR de muestra sintomática de follaje y tubérculo de papa de invernadero. La mayoría de aislamientos procedentes de los 19 genotipos de papa se transmitieron en alguna de las variedades injertadas. Sangema tuvo 52.63%, Michoacán 42.10%, Norteña 31.57% y NAU6 5.2%. Los esquejes procedentes de papas de invernadero con síntomas de PMP transmitidos por

semilla-tubérculo indujeron síntomas de “popotillo” en jitomate; sin embargo, al volver a injertar en papa ya no se observaron síntomas en el follaje, ni pardeamiento en los tubérculos y no se detectó fitoplasma mediante PCR. El pardeamiento en la parte interna de los tubérculos varió de nulo a leve-moderado en Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant y Alpha, y de moderado a moderado-fuerte en el resto de los genotipos. El tipo de brotación anormal varió desde la falta de brotes, hasta los brotes débiles. Ambos tipos se observaron en Atlantic, Bintje, Michoacán, NAU-6 y Norteña. Los brotes finos fueron más comunes en el resto de los genotipos. La incidencia del pardeamiento y la brotación anormal fluctuó de 77.8% en Lady Rosetta a 100% en Norteña, Zafiro, Sangema y Mosca B. Generalmente, los tubérculos que presentaron pardeamiento de mediano fuerte a fuerte no brotaron y los de muy leve a leve produjeron brotes finos. El porcentaje de transmisión para la PMP fue de 37 y se determinó por el número de plantas injertadas que dieron síntomas de pardeamiento en el tubérculo, con respecto al total. El pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos fueron inducidos por un patógeno infeccioso, transmitido hasta por 6 injertos sucesivos en invernadero. En pruebas de PCR en follaje y tubérculo de NAU-6, Norteña, Michoacán y Alpha, la detección fue de 16.37%. Para el caso de chile manzano y mixquic, ésta fue del 70.83% y 66.6% respectivamente, en jitomate no se registró. Chile, puede actuar como hospedante intermediario o alternativo en la transmisión del patógeno involucrado en el pardeamiento y la brotación anormal del tubérculo. La detección de fitoplasmas asociados con el pardeamiento y la brotación anormal del tubérculo mediante PCR fue errática e inconsistente en invernadero y fue consistente en campo. El patrón de RFLP y

secuencias de nucleótidos obtenidas de los fragmentos amplificados de la muestra de follaje y tubérculo de papa de invernadero, sugieren la presencia de un fitoplasma asociado al grupo amarillamiento del áster.

## **ABSTRACT**

Potato purple top (PPT), which is considered to be an important problem in Mexico, affects yield and quality of tuber-seed for it induces browning and abnormal sprouting of tubers associated with the disease. At present it is considered to be of phytoplasma origin; even though, Koch's postulates have not been appropriately proven, so the objectives of this study were: 1) to determine the etiology of browning and abnormal sprouting and 2) to characterize the induced symptomatology by PPT in the main varieties and advanced potato clones in Mexico. To isolate the causal agent of PPT, during 2005 and 2006 field sampling and collection of isolates from 19 symptomatic genotypes was carried on. These were serially grafted, under greenhouse conditions, in potato, pepper and tomato plants. Serial grafting from symptomatic PPT tuber-seed transmitted clones in the greenhouse, were also done. Monitoring of phytoplasma in potato, pepper and tomato plants through PCR (polymerase chain reaction) assay was carried on. RFLP analysis and nucleotide sequencing of PCR products from symptomatic foliage and tuber greenhouse samples were run. Most of the isolates were transmitted at least in one of the grafted varieties. Sangema had 52.63% graft transmission, Michoacan 42.10%, Norteña 31.57% y NAU6 5.2%. Grafts from symptomatic PPT clones tuber-seed transmitted in the greenhouse induced "popotillo" symptoms in tomato; nevertheless, when grafting them again in potato

plants, no symptoms were developed on foliage, neither in tubers and phytoplasma through PCR was not detected. Tuber internal browning ranged from null to low moderate in Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant and Alpha, and from medium to medium high in the rest of the genotypes. Abnormal sprouting ranged from lack of sprouts to the occurrence of weak ones. Both types were observed in Atlantic, Bintje, Michoacan, NAU-6 and Norteña. Hairy sprouts were commonly observed in the rest of the genotypes. Incidence of browning and abnormal sprouting fluctuated from 77.8% in Lady Rosetta to 100% in Norteña, Zafiro, Sangema and Mosca B. Generally, tubers that showed brownings from moderate strong to strong did not sprout and the ones that had very mild to mild produced weak sprouts. The transmission percentage of PPT was of 37, and it was determined by number of grafted plants with tuber browning symptoms, with respect to total number. Browning and abnormal sprouting of tuber was induced by an infectious pathogen, which was transmitted through 6 serial graftings in the greenhouse. Detection by PCR in foliage and tuber of NAU-6, Norteña, Michoacan and Alpha, was of 16.37%. In chile manzano and mixquic detection was of 70.83% and 66.6% respectively, in tomato no detection was registered. Chile can be an alternative host in pathogen transmission inducing browning and abnormal sprouting of tubers. Detection of phytoplasmas, which are associated with browning and abnormal sprouting of tubers by PCR was erratic and inconsistent in greenhouse; nevertheless, in the field it was consistent. RFLP pattern, the same as nucleotide sequence of the amplified products from foliage and tuber samples of greenhouse potato, suggests the presence of an associated phytoplasma of the aster yellows group.

## INTRODUCCIÓN

Recientemente la papa se ha visto afectada por una enfermedad que induce pardeamiento en tubérculo. Existen evidencias de que un miembro del género fitoplasma está asociado con la enfermedad denominada punta morada de la papa (PMP) (Lee *et al.*, 2006). Los principales síntomas en el follaje son: disminución en el crecimiento, crecimiento erecto de brotes terminales, enrollamiento de las hojas, clorosis, coloración roja o púrpura de nuevas hojas, proliferación de brotes axilares con hinchamientos en la base, y formación de tubérculos aéreos (Fig.4 A y B). Esta enfermedad afecta por un lado el aspecto interno de los tubérculos al producir un pardeamiento en los haces vasculares, deteriorando así su calidad industrial (Fig.6 A y B), por otro lado a los tubérculos afectados se les llama machos; cuando estos son sembrados, producen plantas débiles o no brotan (Fig. 7 A) lo que da lugar a fallas en el cultivo (Cadena-Hinojosa, 1974 y 1993; Cadena-Hinojosa y Galindo, 1986). En algunas variedades infectadas ocurre brotación aparentemente normal. La PMP es considerada un problema fitopatológico de importancia internacional (Maramorosch, 1998b; Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003). En los E.U.A. se tiene reporte de la presencia de PMP desde 1939 (Leach, 1939) considerándose como una enfermedad de importancia; sin embargo, a finales del siglo 20 se observó una baja incidencia (Maramorosh, 1998a, b). Recientemente se ha reportado el marchitamiento de la PMP como una enfermedad devastadora que se presenta en varias regiones de Norte América y México. En 2002 y 2003 se presentó en la región de la cuenca de Columbia en Washington y Oregón una epidemia de PMP en papa (*Solanum tuberosum*), causando fuertes pérdidas económicas en la

industria papera (Lee *et al.*, 2004). En México se presenta en las principales zonas productoras de papa (Cadena-Hinojosa *et. al.*, 1974, 1987, 1993,1999; Zavala Quintana, 2002; Zavala y Cadena, 1998), se ha reportado en los valles y sierras del eje neo volcánico en donde en algunos lugares de ésta zona se presentan altas incidencias y es una seria amenaza a la producción nacional de este cultivo. Durante 1992, en Huamantla, Tlax., se presentaron incidencias superiores al 50% en la variedad Atlantic, lo cual repercutió seriamente en la calidad fritanguera de ésta. En 1993 y 1994 se registró una alta incidencia de la enfermedad en algunas zonas paperas de los estados de Hidalgo, Tlaxcala y México (Cadena-Hinojosa, 1996) causando pérdidas del 30 al 90% en brotación anormal (machos) y disminución en la calidad comercial de la semilla-tubérculo (Cadena-Hinojosa, 1993, 1999; Zavala-Quintana, 2002). En el área donde está ubicado el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) se presentan incidencias altas de la PMP todos los años, situación que se ha utilizado para establecer estudios enfocados a su control en esta localidad (Cadena-Hinojosa, 1999). Inicialmente, varios investigadores consideraron que el agente causal de la "Punta Morada" de la papa en los E.U.A. (Leach, 1939) era el mismo que causaba los amarillamientos en plantas de áster (Kunkel, 1926; Leach, 1939; Youkin, 1943; Leach y Bishop, 1944; Self y Darling, 1953) el cual es transmitido por la chicharrita *Macrosteles quadrilineatus* Forbes (Hirumi y Maramorosh, 1968; Maramorosh *et al.*, 1968). En México, en un estudio conjunto entre INIFAP y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Cadena-Hinojosa, 1974; Maramorosh, 1998a) se observaron fitoplasmas al microscopio electrónico en ultracortes de tejido enfermo de plantas con síntomas de punta morada,

procedentes de transmisión seriada por injerto, por lo cual se propuso que este tipo de patógenos pudiera ser el agente causal de esta enfermedad. Posteriormente se presentó evidencia adicional de la asociación de fitoplasmas con la PMP (Cárdenas *et al.*, 1992; Almeyda *et al.*, 1999; Martínez Soriano *et al.*, 1999). Almeyda *et al.* (1999), encontraron que es posible la detección de fitoplasmas asociados con la punta morada en etapas tempranas de la enfermedad aún en plantas asintomáticas. En investigaciones subsecuentes se ha determinado por lo menos la existencia de dos grupos de fitoplasmas asociados con la PMP (Almeyda *et al.*, 1999, 2001; Martínez Soriano *et al.*, 1999; Leyva López *et al.*, 2002). A la fecha, esta enfermedad es considerada de origen fitoplásmico, a pesar de que los postulados de Koch no han sido debidamente probados. No obstante, los esfuerzos que se han realizado para tratar de esclarecer al agente causal de la PMP, aún quedan muchas interrogantes sobre la etiología de esta enfermedad, por lo que los objetivos de la presente investigación fueron: 1) determinar la etiología del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa en la región central de México y 2) caracterizar la sintomatología inducida por la PMP en las principales variedades y clones avanzados de papa de importancia sembradas en México, bajo condiciones de invernadero.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Colecta de aislamientos de PMP.** En 2004 se tomaron muestras de plantas con síntomas típicos de PMP de un ensayo en campo establecido para seleccionar genotipos de papa tolerantes a esta enfermedad, varios de estos

aislamientos se mantuvieron injertando tejido enfermo en chile manzano con la finalidad de contar con inóculo de PMP durante todo el año. Después, se establecieron dos fechas de siembra durante 2005 y dos en 2006. A finales de marzo del 2005, se sembraron en el campo dos plantas de cada uno de los siguientes genotipos: Atlantic, Gigant y Nau-6. Durante mayo, del mismo año, se sembraron para su evaluación a PMP 19 genotipos de papa: Alpha, Bintje, Gigant, Granola, Lady Rosetta, Lupita, Marciana, Michoacán, Mondial, Montserrat, Mosca B, NAU-6, Norteña, Sancal, Sangema, San José, Zafiro, 4-11 y 676008-Roja. En 2006 la primera fecha de siembra en el campo fue el 11 de abril y se sembraron Alpha, Atlantic, Gigant, Lady Rosetta, Michoacán, Nau-6, Norteña, Zafiro y San José. La segunda fecha de siembra fue en mayo cuando nuevamente se evaluaron los 19 genotipos, de los cuales solo se muestrearon cuatro considerando que los síntomas observados en estas eran representativos del resto.

**Transmisión del agente infeccioso bajo condiciones de invernadero.** Para estudiar la transmisión de PMP por injerto bajo condiciones de invernadero se colectó material de tres localidades del Estado de México: faldas del Nevado de Toluca, Calimaya y Chapingo, Tex. (Cuadro 5a, 5b y 5c).

Durante el verano del 2005 y 2006 se detectaron y marcaron tres plantas de cada uno de los 19 genotipos de papa con síntomas de PMP en el campo (CEVAMEX- INIFAP). Paralelamente, de cada genotipo se tomaron tres esquejes, procedentes de diferentes plantas, y se injertaron en una planta de papa de invernadero de 1 mes de edad libre de los principales virus (PLRV, PVX,

PVY, PVS y PVA). Los genotipos utilizados para los injertos fueron: Michoacán, Norteña, NAU-6 y Sangema.

Las plantas marcadas en el campo fueron continuamente observadas durante todo su ciclo y sus tubérculos fueron colectados 6 semanas después de que se eliminó el follaje. De 10 plantas de cada genotipo se evaluó el grado de pardeamiento interno en dos a tres tubérculos mediante la siguiente escala: SP, sin pardeamiento; ML, muy leve; L, leve; LM, leve moderado; M, moderado; MF, moderado fuerte; F, fuerte. Después de 3 meses se evaluó la brotación del tubérculo. Durante 2005, se realizaron pruebas de PCR en follaje de todos los genotipos procedentes de campo injertados en invernadero.

Con objeto de corroborar que se trataba de un agente patogénico infeccioso, una vez que se observaban síntomas en el follaje de plantas de invernadero injertadas durante ambos ciclos, se procedió a realizar injertos sucesivos (desde dos hasta seis), haciendo las transferencias de una planta a otra. Para esto, se injertaron 83, 72, 9 y 6 plantas de las variedades Norteña, Michoacán, Zafiro, y Lupita susceptibles al pardeamiento y en la cuales se inducen síntomas evidentes tanto en el follaje como en tubérculo; también se consideraron 34 y 10 plantas de los genotipos tolerantes NAU-6 y Lady Rosetta que expresan síntomas leves o nulos en campo. Otros genotipos que se injertaron serialmente fueron: Alpha (72 plantas), Bintje (4), Gigant (6), Granola (8), Marciana (2), Mondial (3), Montserrat (9), Mosca B (12), Sancal (9), Sangema (45), San José (4), clon 4-11(5) y 676008 Roja (5) (Cuadro 1).

Cada planta de campo con síntomas de PMP injertada en invernadero con material de ambos ciclos, representó inicialmente un aislamiento y algunas

fueron analizadas en laboratorio con la técnica de PCR para determinar la presencia o ausencia del fitoplasma. Después de hacer injertos seriados se evaluaron los síntomas de PMP en el follaje, el pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos. Cuando los síntomas eran evidentes en el follaje o en los tubérculos, se procedió a realizar PCR utilizando iniciadores específicos para fitoplasmas. El número de muestras procesadas varió de 1 a 16 en los genotipos : Alpha (7), Gigant (4), L.Rosetta (10), Michoacán (14), Mondial (1), NAU-6 (8), Norteña (10), Sangema (3) y Zafiro (16 ) (Cuadro 1) ; sin embargo, el síntoma de pardeamiento en el tubérculo fue el criterio que se consideró para determinar si hubo o no transmisión del patógeno, y con esta información se estimó el porcentaje de transmisión del total de injertos realizados.

**Injertos a partir de esquejes de clones con síntomas de PMP transmitidos por tubérculo-semilla en invernadero.** En el 2006, tubérculos procedentes de campo de clones con síntomas de PMP, fueron sembrados en el invernadero y se seleccionaron tres plantas (clones) con síntomas de la enfermedad. De las ramas con síntomas consistentes en acortamiento de entrenudos, reducción de foliolos, amarillamientos y coloración purpúrea, se seccionaron esquejes que fueron injertados en genotipos susceptibles al pardeamiento: Zafiro, Norteña, Michoacán y Lupita; en chiles, manzano y criollo mixquic, y en jitomate Rio Grande. Se tuvieron un total de 43 aislamientos considerando cada injerto procedente de una planta con síntomas típicos de PMP, de campo o de invernadero, como un aislamiento independiente.

