

## RELACIÓN ENTRE *Bactericera cockerelli* Y PRESENCIA DE *Candidatus Liberibacter psyllauros* EN LOTES COMERCIALES DE PAPA\*

### RELATION BETWEEN *Bactericera cockerelli* AND PRESENCE OF *Candidatus Liberibacter psyllauros* IN COMMERCIAL FIELDS OF POTATO

Oswaldo Ángel Rubio-Covarrubias<sup>1§</sup>, Isidro Humberto Almeyda-León<sup>2</sup>, Mateo Armando Cadena-Hinojosa<sup>3</sup> y René Lobato-Sánchez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Conjunto SEDAGRO. INIFAP. Metepec, Estado de México. C. P. 52140. Tel. 01 722 2320089. <sup>2</sup>Campo Experimental General Terán. INIFAP. Carretera Montemorelos-China, km 31. Colonia Ex-Hacienda las Anacuas, General Terán, Nuevo León, C. P. 67413. Tel. 01 826 2670260. (almeyda.isidro@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Carretera Los Reyes-Textoco, km 13.5. Coatlínchán, Textoco, Estado de México, C. P. 56250. Tel. 01 595 9212637. (cadena.mateo@inifap.gob.mx). <sup>4</sup>Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac 8532. Colonia Progreso. Jiutepec, Morelos. C. P. 62550. Tel. 01 777 3293600. (rlobato@tlaloc.imta.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: rubio.oswaldo@inifap.gob.mx.

#### RESUMEN

La brotación anormal de los tubérculos (sin brotes o brotes ahilados) y el pardeamiento interno de los tubérculos, son síntomas de una enfermedad que está afectando la producción de papa en México, en el suroeste de Estados Unidos y América central. Esta enfermedad ha sido asociada con el psilido de la papa *Bactericera cockerelli* Sulc. Con el objetivo de dilucidar las causas de esta enfermedad, en 2007 se llevó a cabo un muestreo en 11 lotes comerciales de papa localizados en un transecto altitudinal entre 2 600 y 3 500 m en la región productora de papa de Toluca. La población de *B. cockerelli* fue determinada mediante muestreos semanales de los insectos adultos atrapados en trampas amarillas pegajosas. Al final del periodo de crecimiento del cultivo, los tubérculos producidos en cada lote fueron muestreados y almacenados por 6 meses. Después de este tiempo, se determinó el porcentaje de tubérculos con brotación anormal y se hicieron análisis con PCR para determinar la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllauros* y de fitoplasmas en los tubérculos. Los resultados indican que la población de *B. cockerelli* y de los síntomas de la punta morada de la papa disminuyeron con la altura, en alturas superiores a

#### ABSTRACT

The abnormal sprouting of tubers (without sprouts or with threadlike sprouts) and the internal browning of the potatoes are symptoms of a disease which is affecting the potato production in Mexico, in southwestern United States and Central America. This disease has been associated with the psyllid of the potato *Bactericera cockerelli* Sulc. With the purpose of clarifying the causes of this disease, samples were taken in 11 commercial batches of potato in an altitudinal transect between 2 600 and 3 500 m the potato producing area of Toluca in 2007. The population of *B. cockerelli* was determined using weekly samples of the adult insects caught in sticky yellow traps. At the end of the crop's growth period, the tubers produced in each batch were sampled and stored for six months. After this time, the percentage of tubers with abnormal sprouts was established and analyses were carried out with PCR to determine the presence of *Candidatus Liberibacter psyllauros* and of phytoplasm in the tubers. The results indicate that the population of *B. cockerelli* and of the symptoms of the potato purple-tip decreased with height. In heights above 3 200 masl,

\* Recibido: julio de 2010  
Aceptado: enero de 2011

3 200 msnm no se presentaron problemas significativas de la enfermedad. El 36% de los tubérculos con brotes finos presentó el pardeamiento interno y 58% de los tubérculos sin brotes presentó el mismo síntoma. El 54% de los tubérculos con brotación anormal fue positivo a *Candidatus Liberibacter psyllaourous* y sólo 3.5% a fitoplasmas. Estos resultados indican que *Candidatus Liberibacter psyllaourous* está asociada con los síntomas de la punta morada de la papa en la región de Toluca.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*, manchado interno de los tuberculos, psilido de la papa.

