

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:.

Importancia de la Semilla-Tubérculo y la Arvensa *Lycium berlandieri* (Dunal) para la Epidemia de Punta Morada/Zebra Chip de la Papa

Importance of the Seed-tuber and the Overgrowth *Lycium berlandieri* (Dunal) for the Potato Purple Top/Zabra Chip Epidemic

Authors/Autores: Hernández-García, V., Salas-Marina, M. A., Frías-Treviño, G. A., Aguirre-Uribe, L.A., Flores-Olivas, A., Almeyda-León, I.H

ID: e442

DOI: <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e442>

Received/Fecha de recepción: January 24th 2018.

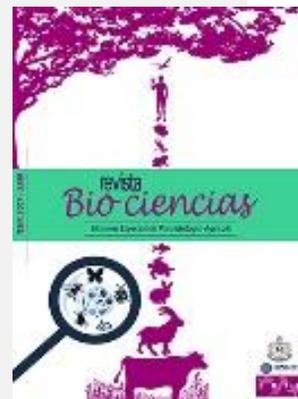
Accepted /Fecha de aceptación: August 23rd 2018.

Available online/Fecha de publicación: October 25th 2018.

Please cite this article as/Citar como: Hernández-García, V., Salas-Marina, M. A., Frías-Treviño, G. A., Aguirre-Uribe, L.A., Flores-Olivas, A., Almeyda-León, I.H. (2018). Importance of the Seed-tuber and the Overgrowth *Lycium berlandieri* (Dunal) for the Potato Purple Top/Zabra Chip Epidemic *Revista Bio Ciencias* 5(nesp), e442 . doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e442>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.



Importancia de la Semilla-Tubérculo y la Arvensa *Lycium berlandieri* (Dunal) para la Epidemia de Punta Morada/Zebra Chip de la Papa (Importance of the Seed-tuber and the Overgrowth *Lycium berlandieri* (Dunal) for the Potato Purple Top/Zabra Chip Epidemic) Hernández-García, V.¹, Salas-Marina, M. A.¹, Frías-Treviño, G. A.^{2*}, Aguirre-Uribe, L.A.², Flores-Olivas, A.², Almeyda-León, I.H.³

¹Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ingeniería, Unidad Académica Villacorzo, Km. 3.0 Carretera Villacorzo-Ejido Monterrey, Villacorzo, Chiapas, México. C.P. 30520; ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315; ³INIFAP Campo Experimental General Terán, Carr. Montemorelos-China km. 31, General Terán, Nuevo León, México. CP 67400. ***Autor de Correspondencia:** Frías-Treviño, G.A., Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315. Teléfono: +52(844)254 4507. E-mail: servesa_gfriast@hotmail.com

Resumen. Semilla tubérculo proveniente de parcelas con alta incidencia de Punta Morada de la Papa (PMP) y/o Zebra Chip (ZCh) diagnosticadas positivas a *Candidatus* Phytoplasma y/o a *Candidatus* Liberibacter solanacearum, fueron una importante fuente de inóculo primario (FI) como lo demuestra el gradiente de enfermedad y de infección en una parcela experimental. Estos gradientes no se observaron cuando se usó como FI, plantas de la arvensa *Lycium berlandieri* infectadas con la bacteria *Ca. Liberibacter solanacearum*, aun cuando los insectos vectores estuvieron presentes en la parcela experimental. En la parcela en las que se observó gradiente, se estimó una distancia máxima de dispersión de 80 a 100 m. La mayoría de las plantas enfermas presentaban infección mezclada de *Ca. Phytoplasmas* y *Ca. Liberibacter solanacearum*. Se estimó un período de incubación de PMP/ZCh de 23-30 d. Las pérdidas causadas por PMP y ZCh se incrementaron conforme se redujo la edad de la planta en la que aparecen los síntomas. La identidad del *Ca. Liberibacter solanacearum* se confirmó mediante secuenciación fragmentos de ADN amplificados por PCR. Estos resultados indican que en la estrategia de manejo de PMP/ZCh debe considerarse la siembra de semilla

tubérculo libre de *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter solanacearum*, mantener un área de 80-100 m alrededor de la parcela libre de plantas hospederos (papa mostrenca) e insectos vectores de *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter solanacearum*, así como vigilar y proteger estrictamente al cultivo de la infección por estos patógenos durante las etapas tempranas de desarrollo.

Palabras clave: Fitoplasmas, Gradiente, Fuente de inóculo

Abstract. Seed tuber from plots with high incidence of potato purple top (PPT) and zebra chip (ZCh), diagnosed positive to PPT *Phytoplasma* and *Candidatus Liberibacter solanacearum* were an important primary inoculum source (IS), as demonstrated by the disease and infection gradient observed in an experimental plot. These disease and infection gradients were not observed when overgrowth *Lycium berlandieri* infected with *Ca. Liberibacter solanacearum* were used as IS, even though insect vectors were present in the experimental plot. Plots where disease gradient was observed were used to estimate 80-100 m as the maximum dispersal distance. Most diseased plants had mixed infections with *Ca. Phytoplasma* and *Ca. Liberibacter solanacearum*. A 23-30 days incubation period was estimated. Disease losses by PPT and ZCh decrease as plant age at symptoms appearance increased. *Ca. Liberibacter solanacearum* was identified from amplified DNA fragments obtain by PCR. These results indicate that management strategy should consider using seed-tubers free from *Ca. Phytoplasma* and *Ca. Liberibacter solanacearum*, control host plants (potato volunteers) and PPT vectors 80-100 m around the plot, as well as strict protection from infection during early crop development.

Additional keywords: Phytoplasmas, Gradient, Inoculum source

Introducción

En la región papera de Coahuila y Nuevo León, México la enfermedad conocida como Punta Morada de la Papa (PMP), es la principal limitante de la producción de este cultivo (Flores-Olivas y Lira-Saldivar, 2008, CESAVECO, 2009). Además de la reducción del rendimiento, los tubérculos infectados con PMP son rechazados por la industria e inadecuados para la siembra y el consumo en fresco (Munyanza *et al.*, 2006; Camacho-Tapia *et al.*, 2016). Los reportes del agente causal de la PMP parece variar de lugar en lugar; Leyva-López *et al.* (2002), reportaron que el agente causal de la PMP son fitoplasmas, Lee *et al.*, (2006) reporta a *Candidatus* Phytoplasma americanus; por otro lado Munyanza *et al.* (2008), Almeyda-León *et al.* (2009), Munyanza *et al.* (2009) y Secor *et al.* (2009), indican que el principal agente causal de la enfermedad que refieren y nombran como Zebra Chip (ZCh), es la bacteria *Candidatus* Liberibacter solanacearum (*Ca. Liberibacter*), también reportada como *Candidatus* Liberibacter psyllaourous (Hansen *et al.*, 2008). Al analizar estos reportes y los síntomas que los autores describen e ilustran, es evidente que, en el follaje de papa, no es posible distinguir los síntomas causados por *Ca. Phytoplasma* de los que causa *Ca. Liberibacter*; ambos patógenos causan amarillamiento, hojas erectas, entrenudos cortos, inflamación de brotes axilares (tubérculos aéreos) y coloración morada en algunas hojas. El único síntoma distintivo de PMP y Zebra Chip se presenta en el tubérculo, *Ca. Liberibacter* causa un rayado en la pulpa del tubérculo que se hace más notorio al freírla, síntoma que dio lugar al nombre de Zebra Chip (ZCh). Para determinar el patógeno asociado a los síntomas es necesario procesar por PCR muestras de las plantas enfermas utilizando primers para *Ca. Liberibacter* y *Ca. Phytoplasma*. En esta publicación utilizaremos la notación **PMP/ZCh** para referirnos a la enfermedad que causan cualquiera de los dos patógenos o la combinación de los mismos en una planta de papa