**Injertos a partir de esquejes de jitomate con síntomas de “popotillo”.**

Durante los primeros meses del 2007, algunos aislamientos procedentes de esquejes de papa con síntomas de PMP transmitidos por semilla-tubérculo que dieron síntomas de “popotillo” en jitomate, fueron injertados en papa para tratar de inducir PMP en follaje y pardeamiento en el tubérculo.

**Monitoreo de fitoplasmas en plantas de papa, chile y jitomate, mediante**

**prueba de PCR.** Muestras de tejido de plantas de papa con síntomas en el follaje, tubérculos con pardeamiento, chile manzano en donde se mantuvo cada aislamiento, y jitomate con síntomas de “popotillo” fueron sometidas a la prueba de PCR con el objeto de detectar la presencia o ausencia de fitoplasmas. Para las extracciones de ADN se utilizó el método propuesto por Lee *et al.* (1993) (Apéndice No.1). Las pruebas de PCR se efectuaron de manera directa utilizando el par de iniciadores P1/Tint, los cuales han sido previamente probados para amplificar un fragmento de aproximadamente 1600 pb a partir de ADN genómico de diferentes fitoplasmas, o P1/P7 en donde P1 (5' -AAG AGT TTG ACT CTG GCT CAG GAT - 3' ) (Deng y Hiruki, 1991) y P7 ( 5' - CGT CCT TCA TCG GCT CTT -3' ) (Smart *et al.*, 1996) para amplificar un segmento de aproximadamente 1800 pb . Son derivados del ARN ribosomal (ARNr) 16S específicos de la región del gene ADNr 16S y parte de la región espaciadora intergénica ubicada entre los genes ribosomales ADNr 16S y 23S. Para evitar falsos negativos el producto de PCR obtenido con los iniciadores P1/Tint o

P1/P7 se sometió a una segunda amplificación (PCR anidada) con los iniciadores universales R16F2n (5'- GAA ACG ACT AAG ACT GG – 3') y R16R2 (5'- TGA CGG GTG TGT ACA CCC G – 3') con los cuales se obtiene un fragmento de 1,200 pb de longitud (Lee *et al.*, 1993; Gundersen y Lee, 1996). Para las PCR secuenciales o anidadas se hicieron diluciones (1:40) del primer producto amplificado con agua desionizada estéril y se utilizó 1.0 µl de la dilución como ADN molde. Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de micro centrifuga de 0.5 mL; el volumen total de la reacción fue de 25 µl conteniendo: 50 ng de ADN, 0.5 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTP, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2.5 unidades de la ADN polimerasa (Amplificasa, Biogenica®). Las amplificaciones del segmento de interés, se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo 2400 con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización de 2 min a 94 °C y 35 ciclos adicionales consistentes en: 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1 min de alineamiento a 55 °C; 1 min y 30 seg de polimerización a 72°C; posteriormente, se programó una fase de extensión final de 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) posteriormente los productos se observaron en un transiluminador mod. Gel-Doc 2000, Bio-Rad®.

**Análisis por RFLP.** El producto amplificado procedente de tubérculo fue digerido con endonucleasas de restricción *Alu I*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *Tsp 5091* y *KpnI* (Gibco BRL, Beverly, MA). Se agregaron 2 µl de buffer, 0.2 µl de cada enzima, 5 µl de producto de PCR y se aforó a un volumen final de 20µl. Para las enzimas *Alu I*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI* se consideró una temperatura de digestión a

37°C y para *Tsp* 5091 a 65°C. Con la idea de asegurar una completa digestión de los productos se utilizó más tiempo del recomendado por el fabricante (24 h). Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ mL) y se observaron en el fotodocumentador (Gel-Doc 2000, BIO-RAD®). Para conocer los pesos moleculares de los patrones de bandeo obtenidos con la digestión se colocó en el gel de agarosa un marcador de peso molecular ØX174 ADN (Promega Symbios®). La longitud de los fragmentos de ADNr se comparó con los patrones electroforéticos propuestos por Davis *et al.* (1997) y Lee *et al.* (1998). El análisis de restricción se hizo para dos muestras del total que se procesaron.

**Secuenciación.** Para corroborar los resultados obtenidos, el ADNr del fitoplasma (aproximadamente 1.2 Kb) producto de la amplificación por PCR con los iniciadores R16 F2n y R16R2, se limpió con el sistema de purificación en columnas (Qiagen Co., Hilden Alemania). Los productos purificados se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Biología y Prototipos FES- Iztacala, de la UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank y con el paquete BLAST (<http://WWW.INCB.BLAST>).

## **RESULTADOS**

**Colección de aislamientos y transmisión por injerto de punta morada de la papa (PMP).** En 2005 y 2006, no hubo transmisión de síntomas con los brotes

(tejido de injerto) obtenidos de Sancal y Sangema, pero con el resto de los aislamientos se obtuvieron altos porcentajes de la misma, lográndose la transmisión entre 2 a 6 generaciones (Fig. 5 A y B). De los cuatro genotipos utilizados como portainjertos, Sangema mostró mayor porcentaje de transmisión (52.63%), seguido de Michoacán (42.10%), Norteña (31.57%) y NAU6 (5.2%) (Cuadro 2).

**Cuadro 1. Porcentaje de transmisión y detección con PCR de punta morada de la papa en genotipos injertados en invernadero durante 2005 y 2006.**

<b>Genotipo injertados</b>	<b>No. de plantas con pardeamiento/ No. total de plantas injertadas</b>	<b>Porcentaje de transmisión</b>	<b>No. de muestras PCR positivas/No. total de muestras</b>	<b>Porcentaje de PCR positivos</b>
Alpha	23/72	31.9	Bf. F. 2/7	28.6
Bintje	4/4	100.0	–	–
Gigant	3/6	50.0	Bf. F. 2/4	50.0
Granola	4/8	50.0	–	–
Lady Rosetta	2/10	20.0	Bf. F. 5/10	50.0
Lupita	3/9	33.3	F.T. 0/12	0.0
Marciana	0/2	0.0	–	–
Michoacán	26/72	36.1	F.T. 5/14	35.7
Mundial	0/3	0.0	Bf. 1/1	100
Montserrat	4/9	44.4	–	–
Mosca B	5/12	41.7	–	–
NAU-6	20/54	37.0	Bf. F. T. 3/8	37.5
Norteña	38/83	45.8	T. 1/10	10.0
Sancal	4/9	44.4	–	–
Sangema	18/45	40.0	T. 0/3	0.0
San José	2/4	50.0	–	–
Zafiro	2/6	33.3	Bf. F. T. 1/16	6.3
4-11	2/5	40.0	–	–
676008 Roja	4/5	80.0	–	–

Bf.= Brote fino; F.= Follaje con síntomas; T.= Tubérculo con pardeamiento; \_ No se realizó PCR.

**Cuadro 2. Porcentaje de transmisión y severidad en follaje de punta morada de campo registrada en cuatro genotipos de papa injertados en**

invernadero con brotes de plantas de esta misma especie colectados en campo, 2005-2006.

Genotipo de procedencia	Injerto en Michoacán	Injerto en Norteña	Injerto en NAU-6	Injerto en Sangema
Alpha	-	-	-	++
Bintje	-	-	-	-+
Gigant	-	-	-	++
Granola	-	-	-	-+
Lady Rosetta	-	-	+	-+
Lupita	-	-	-	+
Marciana	-	-	-	+
Michoacán	+	+	-	+
Mundial	-	-	-	+
Montserrat	+	-	-	++
Mosca B	-+	+	-	-
NAU-6	+	-+	-	-
Norteña	+	-	-	-
Sancal	-	-	-	-
Sangema	-	-	-	-
San José	+	-	-	-
Zafiro	+	+	-	-
4-11	-+	-+	-	-
676008 Roja	-	+	-	-
<b>% Transmisión</b>	<b>42.10</b>	<b>31.57</b>	<b>5.2</b>	<b>52.63</b>

\_ = negativo, -+ = leve; += moderado fuerte; ++ = fuerte

### **Transmisión de síntomas de “popotillo en jitomate”**

Los esquejes procedentes de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP transmitidos por semilla-tubérculo, al injertarse en jitomate indujeron síntomas de “popotillo” (Fig.8 A y B); sin embargo, al volver a injertar éstos en papa, no se observaron síntomas de PMP en el follaje, ni pardeamiento en los tubérculos. Tampoco se detectó la presencia de fitoplasma mediante PCR en foliolos, tallo y raíz de jitomate sintomático.

En la transmisión seriada de las muestras procedentes de follaje 1 de 7 fueron positivas para fitoplasma, de las de tubérculo 8 de 9, indicando que dicho patógeno fue transferido secuencialmente hasta la 3a transferencia y los síntomas inducidos y observados tanto en follaje como en tubérculo estuvieron asociados a este agente infeccioso (Cuadro 3). De 448 plantas injertadas con esquejes sintomáticos procedentes originalmente de campo y después de invernadero, 164 dieron síntoma de pardeamiento y brotación anormal en el tubérculo; 284 no dieron síntomas, resultando por lo tanto, un porcentaje de transmisión de 37. De las pruebas de PCR realizadas en follaje y tubérculo de algunas plantas provenientes del último genotipo injertado en las pruebas de transmisión seriada, la mayor detección se dio en los tubérculos de NAU-6, Norteña, Michoacán y Alpha (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Detección de fitoplasmas mediante PCR en tubérculo con pardeamiento y/o follaje con síntomas de PMP, en el genotipo final de la transmisión seriada.**

Genotipo final	Injerto seriado	No. de transferencias	PCR en follaje	PCR en tubérculo
NAU-6	Lupita/NAU6	1a	- <sup>α</sup>	+ <sup>β</sup>
NAU-6	Granola/NAU6	1a	-	0 <sup>Ω</sup>
NAU-6	NAU6/Alpha/Mich/NAU6	3a	+	0
Sangema	Gigant/Sangema	1a	-	0
Sangema	Bintje/Sangema	1a	-	0
Sangema	L.Rosetta/Sangema	1a	-	0
Norteña	Montserrat/Sangema/Norteña	2a	-	+
Norteña	NAU6/Michoacán/Norteña	2a	0	+
Norteña	Sancal/Alpha/Norteña	2a	0	+
Norteña	NAU6/Michoacán/Norteña	2a	0	+
Norteña	NAU6/Michoacán/Michoacán/Norteña	3a	0	-
Michoacán	Montserrat/Sangema/Michoacán	2a	0	+
Michoacán	Norteña/Michoacán/Alpha/Michoacán	3a	0	+
Alpha	08-R/Sancal/Norteña/Alpha	3a	0	+

<sup>α</sup> - = PCR negativo; <sup>β</sup> + = PCR positivo; <sup>Ω</sup> 0 = no se realizó PCR

En tubérculos de Norteña y Michoacán se tuvieron detecciones positivas con mayor frecuencia mediante PCR. Cabe citar que también se obtuvieron positivos para PCR en muestras de follaje de la variedad L. Rosetta, NAU6, Norteña y Michoacán en la 2a. transferencia y Michoacán y Zafiro en la 5a. después de haber sido injertados en chile manzano, aunque no se observó el pardeamiento típico en los tubérculos para el caso de Norteña y Michoacán (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Detección de fitoplasmas mediante PCR en follaje con síntomas de PMP y sin síntomas de pardeamiento en el tubérculo, en el genotipo final de la transmisión seriada.**

<b>Genotipo final</b>	<b>Injerto seriado</b>	<b>No. de transferencias</b>	<b>PCR en follaje</b>
Michoacán	<sup>1</sup> P6/ <sup>2</sup> Ch.mzo/Michoacán	2 <sup>a</sup>	+
Michoacán	NAU6/Clona/ $\alpha$ /Nort./Ch.mzo./Mich	5 <sup>a</sup>	+
Lady Rosetta	<sup>3</sup> $\alpha$ FN./Ch.mzo./ <sup>a</sup> L.R.	2 <sup>a</sup>	+
Lady Rosetta	P6/Ch.mzo./L.R.	2 <sup>a</sup>	+
Lady Rosetta	P6/Ch.mzo./L.R.	2 <sup>a</sup>	+
Lady Rosetta	$\alpha$ FN./Ch.mzo./L.R.	2 <sup>a</sup>	+
Lady Rosetta	$\alpha$ FN./Ch.mzo./L.R.	2 <sup>a</sup>	+
Norteña	L.R./Sangema./Norteña.	2 <sup>a</sup>	+
NAU-6	$\alpha$ FN./Ch.Mixq./NAU6	2 <sup>a</sup>	+
Zafiro	NAU6/Clona/ $\alpha$ /Nort./Ch.mzo./Zafiro	5 <sup>a</sup>	+

<sup>1</sup>P6=planta 6 de campo; <sup>2</sup>Ch.mzo=chile manzano; <sup>3</sup> $\alpha$ FN=alpha faldas Nevado; <sup>a</sup>L.R.=Lady Rosetta

**Monitoreo de fitoplasmas en plantas de papa, chile y jitomate mediante**

**PCR.** De 116 plantas de papa con síntomas de PMP analizadas mediante PCR en follaje o tubérculo, 19 fueron positivas lo cual equivale a una detección del 16.37%. Para el caso de chile manzano y mixquic la detección fue del 70.83% y 66.6% respectivamente (Cuadro 6). En jitomate no se detectó al fitoplasma (Cuadro 5a ,5b y 5c y Cuadro 6). Se detectaron fitoplasmas en las tres localidades muestreadas del Estado de México: faldas del Nevado de Toluca, Calimaya y Chapingo de donde se tomaron los aislamientos para injertar dentro del invernadero, donde también se detectaron positivos (Cuadro 5a ,5b y 5c).

Para los genotipos NAU-6 y Michoacán, sembrados en campo durante 2004 y 2005 la detección de fitoplasmas fue positiva (Fig.1). Los síntomas observados fueron: disminución en el crecimiento, enrollamiento de las hojas, clorosis, coloración roja o púrpura de nuevas hojas y proliferación de brotes axilares con hinchamientos en la base (Fig.4 A y B). En los tubérculos de NAU-6 el pardeamiento fue leve y en Michoacán moderado.