## INTRODUCCIÓN

Los síntomas de la enfermedad conocida como punta morada de la papa (PMP) en México son similares a “Zebra Chip” en los Estados Unidos y han sido reportados en diferentes países como: México (Rubio *et al.*, 2006), Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2008), el noroeste de los Estados Unidos y en Centroamérica (Munyaneza *et al.*, 2007; Munyaneza *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009). Los síntomas de la PMP se caracterizan por un achaparramiento de la planta, abultamiento del tallo en los lugares de inserción de las hojas, formación de tubérculos aéreos y las hojas superiores tienden a adquirir una coloración morada en algunas variedades. Los tubérculos provenientes de plantas con síntomas de PMP desarrollan un pardeamiento interno y generalmente no brotan, o si lo hacen, sus brotes son muy delgados o ahilados.

El manchado interno de los tubérculos en forma de estrías se intensifica después de freír los tubérculos, este patrón de coloración es lo que ha conducido a que la enfermedad se denomine “Zebra Chip” en los Estados Unidos de América. Se ha demostrado que los síntomas descritos previamente pueden estar asociados con la presencia de fitoplasmas (Almeyda *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2003; Maramorosch, 1998) y también pueden ser provocados por la infección de una bacteria, cuyo nombres propuestos son *Candidatus Liberibacter psyllaourous* (Hansen *et al.*, 2008) y *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Liefting *et al.*, 2008).

El uso de técnicas moleculares para el estudio de fitoplasmas ha permitido distinguir siete diferentes tipos de fitoplasmas asociados con la PMP en Estados Unidos de América, Japón y Malasia (Okuda *et al.*, 1997). En México se ha detectado la presencia de al menos dos tipos de fitoplasmas

no significant problems related to the disease showed up. Of the potatoes with fine sprouts, 36% displayed internal browning and 58% of the tubers without sprouts displayed the same symptom; 54% of tubers with abnormal sprouting were positive for *Candidatus Liberibacter psyllaourous* and only 3.5% presented phytoplasm. These results indicate that *Candidatus Liberibacter psyllaourous* related to the potato purple-tip symptoms in the Toluca area.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, internal stained of the tubers, potato psilid.

## INTRODUCTION

The symptoms of the disease known as potato purple-tip (PMP) in Mexico are similar to the “Zebra Chip” in the United States of America (USA) and have been reported in different countries such as Mexico (Rubio *et al.*, 2006), New Zealand (Liefting *et al.*, 2008), in northwestern United States and in Central America (Munyaneza *et al.*, 2007; Munyaneza *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009). The symptoms of PMP include plant stunt, bulging of the stem in areas of leaf insertions, formation of aerial tubers and the top leaves tend to turn purple in some varieties. The tubers from plants with PMP symptoms acquire an internal browning and generally do not sprout, or if they do, the sprouts are very thin or threadlike.

The internal stains of the tubers in the shape of striations intensify after frying the tubers. This color pattern is what has led the disease to become known as “Zebra Chip” in the USA. It has been proven that the symptoms described above can be related to the presence of phytoplasmas (Almeyda *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2003; Maramorosch, 1998) and can also be caused by the infection of a bacteria whose proposed names are *Candidatus Liberibacter psyllaourous* (Hansen *et al.*, 2008) and *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Liefting *et al.*, 2008).

The use of molecular techniques for the study of phytoplasmas has helped identify seven different types of phytoplasmas related to PMP in the USA, Japan and Malaysia (Okuda *et al.*, 1997). In Mexico, at least two types of phytoplasmas have been found related to PMP (Almeyda *et al.*, 1999; Leyva *et al.*, 2002). Some the

relacionados con la PMP (Almeyda *et al.*, 1999; Leyva *et al.*, 2002). Algunos de los síntomas como el achaparramiento de la planta, abultamiento del tallo en los lugares de inserción de las hojas, la formación de tubérculos aéreos y el amarillamiento de las hojas superiores, también se ha atribuido al efecto de una posible toxina inyectada a las plantas por el psilido de la papa *Bactericera cockerelli* Sulc. (*Hemiptera: Triozidae*) antes conocida como *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Arslan *et al.*, 1985; Cranshaw, 1993). Sin embargo, dicha “toxina” nunca ha sido aislada.