De acuerdo con los resultados de investigaciones realizadas en México y Estados Unidos de América (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Munyanza *et al.*, 2007; Munyanza *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2008; Camacho-Tapia *et al.*, 2016), *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter solanacearum* (*Ca. Liberibacter*) pueden ser transmitidos por el psillido *Bactericera cockerelli* Sulc (Hemiptera: Psyllidae),

adicionalmente se ha reportado que *Ca. Phytoplasma* se puede transmitir por las chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae) y psillidos *Bactericera cockerlli* (Munyanzeza *et al.*, 2006; Almeyda *et al.*, 2008; Flores y Lira 2008). Actualmente, la PMP/ZCh se maneja con numerosas aplicaciones de plaguicidas para controlar a los insectos vectores; sin embargo, aún con este manejo es frecuente el registro de altas incidencias de la enfermedad y cuantiosas pérdidas. Una mejor estrategia de manejo sería posible si se estableciera claramente cuál es la principal fuente de inóculo (FI) a partir de la cual se inicia la epidemia, cuál es la distancia máxima a la que los vectores pueden dispersar la enfermedad, cuál es el período de incubación en campo y cuáles son los períodos críticos en los que el cultivo debe protegerse para reducir las pérdidas causadas por PMP/ZCh.

Los objetivos de esta investigación fueron: a) evaluar la importancia de la semilla tubérculo y la arvense *Lycium berlandieri* Dunal como FI primario, b) estimar la capacidad de dispersión de la PMP/ZCh a partir de semilla tubérculo y la arvense (*L. berlandieri*) infectadas con *Ca. Phytoplasma* y/o la bacteria *Ca. Liberibacter*, c) determinar el período de incubación de la enfermedad en campo y d) evaluar el efecto de la enfermedad punta morada de la papa en el rendimiento en plantas infectadas en diferentes etapas de desarrollo.

Materiales y métodos

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

Gradiente de enfermedad. En el ciclo 2007, se sembraron minitubérculos de papa variedad Gigant certificados fitosanitariamente y diagnosticadas libres de *Ca. Phytoplasma*, en una parcela experimental de 50 m de largo y seis surcos de ancho. La distancia entre surcos fue de 1.5 m y la distancia entre plantas fue de 0.4 m, para obtener una densidad de 16,750 plantas/ha. Como FI se sembraron en el borde de la

parcela, seis surcos de 3 m de largo con semilla-tubérculos var. Atlantic provenientes de un cultivo con un 100% de plantas con síntomas asociados a *Ca. Phytoplasma* y/o *Ca. Liberibacter*. Esta FI se sembró 12 d antes de sembrar los minitubérculos en el resto de la parcela, de tal manera que el inóculo estuvo disponible durante toda la etapa de desarrollo del cultivo. Una vez que emergieron los minitubérculos, se evaluó la incidencia de plantas con síntomas de PMP/ZCh en el follaje, (entrenudos cortos, amarillamiento, hojas erectas y con pigmento morado e inflamación de brotes axilares (tubérculos aéreos)). La incidencia (porcentaje de planta enfermas) se evaluó en cinco etapas de desarrollo del cultivo: surco verde (30 d después de la emergencia (DDE), surco cerrado (57 DDE), floración (73 DDE), madurez (85 DDE) y cosecha (100 DDE). Se examinaron 10 plantas adyacentes a la FI y cada 10 m a partir de la FI, hasta los 50 m, se calculó el porcentaje de plantas enfermas, y se graficó contra la distancia de la fuente de inóculo para determinar si existía un gradiente de enfermedad y por ende un efecto de la fuente de inóculo sobre la incidencia de plantas con síntomas de PMP/ZCh.

En el ciclo 2009, se repitió el experimento, usando como FI la arvensis *Lycium berlandieri* Dunal (cilindrillo) y sembrando minitubérculos de la variedad Fianna certificados fitosanitariamente y diagnosticadas libres de *Ca. Phytoplasma*. Las plantas de *L. berlandieri* se seleccionaron en el ciclo 2008 en la región papera de Nuevo León por estar fuertemente infestada con psílidos (*B. cockerelli*) y se sembraron al borde de la parcela experimental en abril de ese mismo año, para permitir su establecimiento, y utilizarlas como FI para el ciclo 2009, previa confirmación de la presencia de *Ca. Liberibacter* determinada mediante pruebas de diagnóstico con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Gradiente de infección. En cada distancia de la FI y en cada fecha de muestreo (5 etapa del cultivo) se extrajo el ADN de las hojas de cada una de las plantas muestreadas, utilizando la metodología descrita por Almeyda *et al.* (2004). El ADN se almacenó hasta su procesamiento por PCR para determinar si estaban infectadas y, en su caso, cual o cuales patógenos estaban asociados a cada planta (*Ca. Liberibacter*, *Ca. Phytoplasma* o la mezcla de estos dos patógenos). La PCR se realizó en 2007 para

Ca. Phytoplasma y en 2008 (cuando se reportaron los iniciadores) para *Ca. Liberibacter*. Se calculó el porcentaje de plantas infectadas con cada uno o con ambos patógenos, y se graficó contra la distancia de la fuente de inóculo para determinar si existía un gradiente de infección y por ende un efecto de la fuente de inóculo sobre la incidencia de plantas infectadas con *Ca. Phytoplasma*, *Ca. Liberibacter* o la mezcla.

PCR para *Ca. Phytoplasma*. La detección de este fitoplasma se realizó mediante PCR en su modalidad nested-PCR. En el primer ciclo de amplificación se utilizó el par de iniciadores P1/P7 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'/5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') (Smart *et al.*, 1996) y en el segundo ciclo se utilizó el par de iniciadores R16mF2/R16mR1 (5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'/5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3') (Gundersen y Lee, 1996). Las PCR's se realizaron de acuerdo a lo reportado por Almeyda *et al.* (2004), en un volumen final de 25 µl conteniendo 2.5 µl de buffer de PCR (1X), 1 µl de MgCl₂ (2 mM), 2 µl de cada nucleótido (200 µM), 2 µl de cada primers (0.5 µM), 2 µl de DNA (50 ng) y 0.3 µl de DNA *Taq*-Polimerasa (1.5 U). Las PCR's se realizaron en un termociclador Mini CyCler™ MJ Research, MA. Para los iniciadores P1/P7 las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y 30 s y un ciclo final a 72 °C por 10 min. En el segundo ciclo de amplificación se realizó una dilución 2:40 del primer ciclo de amplificación y se utilizaron 2µl como DNA molde, las condiciones del termociclador fueron las mismas que en el primer ciclo de amplificación, con la variante de que la temperatura de alineamiento fue de 50 °C por 30 s.