**Cuadro 5a. Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR, 2004-2007.**

<b>Genotipo muestreado y seriación</b>	<b>Lugar de Procedencia</b>	<b>Parte de la planta extraída</b>	<b>PCR fitoplasma</b>	<b>Fecha</b>
Mondial	Calimaya, Edo. Mex.	Brote fino	+	140604
<i>Catharantus roseus</i>	Chapingo, Tex. Edo. Mex	Testigo positivo(frijol)	+	120704
<i>Tagetes</i>	Lab. Biología. Molecular CP	Testigo positivo	+	120704
Alpha	Chapingo, Tex. Edo. Mex.	Brote fino	+	140604
Gigant	Chapingo, Tex. Edo. Mex.	Brote fino	+	140604
Zafiro	Invernadero	Testigo positivo	+	211104
α campo/chile mzo	Faldas Nevado, Toluca	Follaje	+	120205
Chile manzano	Invernadero	Testigo negativo	–	120205
P-6/ch.mzo.	Invernadero	Follaje	--	190205
P-5/ch.mzo.	Invernadero	Follaje	+	190205
P5/ch.mixquic	Invernadero	Follaje	+	190205
Criollo mixquic	Invernadero	Test negativo	–	190205
Ch.mzo/L.Rosetta	Invernadero	Follaje	+	260205
Ch.mzo/L.Rosetta	Invernadero	Follaje	+	260205
Ch.mzo/L.Rosetta	Invernadero	Follaje	+	260205
Ch.mzo/L.Rosetta	Invernadero	Follaje	+	260205
α campo/chile criollo mixquic	Faldas Nevado, Toluca	Follaje	+	260205
Lady Rosetta	Invernadero	Follaje	+	260205
P-6/Mich.	Invernadero	Follaje	+	200305
Ch. mzo	Invernadero	Testigo negativo	–	200305
Criollo mixquic mixta	Invernadero	Testigo negativo	–	200305

**Cuadro5b. Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR, 2004-2007.**

Genotipo muestreado y seriación	Lugar de Procedencia	Parte de la planta extraída	PCR fitoplasma	Fecha
NAU6/Chile manzano	Invernadero	Follaje	++	110605
Alpha	Invernadero	Testigo negativo	-	110605
Gigant/Mich	Invernadero	Follaje	+	160705
Gigant/Mich	Invernadero	Follaje	+	160705
NAU6/Mzo/α	Invernadero	Follaje	+	160705
Michoacán	Invernadero	Testigo negativo	-	160705
Norteña	Invernadero	Testigo negativo	-	270805
Papa	Invernadero	Follaje	∞+	280805
Norteña	Invernadero	Testigo negativo	-	280805
NAU-6	Chapingo, Mex	Tub.c/s ML	+	220406
Michoacán	Chapingo, Mex	Tub.c/s F	++	220406
Chile mzo.mixta	Invernadero	Testigo negativo	-	220406
Norteña	Invernadero	Testigo negativo	-	220406
No8/Nort/α/Nort	Invernadero	Tub.c/s F	+	290406
No10/Mich/Mich	Invernadero	Tub.c/s F	+	290406
No15/NAU-6	Invernadero	Tub.c/s ML	∞+	290406
Papa/Chile Mzo.3	Invernadero	Follaje	+	181106
Papa/Chile Mzo 11	Invernadero	Follaje	+	181106
Papa/Chile Mzo 10	Invernadero	Follaje	+	181106
Papa/Chile Mzo 9	Invernadero	Follaje	+	181106

SP, sin pardeamiento; ML, muy leve; L, leve; LM, leve moderado; M, moderado; MF, moderado fuerte; F, fuerte. ∞ Producto de PCR enviado a secuenciar.

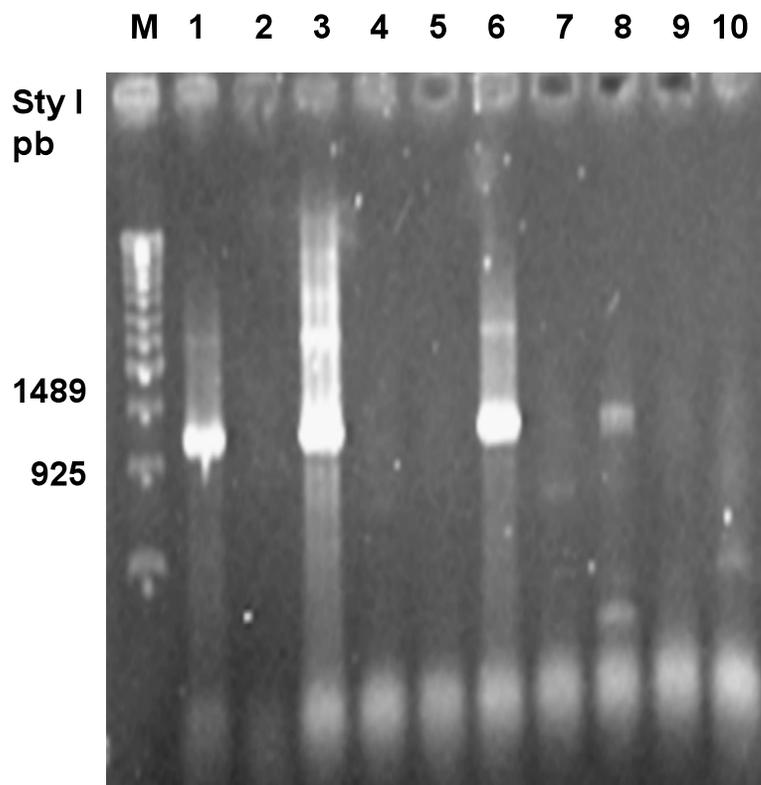
**Cuadro 5c. Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR, 2004-2007.**

<b>Genotipo muestreado y seriación</b>	<b>Lugar de Procedencia</b>	<b>Parte de la planta extraída</b>	<b>PCR fitoplasma</b>	<b>Fecha</b>
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	021206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	021206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	021206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	021206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	171206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	171206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	171206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	171206
Chile mzo.	Invernadero	Testigo negativo	-	171206
M23/Zafiro	Invernadero	Tallo	+	100107
Papa/Chile mzo.42 <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	140107
Papa/Chile mzo. 2 <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	+	171206
Papa/Chile mzo. <sup>a</sup>	Invernadero	Testigo negativo	-	140107

<sup>a</sup> Chile manzano injertado con papa con síntomas de punta morada de la papa.

**Cuadro 6. Detección de fitoplasmas mediante PCR en papa, chile y jitomate, 2004-2007.**

<b>Plantas</b>	<b>Plantas con síntomas/plantas injertadas</b>	<b>Porcentaje de detección de plantas con síntomas</b>	<b>Total de negativos</b>
Papa	19/116	16.38	8/8
Chile mzo	17/24	70.83	5/5
Chile Mixquic	2/3	66.6	2/2
Jitomate	0/19	0.0	1/1
Vinca Testigo +	3/3	–	–
Cocotero Testigo +	1/1	–	–
Total muestras	166		



**Figura 1.** PCR-anidada con los iniciadores R16F2n/R2. Carril **M**, marcador de peso molecular  $\lambda$  Sty I. Carril **1**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectado con el fitoplasma del amarillamiento del áster. Carril **2**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Zafiro. Carril **3**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo NAU-6. Carril **4**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Lady Rosetta. Carril **5**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Norteña. Carril **6**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectado con el fitoplasma del amarillamiento del áster. Carril **7**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Zafiro. Carril **8**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo NAU6. Carril **9**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Lady Rosetta. Carril **10**, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Norteña. Fragmentos amplificados de aproximadamente 1.2 Kb.

**Pardeamiento y brotación anormal en genotipos de papa.** Se pueden distinguir patrones de comportamiento de la severidad del pardeamiento de

tubérculos; a) los genotipos Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant y Alpha tuvieron lecturas que fluctuaron de nulo a leve (N-L) hasta muy leve a leve moderado (ML-LM); b) Bintje, Atlantic, 08 Roja, 4-11, Zafiro, San José, Sangema, Sancal, Malinche, Marciana, Lupita y Granola presentaron lecturas desde moderado hasta moderado fuerte (M-MF) (Fig.6 C); y c) Mondial, Michoacán, Montserrat y Norteña variaron de moderado a moderado fuerte (M-MF) a moderado fuerte a fuerte (MF-F) (Cuadro 7 y 8); (Fig. 6 A y B).

La incidencia del pardeamiento y la brotación anormal fluctuó desde 77.8% en Lady Rosetta hasta 100% en Norteña, Zafiro, Sangema y Mosca B (Cuadro 8). Todos los tubérculos de las plantas muestreadas en campo, mostraron diferentes grados de pardeamiento y tipos de brotación en almacén (Fig. 7 A, B y C). Así mismo, los genotipos presentaron los mismos síntomas en los 3 años de muestreo (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Severidad del pardeamiento y tipo de brotación en los tubérculos en genotipos procedentes de plantas con síntomas de punta morada en invernadero CEVAMEX 2004-2006.**

Genotipo	<sup>1</sup> Intensidad de pardeamiento	Tipo de brotación
Alpha	ML-LM	Brote fino
Atlantic	M	Sin brotes y/o brote fino
Bintje	M	Sin brotes y/o brote fino
Gigant	ML-L	Brote fino
Granola	MF	Sin brotes
Lady Rosetta	ML-L	Brote fino
Lupita	MF	Sin brotes
Marciana	MF	Sin brotes
Malinche	MF	Sin brotes
Michoacán	M-MF	Sin brotes y/o brote fino
Mondial	M-MF	Sin brotes
Montserrat	MF-F	Sin brotes
NAU-6	ML-L	Sin brotes y/o brote fino
Norteña	MF-F	Sin brotes y/o brote fino
Sancal	MF	Sin brotes
Sangema	MF	Sin brotes
San José	MF	Sin brotes
Zafiro	MF	Sin brotes
4-11	MF	Sin brotes
676008 Roja	MF	Sin brotes

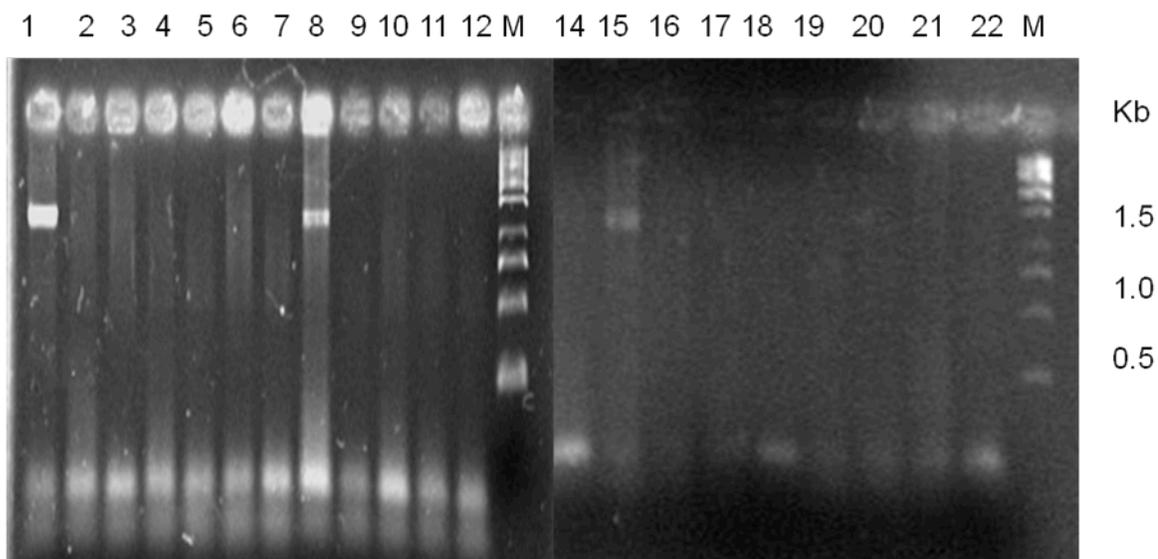
<sup>1</sup>SP, sin pardeamiento; <sup>1</sup>ML, muy leve; L, leve; LM, leve moderado; M, moderado; MF, moderado fuerte; F, fuerte.

Michoacán	M-MF	34/40	85	Sin brotar y brote fino	82.85
NAU-6	ML-L	26/32	81.25	Brote fino	81.25
Norteña	MF-F	64/64	100	Sin brotar y brote fino	100
Zafiro	MF	9/9	100	Sin brotar	100
Alpha	ML-LM	23/25	92	Brote fino	92
Lady Rosetta	ML-L	7/9	77.8	Brote fino	77.8
Gigant	ML-L	20/25	80	Brote fino	80
Sangema	MF	25/25	100	Sin brotar	100
Mosca B	ML-L	16/16	100	Sin brotar y brote fino	100

**Cuadro 8. Efecto de la punta morada en severidad de pardeamiento, porcentaje de tubérculos con pardeamiento y brotación anormal en genotipos de papa bajo condiciones de invernadero.**

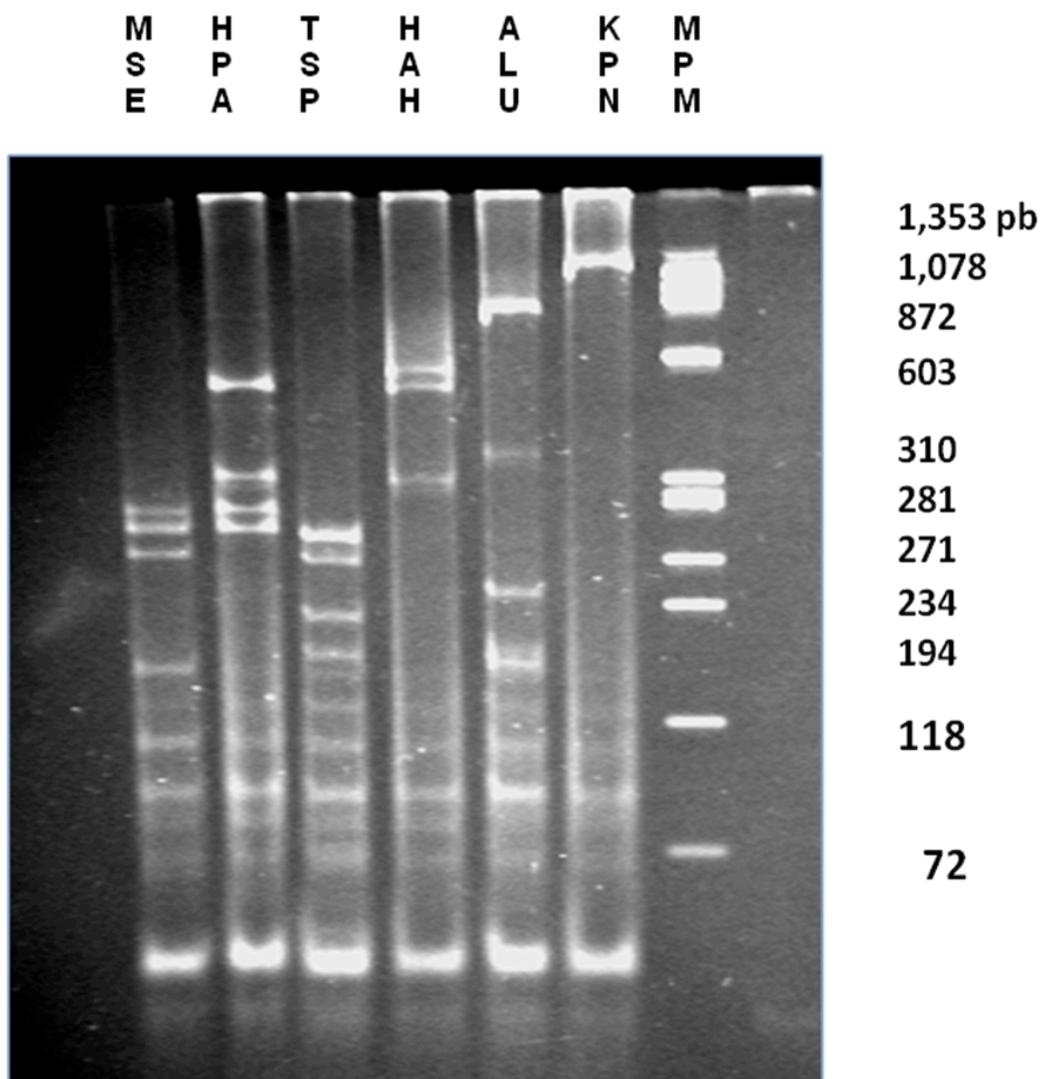
<sup>1</sup>SP, sin pardeamiento; ML, muy leve; L, leve; LM, leve moderado; M, moderado; MF, moderado fuerte; F, fuerte.

Los tubérculos de los 19 genotipos evaluados en campo dieron positivo para fitoplasma mediante PCR. Por otra parte, no todos los tubérculos con pardeamiento obtenidos en el invernadero por injerto seriado, fueron positivos para fitoplasma con prueba de PCR-anidada (Fig. 2). En otro gel la banda observada para NAU-6, cuyo grado de pardeamiento va de ML a L, fue más gruesa y clara, comparada con las obtenidas a partir de los tubérculos de Norteña y Michoacán con pardeamiento F.