La presencia en México de la PMP fue registrada desde 1947 en una fotografía tomada por Niederhauser en la variedad Up-to date en un lote comercial de papa en Silao, Guanajuato [archivo fotográfico del programa nacional de papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el Sitio Experimental Metepec]. Sin embargo, fue hasta el inicio de la década de los 90's cuando el problema se observó de manera continua en la región de Saltillo, Coahuila y en los dos años siguientes también se observó en forma extensiva en lotes comerciales de papa en los estados de Guanajuato, México, Puebla y Tlaxcala. Con base en los reportes de la literatura, en aquel tiempo se creyó que el agente causal de la enfermedad era un fitoplasma transmitido por chicharritas; sin embargo, también se observaron en las mismas regiones altas poblaciones del psilido de la papa (*Bactericera cockerelli*, Sulc). La presencia de *B. cockerelli* en México fue reportada en 1941 (Caldwell, 1941), siendo hasta 1960 cuando se consideró como una plaga en los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum* spp.) (Garzón *et al.*, 1992), sin saber a ciencia cierta su relación con la punta morada de la papa.

En 2001 se realizó un muestreo de plantas que presentaban los síntomas de la punta morada en las principales regiones productoras de papa en México y al mismo tiempo se monitorearon las poblaciones de *B. cockerelli* (Rubio *et al.*, 2006). El estudio reveló que 34% de las muestras fueron positivas a fitoplasmas determinados con PCR y que la magnitud del problema de PMP era mayor en los lugares con mayores poblaciones de *B. cockerelli*. Estos resultados sugirieron que podría haber otras causas de la enfermedad. En 2008 se publicó un estudio en donde se demuestra que *B. cockerelli* es vector de una bacteria del género *Candidatus Liberibacter psyllae*, la cual se relaciona con los síntomas de la enfermedad conocida como “Zebra Chip” en los Estados Unidos de América (Hansen *et al.*, 2008).

symptoms, such as plant stunt, bulging of the stem in areas of leaf insertions, formation of aerial tubers and the yellowing of top leaves. It has also been attributed to the effect of a possible toxin injected in the plants by the psyllid of the potato *Bactericera cockerelli* Sulc. (*Hemiptera: Triozidae*) formerly known as *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Arslan *et al.*, 1985; Cranshaw, 1993). However, such a “toxin” has never been isolated.

The presence of PMP in Mexico was recorded in 1947 in a photograph taken by Niederhauser in the variety Up-to date in a commercial batch in Silao, Guanajuato [photographic archive of the national potato program of the National Forestry, Agriculture and Livestock Research Institute (INIFAP) in the Metepec Experimental Station]. However, in the early 1990's the problem was observed continuously in the area of Saltillo, Coahuila and in the next two years, it was also noticed extensively in the States of Guanajuato, Mexico, Puebla and Tlaxcala. Based on reports in literature, in that time it was believed that the causing agent of the disease was a phytoplasma transmitted by cicadas, although in the same highlands, potato psyllids (*Bactericera cockerelli*, Sulc.) were also found. The presence of *B. cockerelli* in Mexico was reported in 1941 (Caldwell, 1941), and not until 1960 did it become considered a plague in tomato (*Solanum lycopersicum*) and chili pepper (*Capsicum* spp.) plantations (Garzón *et al.*, 1992), uncertain of its relation with the potato purple-tip.

In 2001, samples were taken of plants with the symptoms of purple tip in the main potato-producing areas in Mexico, and at the same time populations of *B. cockerelli* were being monitored (Rubio *et al.*, 2006). The study showed that 34% of the samples were positive for certain phytoplasmas with PCR, and that the dimension of the problem of PMP was greater in places with larger *B. cockerelli* populations. These results suggested that there could be other causes for the disease. A paper was published in 2008 showing that *B. cockerelli* is the vector for bacteria of the genus *Candidatus Liberibacter psyllae*, which is related to the symptoms of the disease known as “Zebra Chip” in the USA (Hansen *et al.*, 2008).