PCR para *Ca. Liberibacter*. La detección de esta bacteria se realizó utilizando tres pares de iniciadores: Lp Frag 1-25F/Lp Frag 1-427R, Lp Frag 3-1024F/Lp Frag 3-1686R y Lp Frag 4-1611F/Lp Frag 4-480R, diseñados sobre la secuencia del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de *Ca. Liberibacter* (Hansen *et al.*, 2008). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 65 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min y un ciclo final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de

etidio (0.5 µg/ml) y se visualizó en una cámara de luz ultravioleta. Los fragmentos amplificados con los iniciadores Lp Frag 1-25F/Lp Frag 1-427R de 400 pb, fueron purificados con el Kit comercial Rapid Gel Extraction System (Marligen Bioscience, EUA) y se secuenciaron directamente en ambas direcciones. Se calculó el porcentaje de plantas infectadas con la bacteria y se graficó contra la distancia de la fuente de inóculo para determinar la posibilidad de algún gradiente de infección y por lo tanto un efecto de la fuente de inóculo sobre la incidencia de plantas infectadas con la bacteria.

Distancia máxima de dispersión. Se graficó la incidencia de plantas con síntomas y plantas infectadas a los 30 y 57 DDE contra la distancia a partir de la fuente de inóculo (semilla tubérculo o arvense). La selección de estas fechas de muestreo se basó en el período de incubación de la enfermedad en campo (23-30 d), para cerciorarse de que el inóculo para la infección proviniera de la FI sembrada junto a la parcela experimental (semilla tubérculo o cilindrillo) o por otra fuente de inóculo alrededor de la parcela y no de infecciones secundarias dentro de la parcela experimental. Se realizaron análisis de regresión utilizando los modelos para gradiente: ley de potencia, exponencial negativo y de Berger y Luke, se seleccionó el modelo que mejor se ajustó a los datos, de acuerdo con su coeficiente de determinación (r^2) y la distribución de residuales (Van der Plank, 1963; Berger y Luke, 1979; Campbell and Madden, 1990). Una vez seleccionado el modelo se trazó la línea de regresión. La distancia máxima de dispersión se definió como la distancia a la cual el modelo indica un valor de incidencia menor al 0.0001% (proporción 0.0001)

Presencia de insectos vectores. Se colocaron 3 trampas amarillas pegajosas a lo largo de las parcelas para detectar la presencia de psílicos y chicharritas, éstas fueron colocadas 50 cm por arriba de la copa del cultivo orientadas en dirección del viento. Se contó el número de psílicos (*Bactericera cockerelli*) y chicharritas (*Empoasca* y *Macrosteles* sp) capturados semanalmente en las trampas, las cuales se renovaron con esta misma frecuencia. (Zavala, 2002). Este trampeo tuvo el propósito de establecer la presencia o ausencia de insectos vectores de *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter* en la

parcela experimental y por lo tanto si existían las condiciones para que la enfermedad PMP/ZCh se dispersara a partir de la fuente de inóculo.

Período de incubación. Después de la emergencia de los brotes de las plantas de papa en la parcela experimental del ciclo 2007, se examinaron semanalmente todas las plantas en busca de síntomas y se registró el número de días que transcurrieron desde la brotación hasta que se detectó la primera planta con síntomas de PMP/ZCh.

Estimación de pérdidas. Al final del ciclo de cultivo 2007 (100 DDE), se cosecharon los tubérculos de 18 plantas en cada una de las distancias a partir de la FI (0, 10, 20, 30, 40 y 50 m) en donde se evaluó la enfermedad. Se calculó el peso promedio de tubérculos por planta (g/planta) y se multiplicó por la densidad de plantas por Ha en la parcela experimental para obtener kg/ha en cada distancia evaluada. Estos datos y los del gradiente de enfermedad a los 57 d se compararon en una gráfica compuesta. Adicionalmente se evaluó la relación entre la edad de la planta en la que aparecieron los síntomas y el porcentaje de pérdidas en rendimiento. Se determinó la fecha en la que aparecieron los síntomas de PMP/ZCh en cada distancia (0-50 m) y se graficó contra las pérdidas causadas por la enfermedad. El porcentaje de pérdidas se calculó usando el rendimiento/ha de plantas infectadas (con síntomas) a diferentes edades y el de las plantas lejanas a la fuente de inóculo y asintomáticas durante el ciclo de cultivo (0% de pérdida).

Caracterización de *Candidatus Liberibacter* spp. Con el propósito de corroborar la identidad del patógeno detectado con la metodología PCR para *Ca. Liberibacter*, los fragmentos de ADN obtenidos se secuenciaron y se realizó un análisis filogenético, el cuál consistió primeramente en consultar secuencias nucleotídicas con la máxima identidad homólogas a la secuencia objetivo en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se incluyeron 25 secuencias reportadas en el NCBI con máxima identidad a la secuencia de estudio, también se incluyó la secuencia de un organismo diferente que corresponde a la especie *Helicobacter pylori*. Los análisis filogenéticos de las 27 secuencias fueron realizados utilizando el software MEGA

versión 5.0. Para el alineamiento se usó la versión ClustalW, para tener un análisis más sensible en las secuencias alineadas se borraron los intervalos que no aportaban información del archivo. El dendrograma se generó mediante el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). El porcentaje de réplicas de los árboles con las secuencias asociadas en la prueba de arranque (1000 réplicas), se muestran al lado de las ramas o grupos formados. Este método supone que la tasa de sustitución de nucleótidos o aminoácidos es la misma para todos los linajes evolutivos. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el Método de Máximo Riesgo Compuesto (Page, 1996) y se encuentran en unidades de número de sustituciones de base por sitio.

Resultados y discusión

Gradiente de enfermedad y de infección. Se observó un pronunciado gradiente de la enfermedad en el ciclo 2007, la incidencia de la PMP/ZCh a los 30 DDE, junto a la FI fue de 40%, este porcentaje disminuyó progresivamente hasta llegar a 0% a los 40 m de distancia de la FI. A los 57 DDE, el porcentaje de enfermedad junto a la FI fue de 60%, reduciéndose progresivamente hasta 10% a los 40 m (Figuras 1A y 1B). A los 73 DDE, la tendencia en la reducción de enfermedad con respecto a la distancia con la FI no fue significativa. Esto indica que las plantas que se infectaron a partir de la FI pasaron por su período de latencia (menos de 30 días) y sirvieron de fuente de los patógenos para infectar otras plantas dentro la parcela experimental (infecciones secundarias). En base a estos resultados y a los obtenidos al estimar el período de incubación, se utilizaron las incidencias registradas 30 y 57 DDE para determinar la distancia máxima a la cual la PMP/ZCh puede diseminarse a partir de una fuente de inóculo.