**Figura 2.** PCR-anidada con el par de iniciadores R16F2n/R2, de muestras de follaje y tubérculos de papa con síntomas de PMP en invernadero y campo. Carril **M**, marcador de peso molecular 1Kb ADN. Carril **1**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con un aislamiento de fitoplasma que induce amarillamiento del áster. Carril **2-7**, muestras de follaje de papa de invernadero (41,42 y 43) con síntomas de PMP. Carril **8**, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con un aislamiento de fitoplasma que induce amarillamiento del áster. Carril **9-10**, muestras de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP (44). **Carril 11-12**, muestras de tubérculos de invernadero con síntomas de pardeamiento (31 y 1). Carril **14**, muestra de tubérculo de invernadero con síntomas de pardeamiento. Carril **15**, muestra de tubérculo de invernadero con síntomas de pardeamiento (32). Carril **16-19**, muestras de tubérculo de invernadero con pardeamiento. Carril **20-21**, muestras de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo San José; **Carril 22**, testigo negativo de follaje de papa de invernadero sin síntomas.

**Análisis por RFLP de productos amplificados por PCR.** El patrón de restricción obtenido mediante las enzimas *Alu I*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *Tsp 5091* y *KpnI* (Gibco BRL, Beverly, MA) en tubérculo con pardeamiento del genotipo NAU-6 (muestra 41) corresponde al grupo áster yellows (Lee *et al.*, 1998) (Fig.3).



**Figura 3.** Análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia 16S ADNr amplificado por PCR, con los iniciadores R16F2n/R2, procedente de tubérculo de papa clon NAU-6 con síntomas leves de pardeamiento. El ADN producto fue digerido con las enzimas de restricción *MseI*, *HpaI*, *Tsp5091*, *HhaI*, *AluI*, *KpnI*, separado por electroforesis en gel de poliacrilamida 8%. Carril MPM; marcador del fago  $\Phi$ X174 *Haell*.pb = pares de bases.

**Secuenciación.** Al comparar la secuencia parcial de nucleótidos, obtenida de tubérculo con pardeamiento leve del genotipo NAU-6 (M41), con las secuencias depositadas en el GenBank, se encontró homología del 98% con el fitoplasma

*Cirsium white leaf phytoplasma*, *Spiraea stunt phytoplasma* y *Walnut witches' broom phytoplasma*, pertenecientes al grupo 16SIII, números de acceso AF3731060, AF190228 y AF190227, respectivamente. Se obtuvo otra secuencia de nucleótidos proveniente de una muestra de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP, la cual indicó una homología del 97% con el fitoplasma del grupo 16S I amarillamiento del áster del número de accesos DQ164213, AY37754, AY081817, AY737547, y AY733745.









## **DISCUSIÓN**

A través de las pruebas de transmisión seriada por injerto en este trabajo, se observó que esta, por lo general fue baja. Se han dado varias explicaciones a la

deficiente transmisión por injerto: 1) a la misma naturaleza infectiva del fitoplasma que ocasiona necrosis en el floema (McCoy *et al.*, 1989; Siddique *et al.*, 2001) lo cual puede bloquear el intercambio de la savia infectada del injerto al portainjerto lo que impide la diseminación del patógeno y el consecuente desarrollo de síntomas; 2) a que la distribución y concentración de los fitoplasmas en los distintos tejidos de la planta no es uniforme (Siddique *et al.*, 2001), de tal manera, que el tejido usado como injerto puede o no tener al patógeno o tenerlo en muy baja concentración, ésto también explicaría la variación en el período de incubación y manifestación de los síntomas en las plantas; 3) a la variabilidad genética de cada una de las plantas que sirvieron de hospedante; 4) a las condiciones ambientales que prevalecieron en las distintas fechas en que se realizaron las pruebas de transmisión (Ploaie, 1981); 5) injertos realizados entre plantas de la misma especie no desarrollan tejidos de unión debido a la producción de sustancias inhibitoras (Dabek, 1983). Sin embargo, en la presente investigación el injerto y portainjerto de papa llegaron a permanecer vivos en promedio un mes, incluso el injerto siguió desarrollándose y generando nuevos tejidos y brotes sintomáticos. Lo mismo se observó en injertos de papa a Chile y viceversa.

A pesar de que las plantas analizadas provinieron de tubérculos de plantas cultivadas en campo y en cuyo follaje y tubérculos se había detectado la presencia de fitoplasmas mediante PCR, de acuerdo con los análisis realizados por el Dr. Humberto Almeyda León (comunicación personal), la detección por medio de PCR del agente patogénico, involucrado con el pardeamiento y la brotación anormal de la papa, en follaje, tallo y tubérculo fue errática e

inconsistente en las plantas crecidas en invernadero. Estos resultados contradictorios pudieran deberse a las condiciones de campo que permitieron un mejor desarrollo del follaje de las plantas de papa y de los tubérculos producidos y por ende de condiciones fisiológicas de la planta más favorables para el establecimiento y multiplicación del fitoplasma. Una explicación posible para la detección errática de este patógeno, pudiera ser que esté distribuido irregular o heterogéneamente en la planta lo cual dificulta su detección mediante esta prueba o bien a que las concentraciones son tan bajas que no se detectan. De hecho cabe citar, que los positivos para fitoplasma con PCR en este trabajo siempre se obtuvieron mediante PCR anidada (Fig.1); indicando esto bajas concentraciones del mismo. Se han reportado resultados similares en cuanto a fallas en la detección por concentración de fitoplasmas pertenecientes al grupo amarillamiento del áster en plantas ornamentales del género *Tagetes* (Kaminska y Dziekanowska, 2001; Rojas *et al.*, 2003). Por otra parte, además de la concentración e infectividad del fitoplasma, las condiciones ambientales prevalentes en diferentes épocas del año y susceptibilidad del hospedante (estado fisiológico y fenológico de la planta, época del año en que se colecta la muestra) son factores que intervienen en la expresión y severidad de los síntomas (Guthrie *et al.*, 1998), dificultando en este caso la detección del mismo. Además en virtud de que plantas con síntomas en el follaje o en el tubérculo fueron negativas a PCR para fitoplasma, no se descarta la posibilidad de que otros patógenos pudiesen estar involucrados.

Los tubérculos que presentaron pardeamiento de mediano fuerte a fuerte generalmente no brotaron y los que tuvieron de muy leve a leve produjeron

brotos finos. Esto se debe posiblemente al daño que causa el patógeno en los tejidos del floema del tubérculo como en el caso de Sangema, Norteña, Michoacán, Zafiro, Montserrat, Marciana, Malinche, San José, Sancal, 676008 Roja y 4-11, lo cual perjudica la calidad de los tubérculos de papa para semilla al no brotar u ocasionalmente producir brotes finos y tubérculos inaceptables al mercado por su pardeamiento. Existe cierta evidencia para pensar que en genotipos con pardeamiento severo como Sangema, la detección del agente causal (fitoplasma) mediante PCR se complica posiblemente por la oxidación extrema del tejido que no permite la supervivencia del patógeno o la detección del mismo, por la presencia de metabolitos inhibidores de la reacción de PCR; sin embargo, esta última posibilidad podría descartarse dado que en las reacciones se consideró la detección del gen endógeno de cloroplasto que siempre resultó positivo obteniéndose una banda de 315 pb. En cambio en NAU-6 que presenta pardeamiento leve tanto en campo como en invernadero, la detección tanto en follaje como en tubérculo fue más frecuente. En cuanto a severidad del síntoma en el tubérculo, los resultados obtenidos de este trabajo coinciden con lo reportado en campo para las mismas variedades (Cadena *et al.*, 2003). Por otro lado, hubo genotipos que presentaron pardeamiento de muy leve a leve y ocasionalmente no lo presentan pero alcanzan a producir brotes finos como fueron los cultivares Alpha, Gigant, Lady Rosetta y NAU-6. Estos últimos pueden ser utilizados para obtener variedades tolerantes en los programas de mejoramiento genético. Con relación a la severidad del pardeamiento en plantas con síntomas de PMP asociado a fitoplasmas se observa, para los

mismos genotipos cierta similitud a la inducida por el psílido de la papa (Díaz-Valasis, 2008).

Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que el pardeamiento en los tubérculos fue inducido por un patógeno infeccioso transmitido mediante injertos sucesivos (hasta 6 injertos seriados) bajo condiciones de invernadero, en diferentes genotipos; aunque, la frecuencia de detección del fitoplasma mediante PCR tanto en tubérculo como en follaje fue baja; sin embargo, la detección en tubérculo y brote fino fue ligeramente mayor comparada con follaje. En el caso de los positivos en follaje de la variedad Lady Rosetta, y Michoacán en la 2ª transferencia y Michoacán y Zafiro en la 6ª después de haber sido injertados en chile manzano, no se observó el pardeamiento típico en los tubérculos, esto pudiera explicarse a la presencia de una variante asintomática de fitoplasma. Lo anterior coincide con lo reportado en infecciones mixtas por fitoplasmas en una misma planta o a variantes presentes en follaje y tubérculo (Leyva-López *et al.*, 2002) que pudieran estar expresando diferente sintomatología en la misma. El patrón de RFLP (Fig.3) procedente de un tubérculo de papa de invernadero (muestra 41) del clon NAU-6 con síntomas leves de pardeamiento, sugiere que este patógeno presumiblemente pudiera ser un fitoplasma asociado al grupo amarillamiento del áster. Así mismo, las secuencias de nucleótidos obtenidas de los fragmentos amplificados de una muestra de tubérculo con pardeamiento leve, genotipo NAU-6 (M41), y una de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP, sugieren la presencia de un fitoplasma. La evidencia experimental en este trabajo, indica que la sintomatología típica de PMP en el follaje y el pardeamiento en el tubérculo es

inducida por un agente infeccioso, posiblemente un fitoplasma, ya que logró ser transmitido hasta por seis generaciones mediante injertos seriales a través de diferentes genotipos de papa y chile.

### **CONCLUSIONES**

-El porcentaje de transmisión por injerto del pardeamiento y la brotación anormal en papa, bajo condiciones de invernadero, fue de 37%.

-El pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos fue inducido por un patógeno infeccioso, que logró ser transmitido mediante injertos sucesivos bajo condiciones de invernadero hasta seis veces en diferentes genotipos de papa.

-La detección de fitoplasmas asociados con el pardeamiento y la brotación anormal de la papa, en follaje, tallo y tubérculo mediante PCR, fue errática e inconsistente en plantas mantenidas en invernadero.

-Los tubérculos que presentaron pardeamiento de mediano fuerte a fuerte no brotaron y los que tuvieron de muy leve a leve generalmente produjeron brotes finos.

-Los genotipos Alpha, Gigant, Lady Rosetta y NAU-6, presentaron un pardeamiento de muy leve a leve. El resto de los genotipos presentaron un pardeamiento de mediano a fuerte.

- Plantas de chile manzano pueden ser hospedantes intermediarias o alternas en la transmisión del patógeno involucrado en el pardeamiento y la brotación anormal del tubérculo.

## LITERATURA CITADA

- Almeyda-León, I.H., Rubio, O., Cadena-Hinojosa, M.A., Díaz, M., Zavala, T.E., Rocha, M.A., y 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, Produce. Informe de Avances. 19p.
- Almeyda-León, I. H., Rocha-Peña, M. A., Piña\_Razo, J., and Martínez-Soriano, J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:1-9.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1974. Estudios sobre la "Punta Morada de la Papa". Tesis de Maestría. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. 70 p.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1987. Efecto de genotipos de plantas, aplicaciones de antibióticos e insecticidas en el control de la "Punta Morada de la Papa". *Agricultura Técnica en México* 13:3-13.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1993. La Punta Morada de la Papa en México: Incidencia y búsqueda de resistencia. *Agrociencia* 4:247-256.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1996. La punta morada de la papa en México: II Efecto de cubiertas flotantes, cultivares y productos químicos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14:20-24.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1999. Potato Purple Top in Mexico: Effects of plant spacing and insecticide application. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:91-95.

- Cadena-Hinojosa, 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 planta y aplicación de insecticidas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3:100-104.
- Cadena-Hinojosa, M. A., Guzmán-Plazola, R., Díaz-Valasis, M., Zavala Quintana, T.E., Magaña-Torres, O.S., Almeyda-León, I.H., López-Delgado, H., Rivera-Peña, A., y Rubio-Covarrubias, O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:248-259.
- Cárdenas, S.E., Valdovinos, P.G., Cadena, H.M., y Estañol, B.E. 1992. Detección de organismos tipo micoplasmas en plantas de papa con los síntomas de "punta morada". *Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Cuernavaca, Morelos, México. pp.62.
- Dabek, A.J. 1983. Leafhopper transmission of *Rhynchosia* little leaf, a disease associated with mycoplasma-like organisms in Jamaica. *Annals Applied of Biology* 103:431-438.
- Davis, R.I., Schneider, B., and Gibb, K.S. 1997. Detection and differentiation of phytoplasmas in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 48:535-544.
- Deng, S. and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiology Methods* 14:53-61.
- Gundersen, D.E., and Lee, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Hirumi, H., and Maramorosh, K. 1968. Mycoplasma like bodies in the salivary glands of insect vectors carrying the Aster Yellow Agent. *Journal of Virology* 3:82-84.

- Guthrie, J.N., White, D.T., Walsh, K.B., and Scott, P.T. 1998. Epidemiology of phytoplasma-associated to papaya diseases in Queensland, Australia. *Plant Disease* 82:1107-1111.
- Kaminska, M., and Dziekanowska, D. 2001. Detection of aster yellows phytoplasma in *Tagetes patula* plants with two types of symptoms. *Phytopathology Polonica* 21:81-92.
- Kunkel, L.O. 1926. Studies on Aster Yellows. *American Journal of Botany* 13:646-705.
- Leach, J.G. 1939. Further experiments on the cause of "purple top wilt" of potatoes. *Phytopathology* 29:14. (Abstract).
- Leach, J.G., and Bishop, C.F. 1944. Further studies on the nature and cause of purple top wilt of potatoes. *Phytopathology* 34:1006-1007 (Abstract).
- Lee, I.-M., Hammond, R., Davis, R.E., and Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., and Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.
- Lee, I.-M., Bottner, K.D., Munyaneza, J.E., Secor, G.A., Gudmestad, N.C. 2004. Clover proliferation group (16srvi), subgroup a (16srvi-a) phytoplasma is probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease*. 88:429.
- Leyva-López, N.E. y Martínez-Soriano, J.P. 2002. Diagnóstico diferencial de fitoplasmas en papa y su aplicación en la búsqueda de vectores. *Memorias del Taller Internacional de Trabajo sobre la Punta Morada de la Papa y ParatRIOza cockerelli*. INIFAP Y CONPAPA. Enero 17, 2002. Toluca, Edo. de México. pp. 34-51.
- McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chikowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., Leeuw de G, T.N., Golino, D.A., Hackett,

- K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzol, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., and Seemuller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Pp. 545-640. In: The Mycoplasmas. Whitcomb, R.F. and Tully, J.G. (eds.). Vol 5. Academic Press. USA. 780p.
- Maramorosch, K. 1998a. Potato Purple Top Wilt. Memorias del 2º Simposio Internacional de la Papa. Agosto 13-15, 1998. Toluca, Edo. de México. pp. 21-31.
- Maramorosch, K. 1998b. Current status of potato purple top wilt. International Journal of Tropical Plant Diseases 16:61-72.
- Maramorosch, K., Shikata, E., and Granados, R. 1968. Structures resembling Mycoplasma in diseased plants vectors. Transactions of the New York Academy of Sciences 30:841-855.
- Martínez, Soriano, J.P., Leyva-López, N.E., Zavala-Soto, M.E., Beres, M., y Leal-Klevezas, D.S. 1999. Detección molecular del agente causal de la “bola de hilo” de la papa en semillas infectadas y asintomáticas. Biotecnología Aplicada 16:93.
- Ploaie, P. G. 1981. Mycoplasma like organisms and plant diseases in Europe. pp.61-104. In: Maramorosh, K. and Harris, K.F. (eds.). Plant Diseases and Vectors: Ecology and epidemiology. Academic Press, NY. 368 p.
- Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E., Lee, I.M., Martín, M., and Aspiros, H.S. 2003. Detection and characterization of the phytoplasma associated with marigold phyllody in Mexico. Journal of Plant Pathology 85:81-86.
- Self, R.L., and Darling, H.M. 1953. Purple top disease of the potato in Wisconsin. Research Bulletin 184. University of Wisconsin. Madison, USA. 24p.
- Siddique, A.B.M., Agrawa, G.K., Alam, L.N. and Krishna-Reddy, M. 2001. Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with little leaf disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and

- periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Bangladesh. *Journal of Phytopathology* 149:237-244.
- Smart, C.D., Schneider, B., Bomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Youkin, S.G. 1943. Purple top wilt caused by the Aster Yellows virus. *American Potato Journal* 20:117-183.
- Zavala Quintana, T.E. y Cadena-Hinojosa, M.A. 1998. Punta Morada de la Papa. Resúmenes, Tecnología de Cultivo de Papa, CONPAPA, INIFAP, Toluca Edo. de México. pp. 17-19.
- Zavala Quintana, T.E. 2002. Experiencias en el Valle de Toluca sobre Punta Morada. Memorias del XI congreso Nacional de Productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002. León, Guanajuato, México. pp. 81-97.