In that same year in New Zealand, Liefting *et al.* (2008) showed that *Candidatus Liberibacter solanacearum* is related to the symptoms of internal staining in potatoes, but the two phytoplasmas reported previously by

En este mismo año en Nueva Zelanda, Liefting *et al.* (2008) demostraron que *Candidatus Liberibacter solanacearum* está asociado con los síntomas de manchado interno de los tubérculos, pero no se encontraron los dos fitoplasmas reportados previamente por Secor *et al.* (2006). Posteriormente se demostró que *Candidatus Liberibacter solanacearum* también afecta a los cultivos de chile y tomate en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2009a). En México, recientemente se ha confirmado la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los cultivos de tomate (Munyanza *et al.*, 2009a), chile (Munyanza *et al.*, 2009b) y en tubérculos de papa procedentes de Saltillo, Coahuila, con el síntoma de pardeamiento interno (Secor *et al.*, 2009). La presencia de *Candidatus Liberibacter psyllauros* también ha sido reportada en tubérculos procedentes de Saltillo, Coahuila. (Munyanza *et al.*, 2009c). Secor *et al.* (2009) observaron que la secuencia de los fragmentos 16rRNA de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y de *Candidatus Liberibacter psyllauros* son idénticos, por lo que consideran que los dos nombres son sinónimos.

La necesidad de confirmar la etiología de “Zebra Chip” ha motivado estudios de algunos investigadores. En trabajos recientes, Secor *et al.* (2009) y Crosslin y Munyanza (2009) corroboraron que *B. cockerelli* es transmisor de *Candidatus Liberibacter* y que además el patógeno puede ser transmitido por injerto. En contraste con los estudios que han definido a *Candidatus Liberibacter* como el agente causal de “Zebra Chip”, Lee *et al.* (2009) atribuyen a los fitoplasmas los síntomas de la PMP. Estos investigadores reportan la detección de fitoplasmas de un nuevo subgrupo (16Sr-III-M) en plantas y tubérculos que presentaban los síntomas de la PMP en un lote de papa en Montana. Liefting *et al.* (2009b) realizaron análisis de *Candidatus Liberibacter* y de fitoplasmas en diferentes partes de plantas con los síntomas de PMP y reportaron una infección mixta de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y *Candidatus Phytoplasma australiense* en lotes comerciales de papa en Nueva Zelanda. Estos resultados demuestran que en algunos lugares los dos presuntos agentes causales del complejo de síntomas de la PMP, *Candidatus Liberibacter* y fitoplasmas, pueden estar asociados.

La mayor parte de la información disponible sobre la PMP ha sido generada en países con condiciones climáticas y agronómicas diferentes a las que tenemos en México; sin embargo, la poca información disponible indica que probablemente el o los agentes causales y su(s) vector(es) sean los mismos. Las muestras de papa en que se ha detectado la presencia de *Candidatus Liberibacter* provienen de la

Secor *et al.* (2006) were not found. It was later proven that *Candidatus Liberibacter solanacearum* also affects plantations of chili peppers and tomatoes in New Zealand (Liefting *et al.*, 2009a). The presence of *Candidatus Liberibacter solanacearum* has recently been confirmed in Mexico in tomato (Munyanza *et al.*, 2009a) and chili plantations (Munyanza *et al.*, 2009b) and in potato tubers from Saltillo, Coahuila, with the internal browning symptom (Secor *et al.*, 2009). *Candidatus Liberibacter psyllauros* has also been reported in potatoes from Saltillo, Coahuila. (Munyanza *et al.*, 2009c). Secor *et al.* (2009) observed that the sequence of fragments 16rRNA of *Candidatus Liberibacter solanacearum* and of *Candidatus Liberibacter psyllauros* are identical, therefore both names are considered synonyms.