En cuanto al gradiente de infección también se observó un pronunciado gradiente que presentó la misma tendencia que el gradiente de enfermedad. Este gradiente reveló que del 10 al 20% de las plantas cercanas a la fuente de inóculo resultaron infectadas con el *Ca. Phytoplasma* y/o *Ca. Liberibacter* y asintomáticas, es decir había 10-20% mas plantas infectadas que las que mostraban síntomas

(Figuras 1A y 1B). A los 100 DDE todas las plantas infectadas mostraron síntomas, lo que implica que las últimas infecciones de plantas sanas ocurrieron entre los 53-70 DDE, un período de incubación antes.

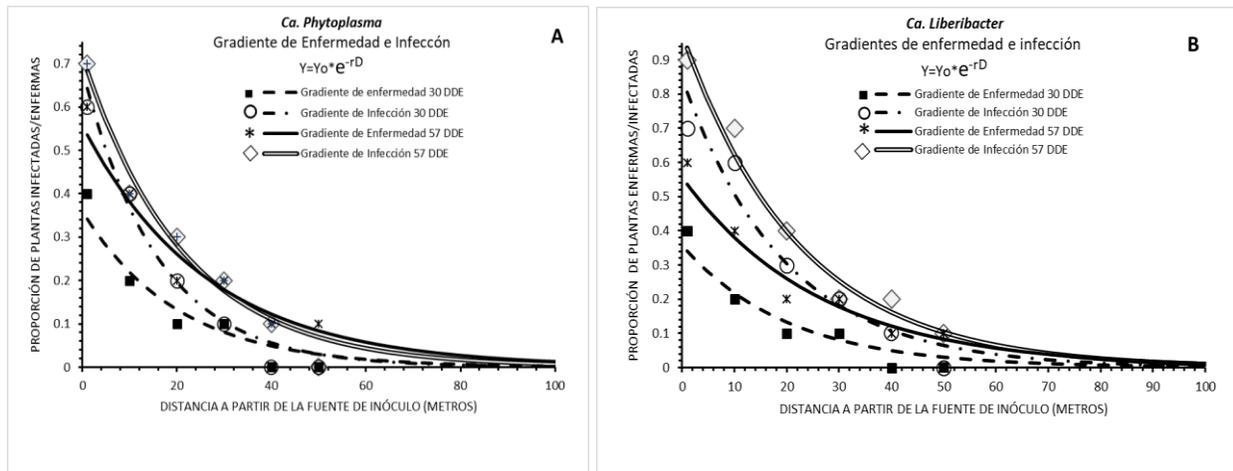


Figura 1. Gradientes de enfermedad y gradientes de infección de *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter solanacearum* (modelo exponencial negativo $Y=Yo \cdot e^{-rD}$) a partir de una fuente de inoculo. A) Incidencia de plantas con síntomas de PMP/ZCh (gradiente de enfermedad) y plantas positivas a *Ca. Phytoplasma* 30 y 57 días después de la emergencia de las plantas (DDE); B) Incidencia de plantas con síntomas de PMP/ZCh (gradiente de enfermedad) y plantas positivas a *Ca. Liberibacter solanacearum* 30 y 57 DDE.

El modelo que mejor se ajustó al gradiente de la enfermedad y de infección por *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter*, a los 30 y 57 DDE en el ciclo 2007, fue el exponencial negativo. De acuerdo con este modelo, la distancia máxima a la que puede dispersarse la PMP/ZCh fue de 80 a 100 m, así lo indica la línea de tendencia ajustada al porcentaje de plantas enfermas e infectadas con *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter* o la mezcla de estos a los 30 y 57 DDE (Figuras 1A, 1B, y 2). El porcentaje de plantas infectadas cerca de la FI fue similar, 70% para *Ca. Liberibacter* y 60% para *Ca. Phytoplasma*. Más de la mitad de las plantas infectadas tenían infecciones mezcladas (Figura 2). Basados en estos resultados podemos afirmar que los vectores requieren de una FI cercana para introducir al cultivo y diseminar dentro del mismo la enfermedad de manera efectiva y que la capacidad de los vectores para transportar a los patógenos de la FI a distancias mayores de los 80-100 m puede ser limitada.