#### **APENDICE No.1**

Para las extracciones de ADN se utilizó, el método propuesto por Lee *et al.*, 1993. Se maceraron 1.2 gr de tejido fresco con 8 mL de amortiguador MLO (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 2.17gr/100ml; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.41 gr/100 ml, sucrosa, 10 gr/100ml; BSA, 0.15gr/100ml; PVP-10, 2gr/100ml; adicionado con ácido ascórbico 0.53 gr/100ml de amortiguador antes de usarse. Se centrifugó a 13 000 rpm por 20 min. Se rescató el precipitado adicionando después 8 mL de amortiguador de

extracción (100 mM TrisHCL, 100mM EDTA, 250mM NaCl). Se adicionaron 880  $\mu$ l de lauril sulfato al 10%, se mezcló e incubó durante 1 hora a 55°C. Se centrifugó 10 min a 6 000 rpm transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo. Se adicionaron 0.6 vol de isopropanol y se mezcló. Se mantuvo a -20°C durante 30 min. Se centrifugó 15 min a 12 000 rpm y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 3 mL de TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA). Se incubó a 37°C y se adicionaron 525  $\mu$ l de NaCl 5 M, se mezcló. Se adicionaron 420  $\mu$ l de CETAB (cetildimetilamoniobromide) /NaCl (CETAB 10%, NaCl 0.7M). Se mezcló e incubó 20 min a 65°C. Se adicionó 1 vol de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se mezcló y centrifugó a 6 000 rpm por 10min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionaron 0.6 vol de isopropanol, se mezcló e incubó a -20°C por 30 min. Se centrifugó 20 min a 12 000 rpm. Se decantó el sobrenadante y lavó la pastilla con etanol al 70% para remover residuos de CETAB. Se centrifugó a 6 000 rpm por 10 min, se rescató el precipitado y puso a secar a 37°C. La pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua desionizada estéril libre de ADNAsas y RNAAsas (Gibco). La concentración y calidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Lambda Bio 10, Perkin Elmer) a 260 nm y mediante el cociente de absorbancia a 260/280 nm, respectivamente.

### Capítulo 3

## COMPORTAMIENTO DE GENOTIPOS DE PAPA AL PSÍLIDO DE LA PAPA Y DEL TOMATE (*Bactericera cockerelli*, Sulc. Homoptera Psyllidae) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

### RESUMEN

El comportamiento de 20 genotipos de papa al psílido *Bactericera cockerelli* (= *Paratrioza cockerelli*) fue estudiado bajo condiciones de invernadero. Dos meses después de la siembra, se liberaron dentro de cada jaula, excepto en los testigos, 200 insectos adultos procedentes de una colonia libre de fitoplasmas, verificados con PCR. Al finalizar el ciclo fenológico de la papa, se registró el número de ninfas; rendimiento (g/planta), número de tubérculos por planta, pardeamiento interno y la brotación anormal de los tubérculos. El amarillamiento por psílicos y la transmisión por tubérculo e injerto, también fueron estudiados en variedades susceptibles. Todos los genotipos mostraron síntomas de amarillamiento en el follaje, después de 15-20 días de la exposición al insecto. El número de ninfas/ planta fluctuó de 90 hasta 450, en 2004, y de 490 a 1800, en 2005. Se observó una disminución significativa en rendimiento en comparación con los testigos (49.39 y 70.04% durante 2004 y 2005, respectivamente) en todos los clones/variedades. La disminución en el número de tubérculos también fue significativa en 2005 con 70.03%. Solamente Alpha, Gigant, Nau-6 y Lady Rosetta mostraron pardeamiento interno que varió de nulo a leve y fueron clasificados como tolerantes. En los otros genotipos éste varió de moderado a fuerte. En los otros genotipos éste varió de moderado a fuerte. No se observó

transmisión secundaria por tubérculo, ni transmisión seriada por injerto del amarillamiento por psílicos; tampoco síntomas foliares, ni pardeamiento interno y la brotación fue normal. En ambos años el rendimiento y el número de tubérculos, se redujeron significativamente en todos los genotipos. El pardeamiento interno, brotación prematura o ausencia de la misma y brotes finos, fueron inducidos por el psílido bajo condiciones de invernadero y en ausencia de fitoplasmas asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa.

## **ABSTRACT**

The behaviour of 20 potato genotypes to the psyllid *Bactericera cockerelli*, (= *Paratrioza cockerelli*) was studied under greenhouse conditions. Two months after planting, 200 insects in adult stage, coming from a free phytoplasma psyllid colony checked by PCR technique, were released inside each cage, except in the controls. At the end of the potato phenological cycle, numbers of nymphs were counted; yield (g/plant), number of tubers per plant, internal browning and abnormal tuber sprouting were also registered. "Psyllid yellows", tuber and graft transmission were also studied in susceptible varieties. All genotypes showed typical yellowing symptoms on foliage after 15-20 days of exposure to the insect. Number of nymphs/plant fluctuated from 90 to 450 in 2004 and from 490 to 1800 in 2005. A significant decrease (49.39 and 70.04% during 2004 and 2005, respectively) in yield was observed in all clones and varieties as compare to the control. Reduction on the number of tubers was also significant only in 2005 by 70.03%. Only Alpha, Gigant, NAU-6 and Lady Rosetta cultivars showed null to mild internal browning caused by the psyllid and were classified as tolerant. In the other genotypes decoloration varied from moderate to

strong. Secondary tuber transmission and serial transmission of psyllid yellows by grafting were not observed, neither foliar symptoms nor internal browning were detected, and sprouting was normal. In both years yield and number of tubers were significantly reduced in all genotypes by *B. cockerelli*. Internal browning, premature sprouting or lack of sprouting, and hairy sprout were induced by the psyllid under greenhouse conditions in the absence of phytoplasmas associated with purple top disease.

## INTRODUCCIÓN

El pardeamiento interno del tubérculo se ha asociado estrechamente con *Bactericera cockerelli*, Sulc., un psílido que ha sido encontrado en las principales zonas productoras de papa en México y que se piensa induce un desorden metabólico en la planta el cual conduce a una brotación temprana de los tubérculos en plantas colonizadas por este insecto. En la parte oeste de Estados Unidos este psílido es considerado como uno de los insectos más importantes presentes en el cultivo de la papa (Cranshaw, 1993, 1994, 2002). Ha sido reportado en los estados de Minnesota, Dakota Norte y Sur, Nebraska, Kansas, Oklahoma y Texas, exceptuando los estados de Oregon y Washington (Pletsch, 1947). Cranshaw (1993,1994) menciona que desde 1920 hay reportes donde se considera al psílido como una plaga, y en la actualidad se encuentra ampliamente distribuido en los Estados Unidos de América. El daño causado por *B. cockerelli* ha sido recientemente reportado en casi todas las principales zonas paperas de México con excepción de Sonora y Sinaloa. Se ha calculado que el 70% del área sembrada con papa puede llegar a ser afectada por el insecto (Rubio *et al.*, 2002). El psílido de la papa y del tomate ha sido

reportado en el Distrito Federal y en Río Frío, Estado de México (Cranshaw, 1994), así como en los estados de Guanajuato, Chihuahua, Michoacán, Puebla, Veracruz, Durango, Coahuila, Tamaulipas, Baja California Norte, Aguascalientes y Nuevo León (Fuentes del Valle O. *et al.*, 1960; Sifuentes, J.A. 1977; López Flores, 2002; Zavala Quintana, 2002). Se ha reportado que causa un daño severo en el cultivo del tomate en el estado de California, Estados Unidos y en Baja California, México (Cranshaw, 1994). *B. cockerelli* puede atacar varios cultivos (Pletsch, 1947; Wallis, 1955) siendo la papa su hospedante favorito para la oviposición en comparación con otras solanáceas (Pletsch, 1947). El síntoma conocido como “amarillamiento por psílicos” en papa consiste en el retraso en el crecimiento; erección de ramas; clorosis benigna del nuevo follaje con acopamiento de las hojas basales y la progresión de coloración rojiza en las nuevas hojas. Conforme avanza la infestación por el insecto se observa enrollamiento de las hojas en toda la planta, acortamiento y engrosamiento de entrenudos terminales dando como resultado arrosetamientos, engrosamiento de nudos, tubérculos aéreos o ramas axilares; la clorosis aumenta en intensidad y se detiene el crecimiento; se presenta senescencia prematura y muerte de las plantas (Daniels, 1954; Carter, 1950; Carter, 1962). Esta sintomatología en papa y en tomate ha sido asociada con la presencia de una toxina introducida por el psílido, al momento de alimentarse (Carter, 1950; Arslan *et al.*, 1985). Estos síntomas no han podido ser inducidos al colocar menos de 30 psílicos en las plantas, ya que éstas se recuperan y se desarrollan normalmente si los insectos son removidos (Blood *et al.*, 1933). En las plantas hospederas los síntomas de amarillamiento son inducidos por la alimentación de las ninfas (Richards, 1928, 1931). Sin embargo, no todas las ninfas son capaces de inducir una reacción tóxica (Carter, 1950). En

condiciones de campo Cranshaw (1994; 2002) observó brotación anormal del tubérculo (brotación prematura y brotes débiles). Los tubérculos de plantas afectadas por el insecto pueden mostrar pardeamiento interno y en ocasiones necrosis así como brotes ahilados y algunas veces tubérculos sin brotar (Díaz-Valasis y Cadena-Hinojosa, no publicado). Por otro lado, el síntoma denominado “zebra chip”, reportado por primera vez en 2004, se caracteriza por inducir en el interior de los tubérculos un patrón de rayas necróticas al hacer un corte en este órgano; esta necrosis se vuelve más evidente cuando las hojuelas de papa se fríen. Esto fue primeramente observado en la parte sur de Estados Unidos, México y Guatemala (Secor y Rivera-Varas 2004). Los síntomas foliares y del tubérculo inducidos por el insecto son similares a aquellos causados por la enfermedad de la punta morada de la papa (PMP); sin embargo, los síntomas inducidos por el psílido son parcialmente reversibles (Cranshaw, 1994; 2002), mientras que aquellos inducidos por PMP no lo son (Cadena-Hinojosa, 1974). Tanto la diseminación de PMP como la de los desórdenes fisiológicos causados por *B. cockerelli*, se han incrementado en la región central de México; aunque aún existen lugares con baja incidencia. En trabajos donde se evaluó el pardeamiento interno de los tubérculos asociado con PMP y *B. cockerelli* fluctuó de leve a leve-moderado en las variedades NAU-6, Alpha y Gigant, y de moderado a moderado-fuerte en otras variedades. La brotación anormal fluctuó desde la ausencia de brotes hasta la presencia de brotes débiles. Los brotes ahilados fueron comúnmente observados en los cultivares NAU-6, Alpha y Gigant. En la variedad Norteña generalmente no se observó brotación (Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003). No obstante, actualmente el efecto independiente del

psílido en los genotipos de papa todavía se desconoce. Con base a lo antes mencionado los objetivos de esta investigación fueron:

1) Determinar el efecto de *B. cockerelli* en el pardeamiento, la brotación, el rendimiento, el número de tubérculos y los síntomas foliares de “amarillamiento por psílicos” en las plantas de papa en ausencia de fitoplasmas; 2) identificar genotipos tolerantes al pardeamiento y cuantificar el número de ninfas; e 3) investigar si el síntoma de “amarillamiento por psílicos” se presenta en generaciones vegetativas futuras mediante el injerto o a través del tubérculo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Establecimiento de la colonia de *B. cockerelli* libre de fitoplasmas.** Se hicieron colectas de ninfas de diferentes estadios a partir de genotipos de papa de aproximadamente dos meses de edad, sembrados en el CEVAMEX-INIFAP durante los meses de julio y agosto de 2003, algunos de los cuales presentaban síntomas de punta morada de la papa. Se utilizó un biotipo que indujo, en pruebas preliminares, “amarillamientos por psílido” en las variedades Alpha y Sangema. Inicialmente, las ninfas se colocaron en plantas de papa mantenidas individualmente en vasos de unicel con malla, en una cámara con fotoperíodo de 14 horas y temperatura de 10 a 25°C. Con la idea de asegurar la continuidad de la colonia e incrementar el número de insectos, se inició, en invernadero, otra cría a partir de la colonia de papa en plantas de chile de la variedad Criollo Mixquic (Guajillo, Pulla) en donde el psílido se reproduce mejor.

Con el propósito de conocer las condiciones en las cuales se desarrolló y reprodujo la colonia e indujeron los síntomas de “amarillamiento por psílicos”, se registró la

temperatura y la humedad relativa utilizando un higrómetro digital marca HOBO. Los datos se capturaron mediante el programa BoxCar Pro 3.51.

**Detección de fitoplasmas en la colonia de insectos y plantas hospederas, mediante prueba de PCR.** Esta técnica se practicó antes, durante y al concluir el experimento, con el objeto de corroborar la presencia o ausencia de fitoplasmas en la colonia y en las plantas hospederas, para lo cual se tomaron cada vez muestras de entre 10 a 15 individuos (adultos y ninfas) y hasta 2-3 brotes de hoja con huevecillos en los márgenes de la misma. Se muestrearon folíolos de cuatro plantas de chile, en donde se reprodujo la colonia formando muestras compuestas. Las plantas de papa infestadas con el insecto fueron también muestreadas tomando folíolos de hasta cinco plantas con “amarillamientos por psílido” distribuidas al azar en la jaula para realizar pruebas de PCR en los experimentos de 2004 y 2005. El ADN se extrajo mediante la técnica descrita por Ahrens y Seemuller (1992). Las PCR se efectuaron de manera directa con el par de iniciadores P1/Tint (Smart *et al.*, 1996), que amplifican un fragmento de 1600 pb. También se realizaron reacciones secuenciales, conocidas como PCR anidado (nested-PCR) utilizando primero el par de iniciadores P1/Tint y después los pares de iniciadores universales R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996). Para las PCR secuenciales se hicieron diluciones 1:30 del primer ciclo de amplificaciones y se utilizó 1.0  $\mu$ L de la dilución como ADN molde. El volumen total de la reacción fue de 25  $\mu$ L: 50 ng de ADN, 0.5  $\mu$ M de cada iniciador, 200  $\mu$ M de dNTP's (A, T, C, G), 2.0 mM de  $MgCl_2$  y 2.5 unidades de la ADN polimerasa (Amplificasa®, Biotecnologías Universitarias, México D.F.). Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer, modelo 2400, con el programa: un ciclo de

desnaturalización a 94 °C de 2 min y 35 ciclos consistentes en 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1 min de apareamiento a 55 °C; 1min y 30 s de polimerización a 72 °C; finalmente se tuvo una fase de extensión de 72 °C, durante 7 min. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se observaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador mod. Gel-Doc 2000, Bio-Rad®.