The need to confirm the etiology of ‘Zebra Chip’ has motivated studies by researchers. In recent studies, Secor *et al.* (2009); Crosslin and Munyanza (2009) corroborated that *B. cockerelli* is a transmitter of *Candidatus Liberibacter*, and that the pathogen can be transmitted by grafting. In contrast to the studies that have defined *Candidatus Liberibacter* as the causing agent of ‘Zebra Chip’, Lee *et al.* (2009) attribute the symptoms of PMP to phytoplasmas. These researchers report the finding of phytoplasmas of a new group (16Sr-III-M) in plants and tubers with PMP symptoms in a potato batch in Montana. Liefting *et al.* (2009b) tested for *Candidatus Liberibacter* and phytoplasmas in different parts of plants with PMP symptoms, and they reported a mixed infection of *Candidatus Liberibacter solanacearum* and *Candidatus Phytoplasma australiense* in the commercial potato batches in New Zealand. These results show that in some places, the two alleged causing agents of the complex of PMP symptoms, *Candidatus Liberibacter* and phytoplasmas, could be related.

Most of the information available on PMP has been created in countries with different weather and farming conditions to the ones in Mexico. However, the scarce information available indicates that the causing agent(s) and its vector(s) may be the same one(s). The potato samples in which *Candidatus Liberibacter* has been found come from the potato-producing area in Saltillo, Coahuila (Munyanza *et al.*, 2009c; Secor *et al.*, 2009), but whether this pathogen is present in other areas of Mexico, is unknown. The aim of this study is to provide evidence on the causing agent of PMP symptoms in the



región productora de papa de Saltillo, Coahuila (Munyanza *et al.*, 2009c; Secor *et al.*, 2009), pero se desconoce si éste patógeno está presente en otras regiones de México. El presente estudio tiene como objetivo aportar evidencias sobre el agente causal de los síntomas de la PMP en la región productora de papa de Toluca, México y determinar su asociación con el psilido de la papa (*Bactericera cockerelli* Sulc.) como vector.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En 2007 se realizó el monitoreo de insectos y muestreo de tubérculos en 11 lotes comerciales de papa y en 2008 se evaluó la brotación y el manchado de los tubérculos que se cosecharon el año anterior. Los lotes se seleccionaron por su accesibilidad y por su altitud para muestrear todo el rango de altura en el que se siembra la papa en la región de Toluca, la cual incluye el valle y áreas cercanas al volcán Nevado de Toluca. En el Cuadro 1 se presenta la ubicación, altitud, temperatura media anual y variedades de papa muestreadas en cada sitio. La información climatológica se obtuvo de la base de datos ERIC III (IMTA, 2005), en la cual se disponía de los datos climatológicos de 3 sitios, con los cuales se calculó que la temperatura media anual se incrementaba 0.62 °C por cada 100 m de altura y con este dato se calcularon los datos faltantes en el resto de los sitios muestreados.

potato farming area in Toluca, Mexico, and to determine its relation with the potato psyllid (*Bactericera cockerelli* Sulc.) as a vector.

## MATERIALS AND METHODS

In 2007, insects were monitored and tubers sampled in 11 commercial potato batches and in 2008, the sprouts and stains were evaluated in tubers harvested the previous year. The batches were chosen for their accessibility and their altitude, to show the entire range of altitudes in which potato is grown in the Toluca area, including the valley and areas near the Nevado de Toluca volcano. Table 1 shows the location, altitude, average yearly temperature and varieties of potato sampled in each site. Weather information was taken from the ERIC III (IMTA, 2005) data base, which contained the weather information for three sites, used to calculate that the average yearly temperature rose 0.62 °C every 100 masl, and this was used to calculate the missing data in the rest of the sites sampled.

The agricultural handling of each batch was in accordance to the criteria of each farmer. In general, all farmers sprayed fungicides and insecticides every one to two