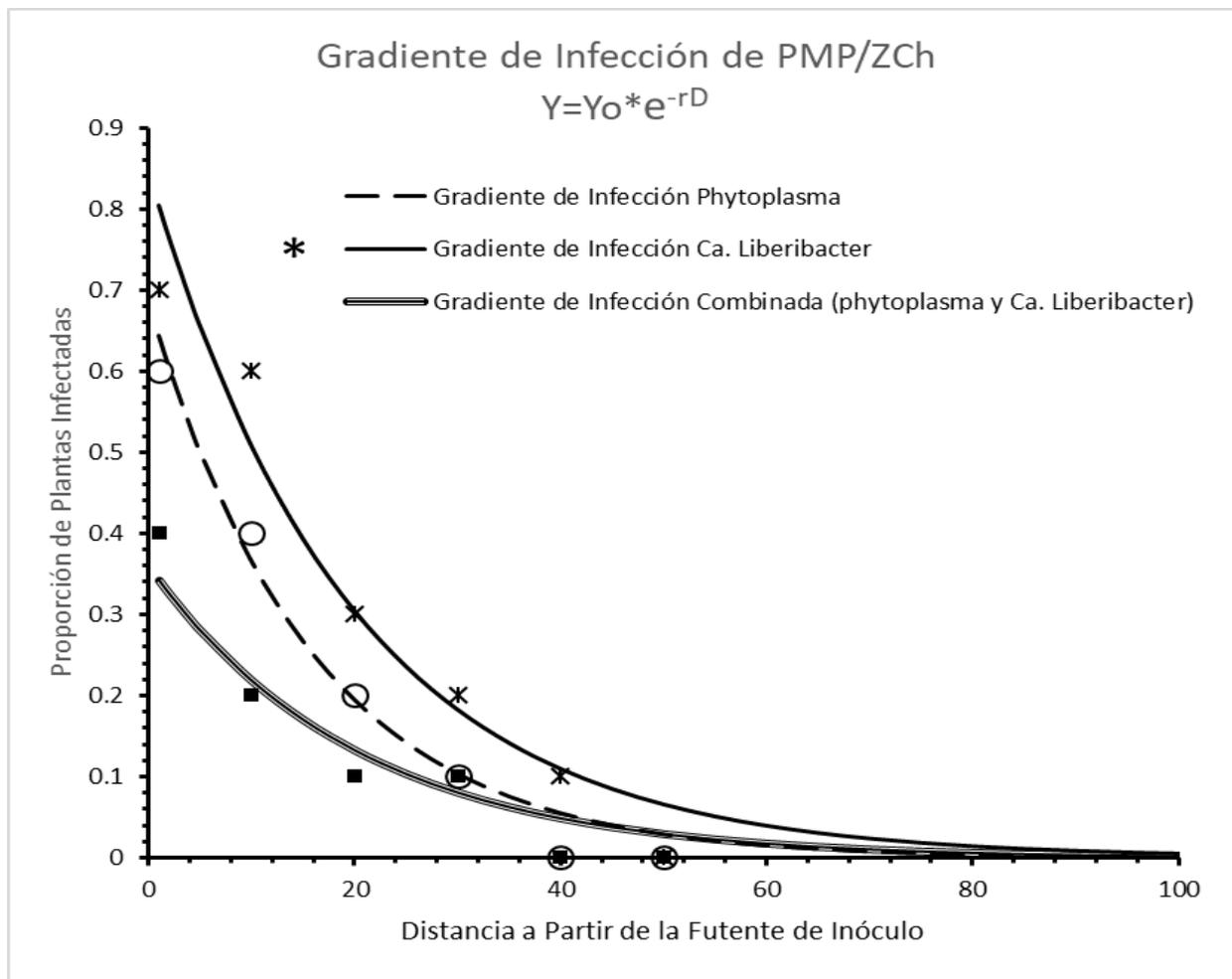


Figura 2. Gradiente de infección Ca. Phytoplasma, Ca. Liberibacter e infecciones combinadas (Ca. Phytoplasma y Ca. Liberibacter) a partir de una fuente de inóculo, 30 días después de la emergencia de la planta.

Se demostró claramente que la semilla tubérculo es una importante fuente de inóculo para el inicio de la epidemia de PMP/ZCh. En la literatura se menciona que la semilla infectada con Ca. Liberibacter no es una importante fuente de inóculo para la epidemia de ZCh (Henne *et al.*, 2010, Munyaneza *et al.*, 2011), sin embargo, en esta investigación fue evidente que la semilla tubérculo puede provocar una epidemia severa de ZCh y que su importancia como FI es mayor que la que pueden tener otras formas de introducción de la enfermedad por ejemplo insectos infectivos que por su propio movimiento o acarreados por las corrientes de aire lleguen a la parcela, como sucedió en la parcela en la que se usó como fuente de inóculo plantas de la arvence *Lycium berlandieri* Dunal infectadas con Ca. Liberibacter (Fig 3). Una de las formas

potencialmente más efectivas de prevenir o retrasar los daños por PMP/ZCh es la siembra de semilla sana. Es por lo tanto importante que todo productor analice su semilla y que los programas de certificación de semilla tubérculo de papa establezca como plagas reglamentadas no cuarentenarias a los patógenos *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter* y con esto evitar la venta de semilla contaminada con estos patógenos y reducir su dispersión. Si la semilla tubérculo es importante como FI para la PMP/ZCh, no menos importante resultan las plantas mostrencas que brotan de tubérculos infectados que quedan en el suelo del ciclo de cultivo anterior, las cuales constituyen una fuente de inóculo para el inicio de la epidemia de la PMP/ZCh, sobre todo si están presentes dentro o en lotes aledaños (80-100 m) al cultivo de papa.

En la parcela con arvenses como FI (ciclo 2009), se detectó una incidencia alta de PMP/ZCh. Aunque se detectaron vectores de PMP/ZCh durante todo el ciclo de cultivo (Figuras 4A y 4B), no se observó una reducción gradual de las plantas con síntomas de PMP/ZCh a partir de la arvense infectada con la bacteria, es decir no se detectó un gradiente de la enfermedad, pero sí una tendencia a incrementar la incidencia con el tiempo, ya que a los 30 DDE fue de 0%, 57 DDE 10% y a los 73 DDE se registró un 30% de plantas con síntomas de PMP/ZCh junto a la FI (Fig. 3). Por lo tanto, no se encontraron evidencias de que la arvense cilindrillo sea una fuente de inóculo importante para el inicio de la epidemia de PMP causada por *Ca. Liberibacter*; así lo indica la ausencia de un gradiente cuando las plantas de papa se expusieron a una FI formada por plantas de esta arvense infectada con la bacteria. La incidencia aleatoria de PMP/ZCh a lo largo de la parcela indica que otra fuente de inóculo existió en el ciclo 2009. En este ciclo en particular la parcela experimental estuvo rodeada de maíz con una alta incidencia de correhuela (*Convolvulus arvensis* L.). Es posible que los vectores no puedan transmitir directamente del cilindrillo a la papa, pero sí de la correhuela a la papa; es decir que primero los vectores transmitieron al patógeno del cilindrillo a la correhuela y una vez infectada, el vector lo transmitiera de la correhuela a la papa. Esta hipótesis coincide con la tardía aparición de la enfermedad y con la distribución aleatoria de las plantas enfermas en la parcela experimental. Algunos insectos tienen la habilidad de adquirir patógenos de las plantas infectadas, pero no son capaces de

transmitirlo a plantas sanas de diferente cultivo o especies (Albanese *et al.*, 1997; Danielli *et al.*, 1996). Por lo tanto, la estrategia que de manejo fitosanitario para PMP/ZCh debe incluir controlar las arvenses hospedantes de PMP/ZCh y plantas mostrencas de papa dentro de las parcelas de producción y en lo posible, en un radio de 100 m alrededor del cultivo.