**Evaluación de los genotipos de papa a *B. cockerelli*.** Durante el verano del 2004 y 2005, tubérculos de 20 genotipos de papa producidos en invernadero de los clones y variedades: 'Alpha', 'Atlantic', 'Bintje', 'Gigant', 'Granola', 'Lady Rossetta', 'Lupita', 'Marciana', 'Malinche', 'Michoacán', 'Mondial', 'Montserrat', 'Nau-6', 'Norteña', 'Sancal', 'Sangema', 'Sn José', 'Zafiro', '4-11' y '676008 Roja', fueron inspeccionados visualmente y con la técnica de ELISA para los virus PLRV, PVX, PVY, PVS y PVA y visualmente para enfermedades de la papa como *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Streptomyces scabies*, *Fusarium spp.* y *Spongophora subterranea*. Los genotipos se establecieron en jaulas (0.70 m de alto, 2.72 m de largo y 1.30 m de ancho) en invernadero. Pevio a la siembra, a cada maceta de 1L de capacidad conteniendo peat-moss como sustrato se le agregaron 2g de una mezcla preparada con un kilo de cada uno de los siguientes fertilizantes: sulfato de amonio, superfosfato triple, fosfonitrato, fosfato diamónico y cloruro de potasio. Se aplicaron al suelo también los siguientes fungicidas: oxiclورو de cobre 39.0% + mancoceb 30%, 4 g/L; metalaxyl 4.5%, 2 g/L; metil tiofanato 70%, 2 g/L; clorotalonil 4 g/L. Cada tratamiento correspondió a una variedad con cuatro repeticiones por tratamiento y dos macetas por repetición. Se incluyeron los testigos

con los mismos genotipos y el mismo diseño, sin insectos en una jaula independiente. Debido a la naturaleza del ensayo, no fue posible establecerlo bajo un diseño experimental; sin embargo, el análisis estadístico de los datos obtenidos se hizo aplicando el modelo de bloques al azar. En cada jaula se colocaron tres trampas amarillas pegajosas de 15 x 15 cm, para atrapar a algunos otros insectos que pudieran introducirse en ella. Una vez que emergieron las plántulas se hicieron dos aplicaciones quincenales de Bayfolan 4 cm<sup>3</sup>/L. A los 2 meses de haber sembrado los materiales, se retiraron y revisaron las trampas y se liberaron 200 adultos por jaula (50 insectos en cada cuadrante). Los psílidos liberados fueron obtenidos de la colonia previamente establecida en Chile y aparentemente libre de fitoplasmas, según lo indicaron las detecciones realizadas mediante PCR. Semanalmente se hicieron observaciones para registrar la aparición de síntomas en el follaje y para conocer las condiciones en las cuales se indujeron los síntomas de “amarillamiento por psílidos”, se tomaron datos de temperatura y humedad relativa cada hora con un higrotermógrafo digital marca HOBO. Al finalizar el ciclo fenológico de la papa (105 días en promedio), se colectaron 10 hojas por planta y se cuantificó el número de ninfas por planta de cada clon/variedad. Los conteos se realizaron con microscopio de disección para detectar los primeros estadios ninfales del insecto. Una vez cosechados los tubérculos, se tomaron datos de rendimiento (g/planta); número de tubérculos por planta; y severidad del pardeamiento con la siguiente escala: 1= sin pardeamiento; 2= muy leve; 3= leve; 4= leve moderado; 5= moderado; 6= moderado fuerte; 7= fuerte. Se hicieron observaciones de brotación a partir de los 2 a 3 meses después de la cosecha y la lectura final se tomó a los 3 meses y medio después de la misma.

**Análisis estadístico de datos.** Los datos de las variables de rendimiento (g/planta), número de tubérculos para los tratamientos con y sin insectos y de ninfas por planta durante 2004 y 2005 se sometieron a un análisis de varianza y cuando este indicó diferencias significativas entre tratamientos se realizó la prueba de Tukey  $P \geq \alpha = 0.05$ . Para los datos de la severidad del pardeamiento, evaluados con escala arbitraria, también se realizó la prueba de Tukey  $P \geq \alpha = 0.05$ .

**Transmisión por semilla del “amarillamiento por psílicos” en invernadero.** Con el propósito de determinar si los síntomas de amarillamiento, pardeamiento y brotación anormal inducidos por el psílido de la papa, se presentaban en plantas de la siguiente generación, se sembraron los tubérculos con brotes finos producidos por cada clon o variedad. Durante el crecimiento de las plantas y al final del ciclo se registraron los síntomas foliares, el grado de pardeamiento y la brotación anormal de los tubérculos.

**Transmisión por injerto a partir de plantas con síntomas de “amarillamiento por psílicos” en plantas de papa sanas.** Con la idea de determinar hasta que generación es transmitido el “amarillamiento por psílicos” e indirectamente comprobar que tales síntomas eran causados por la toxina del insecto y no por un agente infeccioso, se tomaron ramas de las plantas mantenidas en las jaulas con insectos y que mostraban los síntomas típicos. Las ramas se injertaron en seis plantas de las variedades susceptibles Norteña y Michoacán. Semanalmente se realizaron observaciones para determinar la aparición de síntomas; después de un

mes, se tomó tejido de ápices con tres nudos de las plantas que reprodujeron los síntomas y se injertó en otras plantas de la misma variedad. Se cosecharon los tubérculos procedentes de plantas del primero y del segundo injerto seriado y se evaluó el grado de pardeamiento y la brotación.

El promedio y desviación estándar de las temperaturas (°C) diarias, fueron los siguientes: mínima  $7.4 \pm 3.6$ , media  $16.5 \pm 2.5$ , máxima  $25.5 \pm 5.4$ . El promedio y la desviación estándar de la humedades relativas (%) diarias fueron: mínima  $38.4 \pm 27.5$ , media  $65.1 \pm 18.3$ , máxima  $91.7 \pm 13.7$

## RESULTADOS

**Respuesta de los genotipos de papa a *B. cockerelli*.** Todos los genotipos mostraron clorosis y síntomas típicos del insecto en el follaje después de 15 a 20 días de exposición de los mismos al insecto (Fig. 7 A y B). Las pruebas de PCR realizadas para detección de fitoplasmas en el follaje con síntomas y en los insectos (adultos, ninfas y huevecillos) fueron negativas. Al final del ciclo fenológico de la planta, el número de ninfas, en los genotipos fluctuó de 90 a 450 ninfas por planta, en 2004, y de 490 a 1800, en 2005 (Fig.1).

El rendimiento de los genotipos expuestos al insecto, en 2004 y 2005 fue significativamente menor al de los testigos ( $P \geq \alpha = 0.05$ ) (Figs. 2 y 4). En 2004, el rendimiento se redujo en 49.39% y en 2005, en 70.04%. El número de tubérculos también disminuyó en ambos años, en 19.19% para 2004 y en 70.03% para 2005. Sólo en 2005 se obtuvo una reducción significativa ( $P \geq \alpha = 0.05$ ) (Figs.3 y 5).

Durante los 2 años de evaluación, se observó que el grado de pardeamiento fue similar en los diversos genotipos, con diferencias de intensidad mínima de un año a

otro (Fig.6). El cultivar Lady Rosetta, presentó pardeamiento de nulo a muy leve. Las variedades Alpha, Gigant, y Nau 6 tuvieron pardeamientos que oscilaron entre nulo y pardeamiento leve. Atlantic y Bintje mostraron un pardeamiento de leve moderado a moderado; Mondial tuvo un pardeamiento moderado; Granola, Lupita, Malinche, Michoacán, Sancal, Sangema, San José, Zafiro, 4-11 y 676008 Roja presentaron un pardeamiento que osciló de moderado a moderado fuerte; finalmente, Marciana, Montserrat y Norteña presentaron síntomas más severos, los cuales fluctuaron de moderado fuerte a fuerte (Fig. 8A). Todos los genotipos presentaron brotación anormal en ambos años de evaluación el cual varió de brote fino como en los cultivares Gigant, Lady Rosetta y NAU-6 hasta algunos casos sin brote por ejemplo en cv. Michoacán, Montserrat, Sangema y Zafiro (Fig.8 B y C). Se observó que genotipos como Atlantic, Bintje, Gigant, Granola, Lady Roseta, Malinche, Mondial y Nau-6 presentaron brotación anormal prematura en ambos años.

El promedio y desviación estándar de las temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ) diarias, fueron los siguientes: mínima  $7.4 \pm 3.6$ , media  $16.5 \pm 2.5$ , máxima  $25.5 \pm 5.4$ . El promedio y la desviación estándar de la humedades relativas (%) diarias fueron: mínima  $38.4 \pm 27.5$ , media  $65.1 \pm 18.3$ , máxima  $91.7 \pm 13.7$ . Bajo estas condiciones de temperatura y humedad relativa en el invernadero, se reprodujo satisfactoriamente la colonia de insectos y se indujeron síntomas claros de “amarillamiento por psílicos”.

Las plantas desarrolladas a partir de los tubérculos de plantas expuestas al insecto, al inicio presentaron un retraso en el crecimiento y menor vigor con respecto a los testigos; sin embargo durante su crecimiento, no mostraron los síntomas de “amarillamiento por psílicos”, los tubérculos producidos por los diferentes genotipos no presentaron pardeamiento y la brotación fue normal.

**Transmisión por injerto a partir de plantas con síntomas de “amarillamiento por psílicos”, en plantas sanas de papa.** Solamente en cuatro plantas de las 16 injertadas en la variedad Norteña, se observó el desarrollo de síntomas de “amarillamiento por psílicos” en el follaje (25%); sin embargo, cuando se volvieron a injertar en la misma variedad ya no se detectaron síntomas claros o consistentes en las plantas injertadas. En la variedad Michoacán no se observó ningún síntoma. En ambas variedades, en los tubérculos procedentes de estas plantas injertadas no se observó pardeamiento y la brotación fue normal.



## **DISCUSIÓN**

Los síntomas foliares que aparecieron en todos los genotipos de papa concuerdan con los reportados en campo por otros investigadores (Carter, 1950; Carter, 1962; Daniels, 1954). En invernadero, el insecto afectó el rendimiento, tamaño de los

tubérculos e indujo brotación anormal (desde falta de brotación, brotación prematura y brote fino), en todos los genotipos, en los 2 años. En las variedades Atlantic, Bintje, Gigant, Granola, Lady Rosetta, Malinche, Mondial y Nau 6 se presentó brotación anormal prematura durante los 2 años, la cual posiblemente se deba a la interrupción de la dormancia inducida por el psílido (Carter, 1950; Carter, 1962; Daniels, 1954). La producción de tubérculos en cadena, reportada por estos investigadores, no se detectó en ninguno de los genotipos probados en el presente trabajo de invernadero. En condiciones de campo tal síntoma no necesariamente pudo haber sido inducido por el insecto sino por la influencia de las condiciones de campo, la presencia y/o interacción con algún otro patógeno, la respuesta del genotipo de papa en particular o la combinación de éstos y otros factores difíciles de controlar en campo. El pardeamiento del tubérculo en Alpha, Gigant y NAU-6 osciló de muy leve a leve, lo cual coincide con lo reportado en un trabajo sobre distribución incidencia y severidad del pardeamiento, asociado con la presencia de la punta morada de la papa (PMP) y *B. cockerelli*, en el que esas variedades fueron agrupadas en un mismo rango (Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003); sin embargo, la severidad (de leve a leve moderado) fue ligeramente mayor a la observada en este trabajo. Lo anterior fue posiblemente debido a la presencia de ambos patógenos, es decir al psílido y al posible fitoplasma involucrado y a la presión epidemiológica ejercida por los mismos en la zona central de México. Lo mismo ocurrió con la variedad Lady Rosetta que no mostró pardeamiento bajo condiciones de invernadero; sin embargo, en evaluaciones consecutivas de 2 años en el campo, en presencia de punta morada y *B. cockerelli*, se observó un pardeamiento leve (datos no publicados Cadena-Hinojosa, comunicación personal) más intenso que en el invernadero posiblemente asociado a

las condiciones de campo y a la influencia de *B. cockerelli* y el fitoplasma. Aunque estas cuatro variedades mostraron un pardeamiento por el psílido, de nulo a leve, no tuvieron resistencia total al mismo, ya que todas dieron síntomas en el follaje. Además estas variedades por sus bajas lecturas de pardeamiento en el tubérculo podrían ser consideradas como posibles fuentes de tolerancia al mismo en programas de mejoramiento genético de la papa. Granola, Lupita, Malinche, Michoacán, Sancal, Sangema, San José, Zafiro, 4 -11 y 676008 Roja las cuales presentaron un pardeamiento que osciló entre moderado a moderado fuerte, han sido catalogadas en la misma escala en trabajos de campo. Lo mismo sucedió con las variedades Marciana, Michoacán, Montserrat, Norteña y Zafiro que en trabajos de campo tuvieron pardeamientos de moderado fuerte a fuerte (Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003). Tal sintomatología, reportada con anterioridad (Sanford, 1952; Snyder *et al.*, 1946a, b), ha sido observada en tubérculos producidos bajo condiciones de campo. En el presente trabajo el pardeamiento interno y el brote fino se observó en la mayoría de los genotipos evaluados, y hubo cuatro de éstos con pardeamiento de nulo a leve que presentaron brote fino bajo condiciones de almacén. Recientemente Munyanesa *et al.*, 2007, reportaron la asociación de *B. cockerelli* con síntomas de “zebra chip”, que consisten en patrones de rayado en cortes del tubérculo que se hacen evidentes mediante procedimientos de fritura y lo relacionado con brotación anormal no se menciona. Esta sintomatología de “zebra chip” es diferente a la reportada en este trabajo. Con relación a la transmisión por tubérculo del “amarillamiento por psílicos”, en los materiales nuevamente sembrados, al inicio se presentó un retraso en el crecimiento y menor vigor con respecto a los testigos; asimismo, los tubérculos producidos por los diferentes genotipos no presentaron

pardeamiento y la brotación fue normal. Lo anterior sugiere una recuperación gradual de la planta a través de generaciones. En trabajos de campo realizados en Colorado E.U. tampoco se encontró evidencia de que la enfermedad inducida por psíidos fuese transmitida por semilla tubérculo; pero citan que el grado de infestación por éstos en el campo da lugar a daño de mediano a severo lo que a su vez repercute en el rendimiento (Edmunson, 1940). Lo anterior podría ser congruente con la idea de que se trata de una enfermedad no infecciosa en la que posiblemente se encuentren involucradas una o varias “toxinas” (Abernathy, 1991), cuya concentración en los tejidos de la planta va disminuyendo a través del tiempo, permitiendo así la recuperación de la misma y por ende la remisión de los síntomas iniciales. Aunque cada planta fue injertada con tres brotes de hoja con síntomas claros y evidentes, sugiriendo una alta concentración del principio fitotóxico, se obtuvo un bajo porcentaje de transmisión de “amarillamiento” por psíidos (25%). Cuando a partir de estas pocas plantas que mostraron síntomas, se volvió a tomar tejido para injertarlo en otras de la misma variedad, en estas últimas ya no se observaron síntomas claros, ni los tubérculos que produjeron presentaron pardeamiento interno. Estos resultados son congruentes con lo reportado por algunos investigadores, quienes mencionan que plantas fuertemente cargadas con la “toxina” del psílido, al ser injertadas en plantas sanas transmiten el principio fitotóxico en suficiente cantidad como para inducir nuevamente el síntoma de amarillamiento causado por el insecto; sin embargo, en injertos subsecuentes el principio fitotóxico se disipa y ocurre la recuperación gradual de las plantas como una reacción reversible (Daniels, 1954). Lo anterior refuerza la idea de que metabolitos producidos por el psílido, son responsables de la sintomatología inducida.