**Cuadro 1. Altitud, ubicación y variedades de papa muestreadas en cada sitio de estudio.**

**Table 1. Altitude, location and varieties of potato sampled in each site studied.**

Comunidad	Municipio	Altitud (m)	Longitud (W)	Latitud (N)	Variedades	Temperatura media anual (°C)
Raíces I	Zinacantepec	3 456	99° 47' 53.74"	19° 9' 59.78"	Alpha y Malinche	7.78
Raíces II	Zinacantepec	3 424	99° 49' 1.30"	19° 9' 8.08"	Alpha	7.98
Loma Alta	Zinacantepec	3 426	99° 48' 54.44"	19° 10' 49.77"	R15	7.97
La Puerta I	Zinacantepec	3 336	99° 48' 32.39"	19° 11' 16.58"	Tollocan y R15	8.53
La Puerta II	Zinacantepec	3 238	99° 48' 30.01"	19° 11' 33.41"	Gigant	9.14
Peñuela I	Zinacantepec	3 193	99° 50' 17.55"	19° 9' 22.67"	Alpha	9.41
Peñuela II	Zinacantepec	3 177	99° 50' 24.97"	19° 9' 22.14"	Gigant	9.51
Peñuela III	Zinacantepec	3 004	99° 51' 26.86"	19° 9' 41.48"	Malinche	10.59
Tejalpa	Zinacantepec	2 854	99° 45' 47.40"	19° 15' 18.22"	Gigant y Malinche	11.52
Metepec I	Metepec	2 610	99° 35' 27.82"	19° 14' 35.39"	Malinche y Zafiro	13.03
Metepec II	Metepec	2 609	99° 35' 27.72"	19° 14' 37.21"	Alpha	13.03

El manejo agronómico de cada lote se hizo de acuerdo al criterio de cada agricultor, en general, todos los agricultores aplicaron fungicidas e insecticidas, con una periodicidad que varió de una a dos semanas dependiendo de las condiciones

weeks, depending on the weather conditions, the greatest intensity being in the lower parts and in the rainiest season. Water supply in nine lots depended entirely on the rainfall and in two of them (Peñuelas I and Tejalpa), the potato

climáticas, siendo la mayor intensidad de aplicaciones en las partes bajas y en la época de mayor frecuencia de lluvia. El abastecimiento de agua en nueve lotes dependió únicamente de la precipitación y en dos de ellos (Peñuelas I y Tejalpa) el cultivo de papa se auxilió con riego por gravedad; en estos dos últimos lotes la siembra se hizo en marzo y los otros entre mayo y junio, al inicio del periodo de lluvias. La precipitación media anual durante 2008 fue de 820 mm en esta región.

La población de *B. cockerelli* se monitoreó durante el ciclo vegetativo de la papa mediante la captura de insectos adultos en trampas amarillas pegajosas de 20\*20 cm. En cada lote de papa se delimitó un área de 2 000 m<sup>2</sup>, en la cual se instalaron tres trampas clavadas en estacas de 60 cm de altura. Las trampas se cambiaron cada semana, se hizo el conteo de insectos atrapados y se obtuvo el promedio de las tres trampas por cada sitio.

Al final del ciclo vegetativo se sumaron todos los promedios semanales de cada sitio y este dato representó la población de adultos de *B. cockerelli* en cada área de muestreo. En cada sitio se revisaron las plantas semanalmente y se hicieron observaciones sobre la presencia o ausencia de ninfas. En cuatro de los 11 sitios se muestrearon dos variedades de papa y los datos sobre el tipo de brotación de los tubérculos, porcentaje de tubérculos manchados y el análisis de patógenos obtenidos en cada variedad se tomaron como observaciones independientes.

Al momento de la cosecha, en cada lote se muestrearon al azar, pero dentro del área en donde se tenían las trampas, 200 tubérculos de tamaño medio (8 cm de diámetro), los cuales se conservaron a temperatura ambiente hasta que brotaron, lo cual ocurrió entre cinco y seis meses después de la cosecha. Posteriormente, se contaron los tubérculos que presentaron brotes normales, los que tenían brotes ahilados y los que no brotaron. Los tubérculos que presentaron brotación anormal (ahilados y sin brotes) se partieron y se contaron los que presentaban pardeamiento interno. Por último, se tomó una muestra de 10 tubérculos con brotación anormal de cada sitio y en cada uno de ellos se analizó la presencia de fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter psyllaeus*. Se escogieron los tubérculos para el análisis de los dos patógenos debido a que en ellos se puede apreciar el manchado interno, el cual es el síntoma distintivo de la enfermedad.