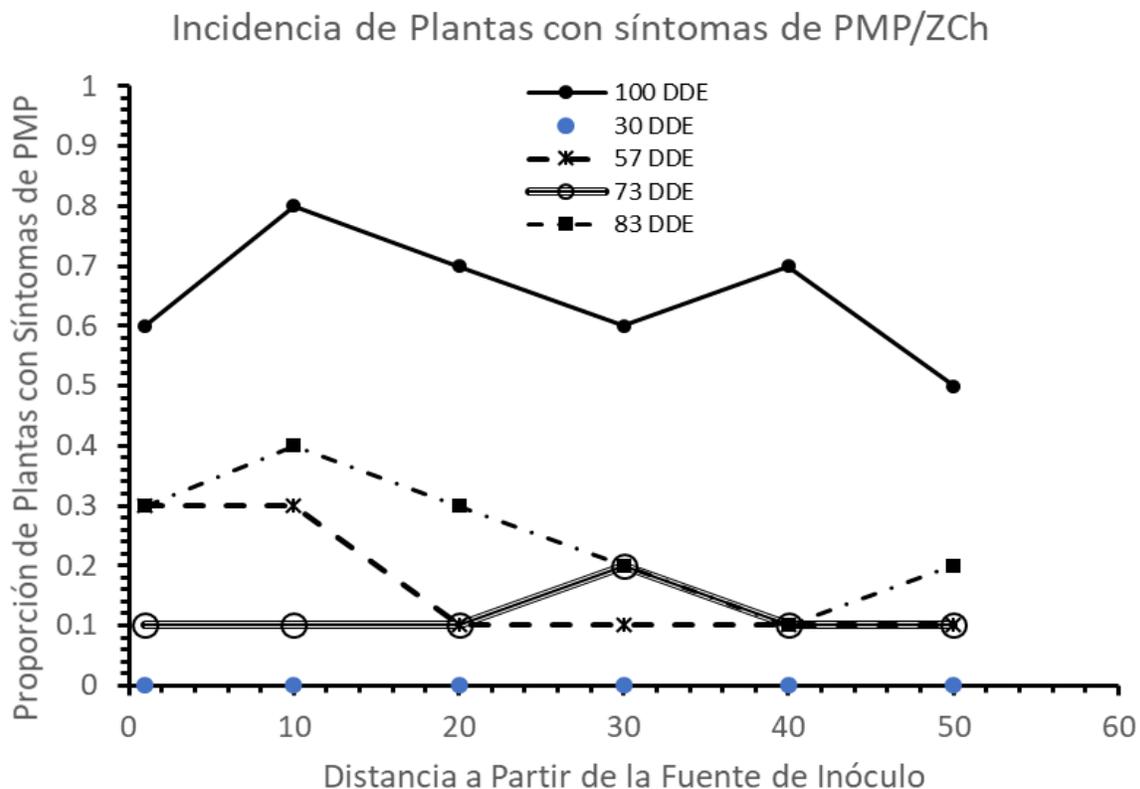


Figura 3. Incidencia de PMP/ZCh en la parcela experimental donde se utilizó como fuente de inóculo a la maleza *Licium berlandieri* infectada con *Ca. Liberibacter solanacearum*.

Período de incubación. Las primeras plantas enfermas sintomáticas se observaron 30 días después de la emergencia (DDE). Las plantas provenientes de minitubérculos sanos estuvieron expuestas a la fuente de inóculo desde su emergencia, y a los vectores psílicos (*Bactericera cockereli*) y chicharritas (*Emmpoasca sp* y *Macrosteles sp*) que transmiten a *Ca. Phytoplasma* y *Ca. Liberibacter* (Flores-Olivas y Lira-Saldivar 2008) (Figura 4 A y B). La parcela experimental fue inspeccionada extensivamente 7 días antes de la primera detección, por lo tanto, podemos afirmar que el período de

incubación de la enfermedad en campo es de 23 a 30 días, cuando las infecciones ocurren poco tiempo después de la emergencia. Otros autores han reportado un período de incubación de 26 d en ensayos de invernadero (Salas-Marina *et al.*, 2006). Esto implica que las estrategias de control deben ser preventivas, evitando las infecciones y no deben estar basadas en la detección de la enfermedad en campo. Cuando los síntomas se manifiestan, muchas otras plantas ya están infectadas y solo pueden detectarse analizándolas por PCR. Al comparar el gradiente de enfermedad con el de infección (Figura 1) podemos ver que entre 10 a 20% de las plantas infectadas (gradiente de infección) no muestra síntomas de la enfermedad (gradiente de enfermedad).

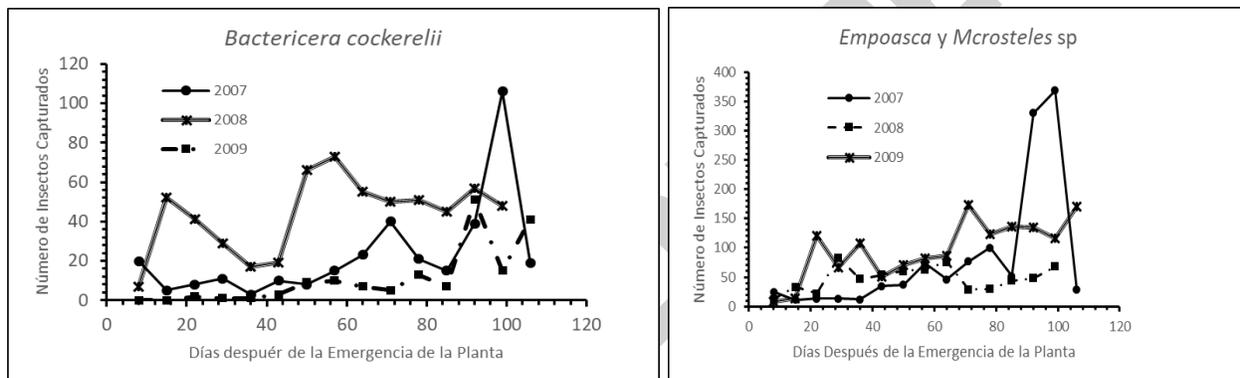


Figura 4. Dinámica poblacional de *Bactericera cockerelli* y de chicharritas *Empoasca sp* y *Macrostelles sp* vectores de la PMP/ZCh en los ciclos de cultivo 2007-2009.

Presencia de insectos vectores. Los vectores de la PMP/ZCh (*Bactericera cockerelli*, *Empoasca sp.* y *Macrostelles sp.*), se detectaron durante el desarrollo de los experimentos de gradiente (Figuras 4A y 4B). Es decir, en estos experimentos, existieron poblaciones de vectores que permitieron determinar si la semilla tubérculo y la arvense “cilindrillo” infectadas con Ca. Phytoplasma y Ca. Liberibacter podía provocar un gradiente de enfermedad y por lo tanto tener evidencia de su importancia como fuentes de inóculo, comparadas con otras posibles fuentes de inóculo no incluidas en el diseño. En este último caso no se detectaría un gradiente, pero si plantas enfermas de PMP/ZCh, como sucedió en el ciclo 2009; es decir hubo condiciones para demostrar que el cilindrillo, a pesar de estar infectado con Ca. Liberibacter no funcionó como una

FI y por lo tanto las fuentes de inóculo fuera de la parcela experimental sirvieron de fuente para que los vectores presentes en el área transmitieran al patógeno y causaran síntomas.

Diagnóstico por PCR. En las diferentes muestras de plantas de papa con síntomas de PMP/ZCh se amplificaron fragmentos del DNA de *Ca. Phytoplasma* y de *Ca. Liberibacter*. En el caso de *Ca. Liberibacter* se amplificó un fragmento de un tamaño aproximado de 1450 pb, en *Candidatus Liberibacter*, se amplificaron 3 fragmentos de un tamaño aproximado de 400, 662 y 918 pb, no se observó amplificación en los testigos negativos (Figuras 5A y 5B).