## CONCLUSIONES

- El rendimiento y número de tubérculos fue drásticamente reducido en todos los genotipos por *B. cockerelli* en los dos años de estudio.
- El pardeamiento interno en los tubérculos, brotación prematura, brote fino y ausencia de brotación fueron inducidas por el psílido bajo condiciones de invernadero y en ausencia de fitoplasmas asociados con la enfermedad de la punta morada de la papa.
- Los cultivares NAU-6, Alpha, Gigant y Lady Rosetta fueron tolerantes al pardeamiento interno del tubérculo.
- El síntoma de “amarillamiento por psílicos” no fue transmitido por tubérculo ni por injerto sucesivo.
- El número de ninfas fue suficiente para inducir el síntoma de “amarillamiento por psílicos”, pardeamiento y brotación anormal en genotipos de papa.

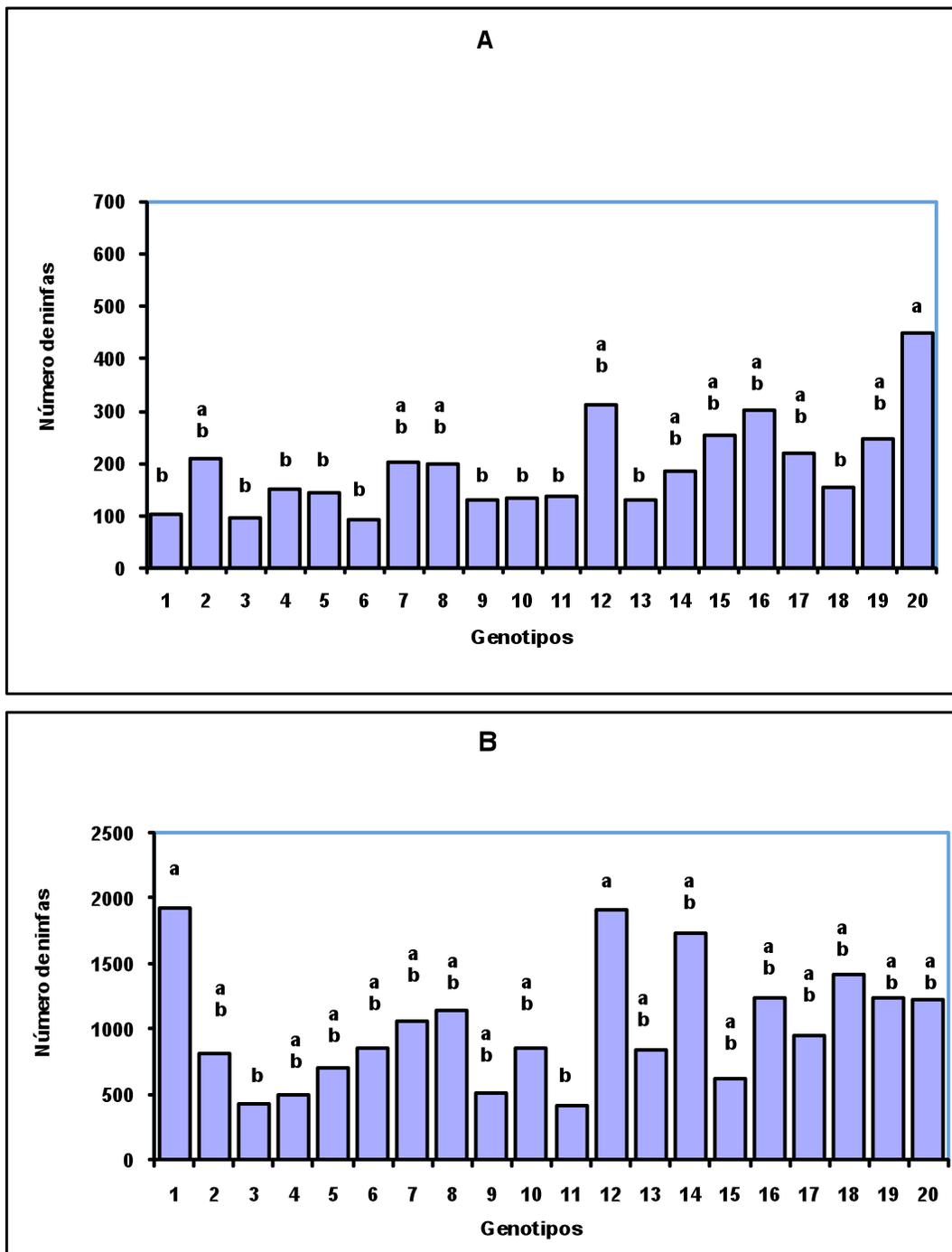


Figura1. Número promedio de ninfas de *Bactericera cockerelli* por planta de papa de 20 variedades y clones avanzados bajo condiciones de invernadero. 2004 (A) y 2005 (B). Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). 1. Alpha, 2. Atlantic, 3. Bintje, 4. Gigant, 5. Granola, 6. Lady Rosetta, 7. Lupita, 8. Marciana, 9. Malinche, 10. Michoacán, 11. Mondial, 12. Montserrat, 13. NAU-6, 14. Norteña, 15. Sancal, 16. Sangema, 17. San José, 18. Zafiro, 19. 4-11, 20. 6760008 Roja.

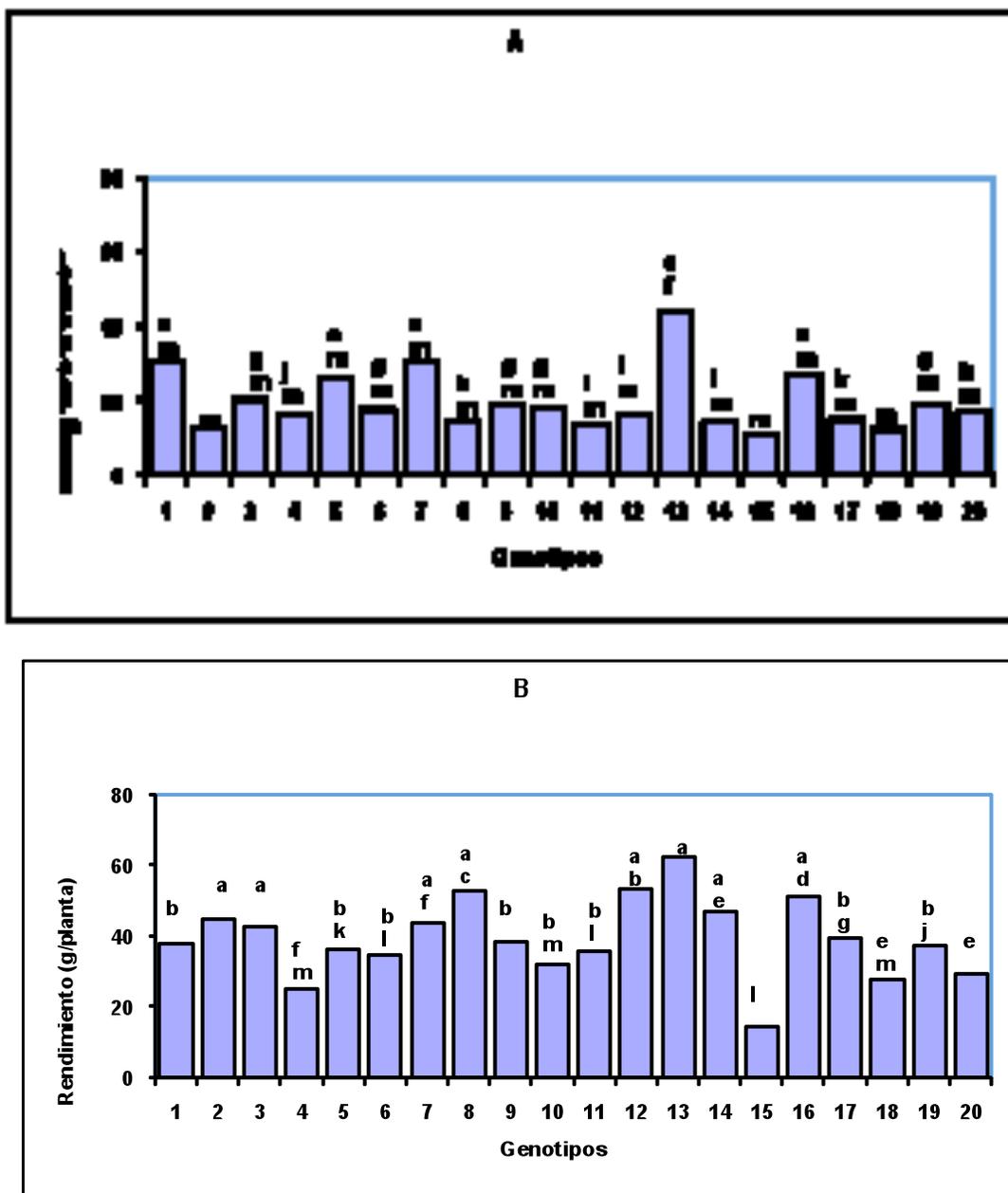


Figura 2. A) Rendimiento en 20 variedades de papa y clones avanzados expuestos a *Bactericera cockerelli* bajo condiciones de invernadero B) Testigo sin insectos. 2004. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4-11; 20. 6760008 Roja.

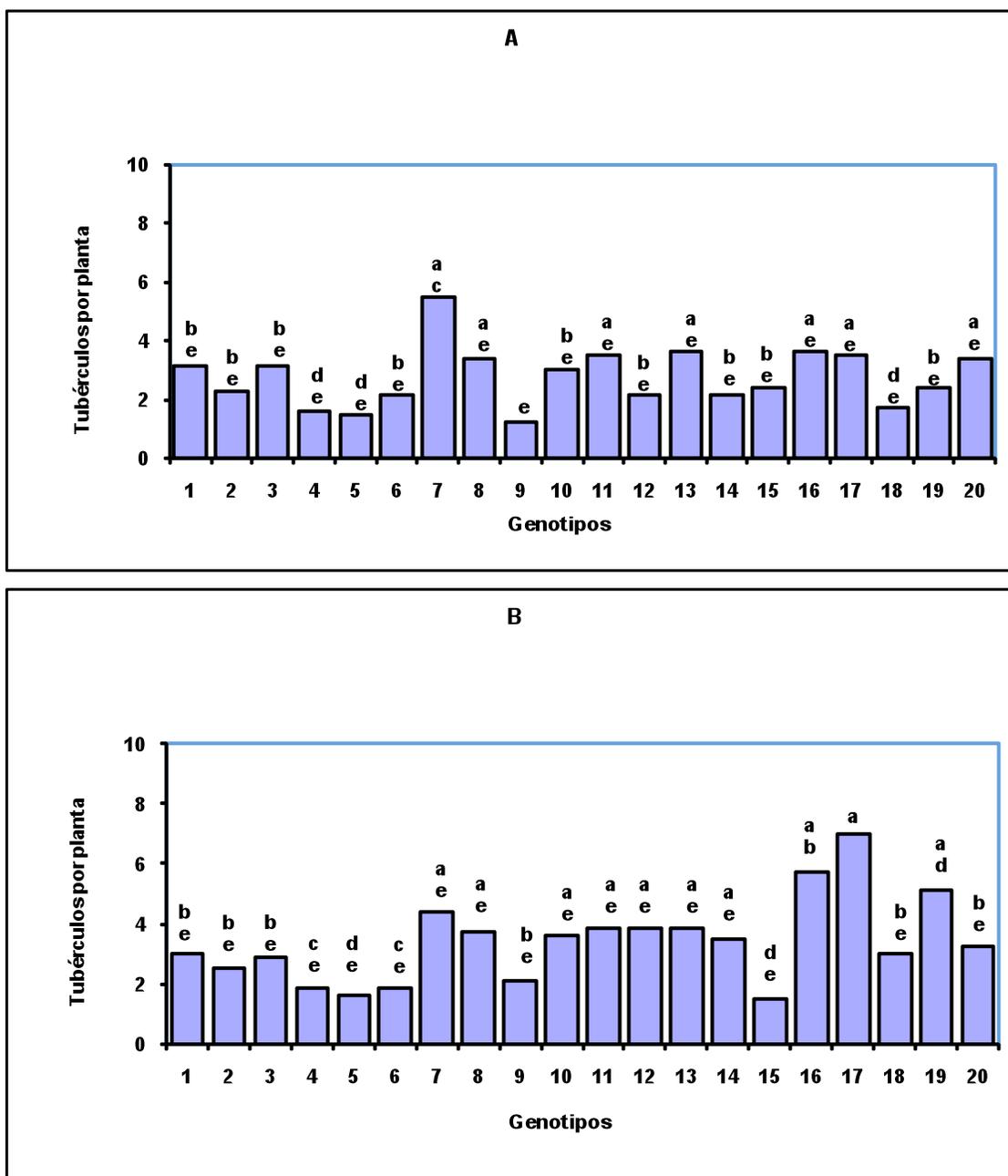


Figura 3. A) Número de tubérculos por planta producidos por 20 variedades y clones avanzados de papa expuestos a *Bactericera cockerelli* bajo condiciones de invernadero. B) Testigo sin insectos. 2004. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4-11; 20. 6760008 Roja.

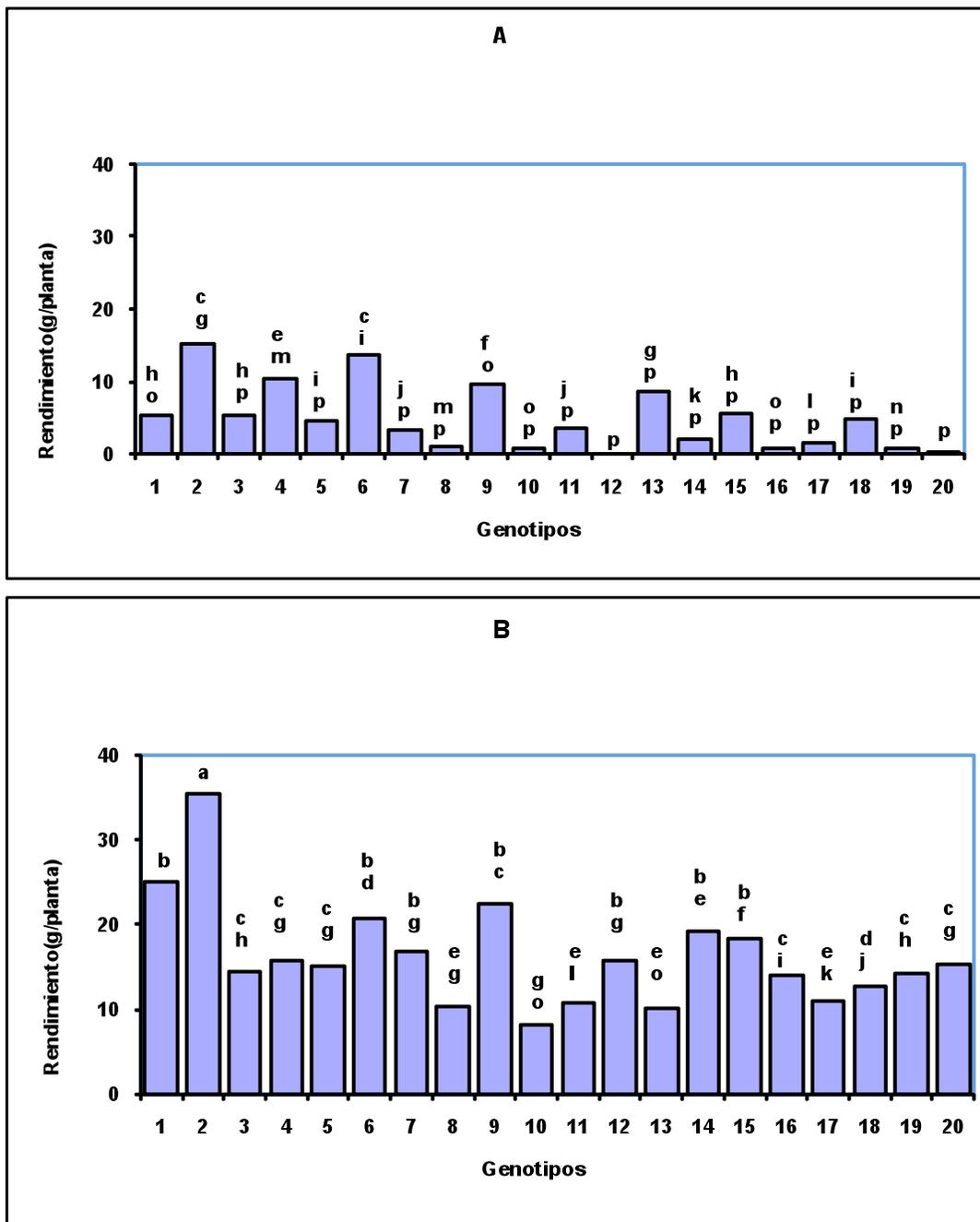


Figura 4 A) Rendimiento en 20 variedades y clones avanzados de papa expuestos a *Bactericera cockerelli* bajo condiciones de invernadero B) Testigo sin insectos. 2005. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4-11; 20. 6760008 Roja.