La detección de fitoplasmas y de la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllaeus* se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La

plantation was aided by irrigation by gravity. In the two latter, plantations were in March, and the rest in May and June, at the start of the rainy season. Average annual rainfall during 2008 was 820 mm in this region.

The *B. cockerelli* population was monitored during the potato's plant cycle by capturing adult insects in yellow sticky 20\*20 cm traps. An area of 2 000 m<sup>2</sup> was delimited in each potato batch, and in each, three traps were nailed to 60 cm-tall wooden stakes. Traps were changed every week, the insects trapped were counted and an average was taken of the three traps for every site.

At the end of the plant cycle, the weekly averages were added up for each site, and this information represented the adult *B. cockerelli* population in each sampling area. In each site, plants were checked on a weekly basis, and observations were made on the presence or absence of nymphs. In four of the 11 sites, two potato varieties were sampled and data on the type of sprouting of the tubers and the analysis of pathogens obtained in each variety were taken as independent observations.

At the moment of harvesting, 200 medium-sized tubers (8 cm in diameter) were sampled at random, but in the area containing the traps. The samples were kept at room temperature until they sprouted five to six months after harvesting. Then, the tubers with normal sprouts were counted, along with those with threadlike sprouts and those without spouts. The tubers with abnormal sprouts (threadlike or absent) were cut, and those that displayed internal browning were counted. Finally, samples were taken from 10 tubers with abnormal sprouting in each site, and in each one, the presence of phytoplasmas and *Candidatus Liberibacter psyllaeus* was tested for. Tubers were chosen for the analyses of both pathogens since they display internal stains, which is a distinct symptom of the disease.

The search for phytoplasmas and the bacteria *Candidatus Liberibacter psyllaeus* was carried out using the polymerase chain reaction technique (PCR). The DNA extraction was performed using the method reported by Almeyda *et al.* (2001). The phytoplasmas analyzed were the two types related to the PMP reported previously in Mexico (Almeyda *et al.*, 1999; Leyva *et al.*, 2002).

The program used in the PCRs to find phytoplasm was the one reported by Almeyda *et al.* (2008), which consisted of two sets of initiators. In the first amplification cycle, pair P1/P7

extracción del ADN se realizó mediante la metodología reportada por Almeyda *et al.* (2001). Los fitoplasmas que se analizaron fueron los dos tipos asociados con la PMP que han sido reportados previamente en México (Almeyda *et al.*, 1999; Leyva *et al.*, 2002).

El programa utilizado en las PCR's para la detección de fitoplasmas fue el reportado por Almeyda *et al.* (2008), el cual consistió en la utilización de dos juegos de iniciadores, en el primer ciclo de amplificaciones se utilizó el par P1/P7: (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'/5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') y en el segundo ciclo de amplificaciones se utilizó el par de iniciadores R16mF2/R16mR1: (5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'/5'-CTTAACCCCAATCATCGA).

En la detección de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* se utilizaron el par de iniciadores Lp16S-Fragmento 1F/Lp16S-Fragmento 1R: (5'-CTGATCATGGCTCAGAACGA-3'/5'-CGGCGAAAGAGCTTTACAAC-3'), estos iniciadores fueron diseñados sobre la secuencia del gen ribosomal 16S y amplifican un fragmento de un tamaño aproximado de 400 pares de bases (Hansen *et al.*, 2008).

Los datos del número de insectos adultos atrapados durante el ciclo vegetativo del cultivo, la altura de cada sitio y el porcentaje de tubérculos con brotación anormal, se analizaron por medio de regresiones lineales y cuadráticas utilizando el paquete estadístico SAS. Los resultados de los análisis de fitoplasmas y de *Candidatus Liberibacter*, junto con los porcentajes de tubérculos con pardeamiento interno, se analizaron estadísticamente con una prueba de "t" comparando los tubérculos con distintos tipos de brotación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta la relación entre la altitud de cada sitio de muestreo y el número de insectos adultos de *B. cockerelli* atrapados en las trampas pegajosas amarillas. En esta figura se observa que la población de insectos disminuye conforme aumenta la altitud hasta 3 200 m, a alturas superiores la presencia del psilido de la papa fue insignificativa. Estos resultados se explican si se toma en cuenta que este insecto requiere de 356 unidades calor para completar su ciclo de huevo a adulto (Maya *et al.*, 2003), esto considerando que el umbral mínimo para el desarrollo de *B. cockerelli* es de 7 °C.

was used: (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'/5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'), and in the second amplification cycle, the pair of initiators R16mF2/R16mR1 was used: (5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'/5'-CTTAACCCCAATCATCGA).