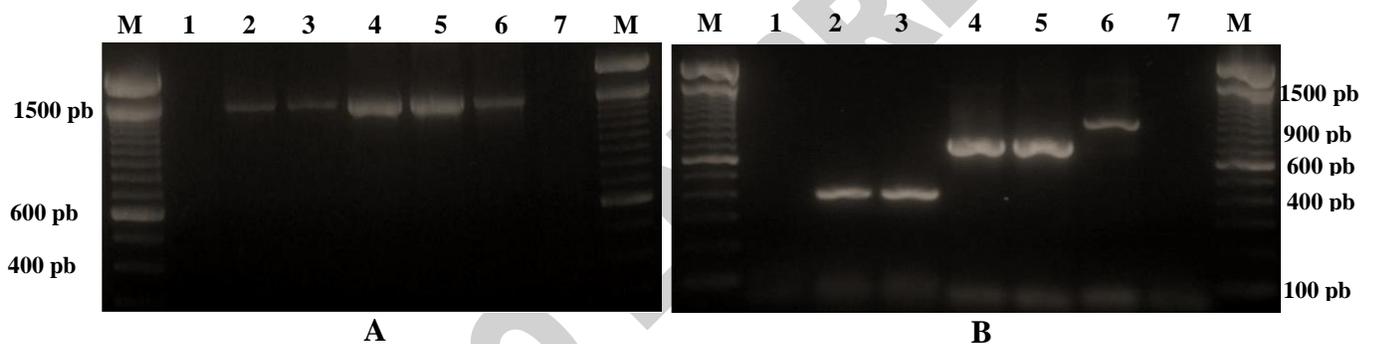


Figura 5. Fragmentos del DNA del fitoplasma PMP y la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* amplificados a partir del DNA extraído de plantas de papa con síntomas de Punta Morada de la Papa/Zebra Chip. A) Fragmentos del DNA de *Ca. Phytoplasma*, amplificados por Nested-PCR utilizando los iniciadores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

PCR para *Candidatus Liberibacter* spp. La secuencia obtenida en este trabajo presentó el 100% de máxima identidad con la secuencia del gen 16S ribosomal reportada para *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Los datos anteriores fueron corroborados con el árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del fragmento amplificado por PCR y su comparación con diferentes secuencias reportadas en el banco de genes (Figura 6). Con los datos presentados anteriormente se puede establecer que la bacteria que actúa como uno de los agentes causales de la PMP/ZCh en las regiones paperas de Coahuila y Nuevo León es *Candidatus Liberibacter*

solanacearum. Estos resultados coincidiendo con lo reportado por Secor *et al.* (2009) y es probable que esta bacteria sea la que se encuentra infectando a otras Solanáceas en la misma región como el tomate de cáscara (Cazáres *et al.*, 2011). Hansen *et al.* (2008), asociaron a la sintomatología del amarillamiento del psílido a la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllauros*

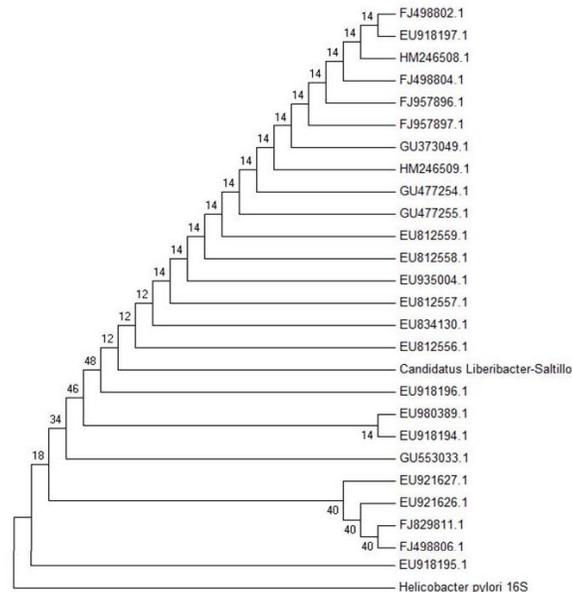


Figura 6. Árbol filogenético generado con la comparación de la secuencia del gen ribosomal 16S de *Candidatus Liberibacter*, colectada en Saltillo, Coahuila, México y secuencias reportadas en la base datos del National Center for Biotechnology Information.

Pérdidas causadas por PMP/ZCh. En el ciclo 2007, se observó que el rendimiento se incrementó y la incidencia se redujo conforme se aumentó la distancia a partir de la FI (Figura 7A); es el gradiente de enfermedad se reflejó directamente en el rendimiento del cultivo. Por lo tanto, las estrategias de manejo que reduzcan la incidencia de la enfermedad seguramente tendrán un impacto significativo en el rendimiento del cultivo. El gradiente de enfermedad y las diferentes distancias y fechas en las que se presentaron los primeros síntomas de PMP/ZCh permitieron cosechar plantas que se infectaron a los 30, 57 y 73 o más DDE. La regresión entre el rendimiento y la edad de la planta en la que mostro los primeros síntomas permitió identificar: a) que las plantas en las que los síntomas iniciaron a los 73 DDE tuvieron un rendimiento de 23,198 kg/ha,

rendimientos muy cercanos a los obtenidos de plantas sin síntomas durante todo el ciclo que presentaron un rendimiento de 24,622 kg/ha. Esta es una información valiosa para el diseño de las estrategias de manejo ya que indica que un de los componentes debe ser proteger intensivamente durante los primeros 43 DDE, y a que, de acuerdo a los resultados experimentales, las plantas que se infectan a los 40 DDE mostrarán síntomas a los 63-70 DDE y en este caso las pérdidas son menores al 10% (Figura 7B). El manejo fitosanitario del cultivo puede ser crítico en las primeras semanas cuando la PMP/ZCh puede reducir el 40% del rendimiento.

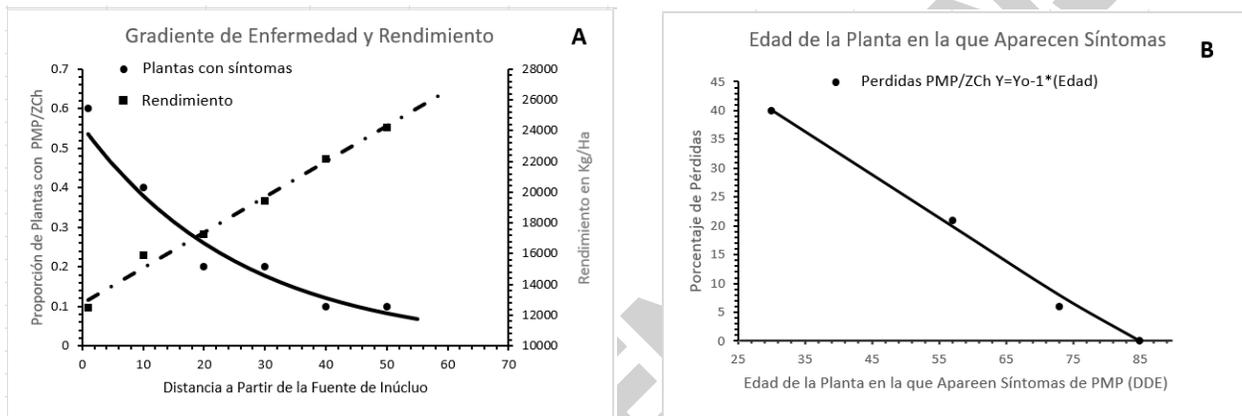


Figura 7. A) Relación entre la distancia a partir de la fuente de inóculo en el gradiente de enfermedad PMP/ZCh 57 DDE y el rendimiento a los 100 DDE. B). Relación entre el tiempo de aparición de síntomas y el rendimiento de papa var. Gigant

Conclusiones

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

Referencias

Albanese, G. D., Urso V., Granata, G. and Colladoro, S. 1997. Individuazione di un fitoplasma in esemplari di *Psamotettix striatus* catturati in vigneti. Inform. Fitopathol. 7/8:57-60.