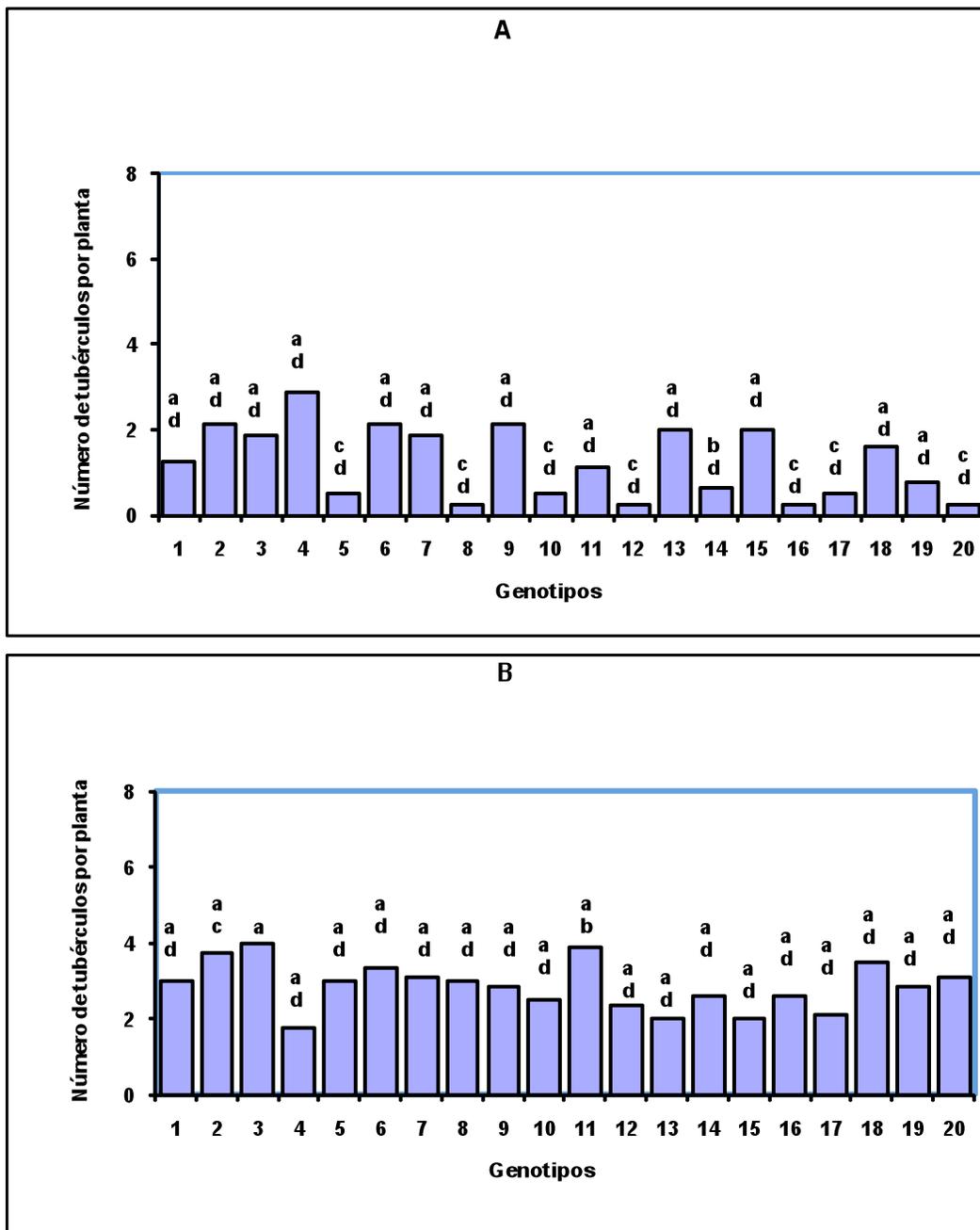


Figura 5. A) Número de tubérculos por planta producidos por 20 variedades y clones avanzados de papa expuestos a *Bactericera cockerelli* bajo condiciones de invernadero B) Testigo sin insectos. 2005. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4-11; 20. 6760008 Roja.

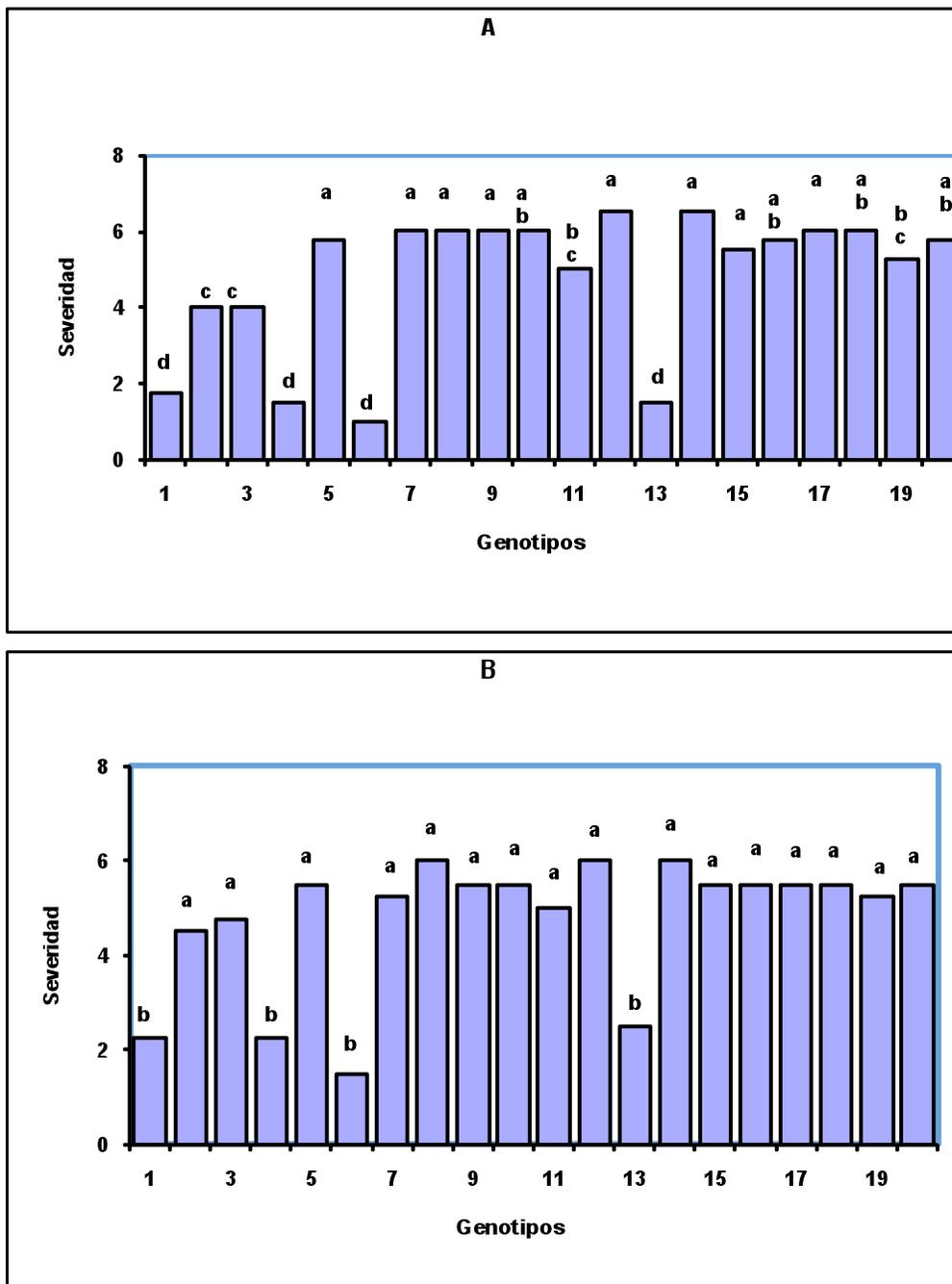


Figura 6. Pardeamiento interno en tubérculos de 20 variedades y clones avanzados expuestos a *Bactericera cockerelli* bajo condiciones de invernadero 2004 (A) y 2005 (B). Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). 1. Alpha; 2. Atlantic; 3. Bintje; 4. Gigant; 5. Granola; 6. Lady Rosetta; 7. Lupita; 8. Marciana; 9. Malinche; 10. Michoacán; 11. Mondial; 12. Montserrat; 13. Nau 6; 14. Norteña; 15. Sancal; 16. Sangema; 17. San José; 18. Zafiro; 19. 4-11; 20. 6760008 Roja

## LITERATURA CITADA

- Abernathy, R.L. 1991. Investigations into the nature of the potato psyllid toxin. M.S. Thesis. Colorado State University, Ft. Collins, CO. 54 p.
- Ahrens, U., and Seemuller, E.1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Arslan, A., Bessey, P.M., Matsuda, K., and Oebker, N.F. 1985. Physiological effects of psyllid (*Paratrioza cockerelli*) on potato. *American Potato Journal* 62:9-22.
- Blood, H.L., Richards, B.L., and Wann, F.B. 1933. Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology* 23:930.
- Cadena-Hinojosa, M.A. 1974. Estudios sobre la "Punta Morada" de la Papa. Tesis de Maestría. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. 70 p.
- Cadena-Hinojosa, M. A., Guzmán-Plazola, R., Díaz-Valasis, M., Zavala-Quintana, T.E., Magaña-Torres, O.S., Almeyda-León, I.H., López-Delgado, H., Rivera-Peña, A. y Rubio-Covarrubias, O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:248-259.
- Carter, R.D. 1950. Toxicity of *Paratrioza cockerelli* (Sulc) to certain solanaceous, Ph.D. Dissertation. University of California Berkeley. Berkeley, CA. 128 p.
- Carter W. 1962. *Insects in Relation to Plant Diseases*. Interscience Pub. New York. 705 p.

- Cranshaw, W.S. 1993. An annotated bibliography of potato/tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae). Colorado State University Agricultural Experiment Station Bulletin TB93-5.Ft. Collins, CO. 52 p.
- Cranshaw, W.S. 1994. The potato (tomato) psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) as a pest of potatoes) In: Advances in Potato Pest Biology and Management G.W. Szender, L.M., Powelson, R.K. Jansson, and K.V. Raman (eds). The American Phitopathological Society.St. Paul, MN. pp. 83-94.
- Cranshaw, W.S. 2002. Manejo del psílido de la papa /tomate en el cultivo de la papa. Memorias del XI congreso Nacional de Productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002. León, Guanajuato, México. pp. 46-51.
- Daniels, L.B. 1954. The nature of the toxicogenic condition resulting from the feeding of the tomato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Ph.D. Dissertation. Univ. Minnesota. 119 p.
- Edmundson, W.C.1940. The effect of psyllid injury on the vigor of seed potatoes. American Potato Journal 17: 315-317.
- Fuentes del Valle, O., García Palacios, O., y Mercado Guerrero, A. 1960. Control de plagas y del amarillamiento de la papa con Thimet al 10% granulado en la región de Navidad Nuevo León. II Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología. Escuela Nacional de Agricultura Chapingo. Chapingo, Edo. de México. pp. 199-205.
- Gundersen, D.E., and Lee, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea 35:144-151.

- López Flores, C.I. 2002 Estudios sobre el psílido de la papa (*Paratrioza cockerelli*) en la región del Bajío. Memorias del XI Congreso Nacional de Productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002. León, Guanajuato, México. pp. 98-109.
- Munyaneza, J.E., Crosslin, J.M. and Upton, J.E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "Zebra Chip," a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100:656-663.
- Pletsch, D.J. 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc.), its biology and control. Montana Agricultural Experiment Station. Bulletin 446, 95 p.
- Richards, B.L. 1928. A new and desctructive disease of the potato in Utah and its relation to potato psylla . (Abstract) *Phytopathology* 18: 140-141.
- Richards, B.L. 1931. Further studies with psyllid yellows of the potato. (Abstract) *Phytopathology* 21:103.
- Rubio Covarrubias, O.A., Almeyda, L.H., Sánchez, S.A., Ireta, M.J., Fernández, R., Borbón, S.J.T., López, D.H., Díaz, H.C., Garzón, T.A., Rocha, R.R., Cadena, H.M. 2002. Importancia y distribución de la punta morada de la papa en México. Memorias del Taller Internacional de Trabajo sobre la Punta Morada de la Papa y *Paratrioza cockerelli* . INIFAP y CONPAPA. Enero 17, 2002. Toluca, Edo. de México. pp. 1-11.
- Sanford, G.B. 1952. Phloem necrosis of potato tubers associated with infestation of vines by *Paratrioza cockerelli* (Sulc.). *Science of Agriculture*. 32:433-439.
- Secor, G.A. and Rivera-Varas, V.V. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Rev. Latinoamericana de la Papa (Supl.)* 1:1-8.

- Sifuentes, J.A. 1977. Plagas de algunas hortalizas en México. Folleto de Divulgación 53. INIFAP. México, D.F. 48 p.
- Smart, C.D., Schneider, B., Bomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Snyder, W.C., Thomas, H. E., and Fairchild, S.J. 1946a. A type of internal necrosis of the potato tuber caused by psyllids. *Phytopathology* 36: 480-481.
- Snyder, W.C., Thomas, H. E. , and Fairchild, S.J. 1946b. Spindling or hair sprout of potato. *Phytopathology*. 36:897-904.
- Wallis, R.L. 1955. Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin 1107:25.
- Zavala-Quintana, T.E. 2002. Experiencias en el Valle de Toluca sobre Punta Morada. Memorias del XI Congreso Nacional de Productores de Papa. Septiembre 26-28, 2002. León, Guanajuato, México. pp. 81-97.

A



B



**Figura 7.** Síntomas de “amarillamientos por psílido”. **A**, en el cultivar Alpha **B**, en diferentes cultivares dentro de la jaula. Se observa retraso en el crecimiento y aumento en la intensidad de la clorosis .

A



B



C



Figura 8. **A**, pardeamiento del tubérculo, superior izq. inducido por el psílido de la papa, testigo negativo, superior der. **B** y **C** brotación anormal mostrando brote fino o sin brotación (fila inferior), en contraste con brotación normal del tubérculo (fila superior).