- Almeyda-León, I.H., Sánchez-Salas, J.A. and Garzón-Tiznado J.A. 2004. Detección molecular de fitoplasmas en papa. *In*: Flores, O. A.; Gallegos, M. G. and García, M. O. (eds.). Memorias de Simposio Punta Morada de la Papa. pp. 4-14.
- Almeyda-León, I.H., Sánchez-Salas, J.A. and Garzón-Tiznado JA. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica en México* 34:141-150. <http://www.redalyc.org/html/608/60834201/>
- Almeyda-León, I.H., Cázares-Alonso, N.P., Rubio-Covarrubias, O. and Villavicencio-Gutiérrez E.E. 2009. Detección de *Candidatus Liberibacter psyllauros* en papa con síntomas de punta morada. *En*: Memorias del XI Congreso Internacional / XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Acapulco, Guerrero, México. Resumen Corto, C-81.
- Berger, R.D. and Luke, H.H. 1979. Spatial and temporal spread of oat crown rust. *Phytopathology* 69:1199-1201. doi: 10.1094/Phyto-69-1199
- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Rebollar-Alviter, A., Aranda-Ocampo, S. and Suárez-Espinosa, J. (2016). Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*. DOI: 10.5154/r.rchsh.2015.09.021
- Campbell, C.L. and Madden, L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, NY. 532 pp. <https://www.amazon.com/Introduction-Plant-Disease-Epidemiology-Campbell/dp/0471832367>
- Cazares-Alonso, N.P., Almeyda-León, I.H. and Parga-Torres, V.M. 2011. Asociación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en papa *Solanum tuberosum* L. y tomate de cáscara *Physalis* spp., en Nuevo León y Coahuila, México. *En*: Memorias del XIII Congreso Internacional / XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Tlaxcala, Tlaxcala, México. Resumen Corto, C-53.
- CESAVECO. 2009. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Coahuila A.C. "Informe Anual del Monitoreo de insectos vectores de fitoplasma de punta morada de la papa de la región papera de Coahuila y Nuevo León, dentro de la "Campaña Manejo Fitosanitario de Hortalizas" 32 p.
- Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Mori, N., Murari, E., Posenato, G. and Girolami, V. 1996. Detection and molecular characterization of phytoplasmas in the planthopper *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera: Flatidae). *Phytopathology Mediterranea* 35:62–75. <http://www.jstor.org/stable/42685242>
- Flores-Olivas, A. and Lira-Saldivar, H. 2008. Detección, diagnóstico y manejo de la punta morada de la papa. UAAAN. Ediciones Parnaso. Málaga, España. 135 p.

- Gundersen, D.E. and Lee, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144 - 151. <http://www.jstor.org/stable/42685262>
- Hansen, A.K., Trumble, J.T., Stouthamer, R. and Paine, T.D. 2008. A new huanglongbing species, "*Candidatus Liberibacter psyllauros*," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5862–5865. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01268-08>.
- Henne, D.C., Workneh, F., Wen, A., Price, J.A., Pasche, J.S., Gudmestad, N.C. and Rush, C.M. 2010. Characterization and epidemiological significance of potato plants grown from seed tubers affected by Zebra Chip disease. *Plant Disease* 94:659-665. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0659>.
- Lee, I.M., Bottner, K.D., Secor, G.A. and Viviana, R.V. 2006. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1593–1597. doi: 10.1099/ijs.0.64251-0.
- Lee, I.M., Bottner, K.D., Munyaneza, J.E., Secor, G.A. and Gudmestad, N.C. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease* 88: 429. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.4.429B>.
- Leyva-López, N.E., Ochoa-Sánchez, J.C., Leal-Klevezas, D.S. and Martínez-Soriano, J.P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal Microbiology* 48:1062–1068. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w02-109#>
- Munyaneza, J.E., Crosslin, J.M. and Upton, J.E. 2006. The beet leafhopper (Hemiptera: *Cicadellidae*) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. *Journal of Economic Entomology* 99: 268-272. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493-99.2.268>
- Munyaneza, J.E., Crosslin, J.M. and Upton, J.E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip", a new potato disease in southwestern United States potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100: 656-663. <https://doi.org/10.1093/jee/100.3.656>
- Munyaneza, J.E., Buchman, J.L., Upton, J.E., Goolsby, J., Crosslin, J., Bester, G., Miles, G.P. and Sengoda, V.G. 2008. Impact of different potato psyllid populations on zebra chip

- disease incidence, severity, and potato yield. *Subtropical Plant Science* 60:27-37.
<https://naldc.nal.usda.gov/download/41738/PDF>
- Munyaneza, J.E., Sengoda, V.G., Crosslin, J.M., De la Rosa-Lozano, G. and Sánchez, A. 2009. First report of '*Candidatus Liberibacter psyllae*' in potato tubers with Zebra Chip disease in Mexico. *Plant Disease* 93:552. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0552A>
- Munyaneza, J.E., Buchman, J.L., Heilman, B.E., Sengoda, V.G. and Henne, D.C. 2011. Effects of zebra chip and potato psyllid on potato seed quality, pp. 37–40. In *Proceedings of the 11th Annual Zebra Chip Reporting Session*, ed. F. Workneh, A Rashed, and C.M. Rush. San Antonio, TX (November 6–9, 2011).
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12:357-358.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357>
- Salas-Marina, M.A., Flores-Olivas, A., Sánchez-Arizpe, A., García-Martínez, O., Almeyda-León, I.H. and Garzón-Tiznado, J.A. 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de Fitoplasmas de la punta morada de la papa, pp. O-1. In Memoria de XXII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa, 30 Julio - 4 Agosto 2006. ALAP, Toluca, México.
- Secor, G.A., Rivera, V.V., Abad, J.A., Lee, I.M., Clover, G.R.G., Liefing, L.W., Li, X. and De Boer, S.H. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93:574-583. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0574>
- 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. <http://aem.asm.org/content/62/8/2988.abstract>
- Van der Plank, J.E. 1963. *Plant diseases: Epidemics and control*. Academic Press. New York. 349 p. <http://trove.nla.gov.au/version/218534207>
- Zavala-Quintana, T.E. 2002. Experiencias en el Valle de Toluca sobre Punta Morada. Memorias del XI Congreso Nacional de la Papa. León Guanajuato, México. pp. 81-97.