To search for *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, the pair of indicators used was Lp16S-Fragmento 1F/Lp16S-Fragmento 1R: (5'-CTGATCATGGCTCAGAACGA-3'/5'-CGGCGAAAGAGCTTTACAAC-3'). These were designed on the sequence of the ribosomal gene 16S and amplify a fragment of approximately 400 base pairs (Hansen *et al.*, 2008).

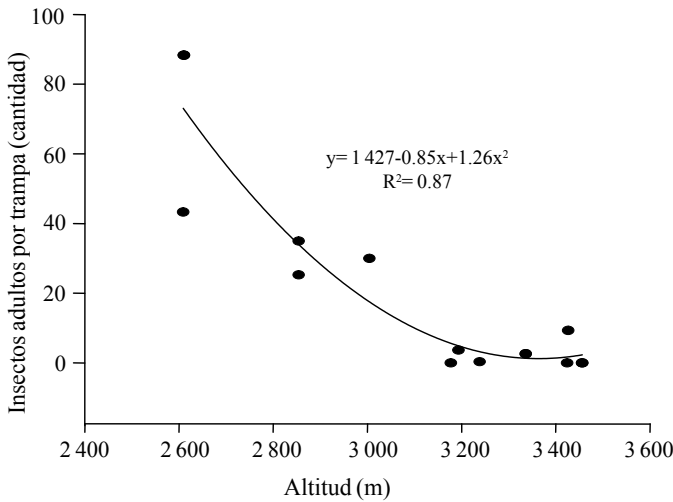
The data on the number of adult insects trapped during the crop's plant cycle, the altitude of each site and the percentage of tubers with abnormal sprouting were analyzed using linear and quadratic regressions using the SAS statistical package. The results of the analyses for phytoplasmas and *Candidatus Liberibacter*, along with the percentage of tubers with internal browning, were analyzed statistically with a "t" test, comparing tubers with different types of sprouts.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the relation between the altitude of each sampling site and the number of adult *B. cockerelli* insects trapped in the sticky yellow traps. This figure displays a reduction in the insect population as the altitude rises to 3 200 m; at greater altitudes, the presence of the potato psyllid was negligible. These results can be explained by the fact that this insect needs 356 calories to complete their cycle from egg to adult (Maya *et al.*, 2003), considering that the minimum threshold for the development of *B. cockerelli* is 7 °C.

Based on the temperature recorded during the crop's growth cycle, it was estimated that in the warmest site (Metepec), there should be 1.8 generations, and in the coldest site (roots) the insect's life cycle should not be completed. When monitoring adult insects and nymphs in an earlier study (Rubio *et al.*, 2006), a rapid increase of the nymph population was observed, which did not correspond with the increase of one initial generation, and suggests a constant migration of *B. cockerelli* adults.

The observations on the presence of nymphs in the plants of each site revealed that only sites above 3 400 masl (Loma Alta, Raíces I and Raíces II) were free of them. Results of



**Figura 1. Relación entre altitud y población de insectos adultos de *Bactericera cockerelli*.**  
**Figure 1. Relation between altitude and adult *Bactericera cockerelli* insect populations.**

Con base en la temperatura registrada durante el periodo de desarrollo del cultivo, se calculó que en el sitio más caliente (Metepec) se deberían tener 1.8 generaciones y en el sitio más frío (raíces) no se debería completar el ciclo del insecto. En el monitoreo de insectos adultos y de ninfas realizado previamente en otro estudio (Rubio *et al.*, 2006), se observó un rápido incremento de la población de ninfas, el cual no correspondió al aumento de una sola generación inicial, lo que sugiere que existe una constante inmigración de adultos de *B. cockerelli*.

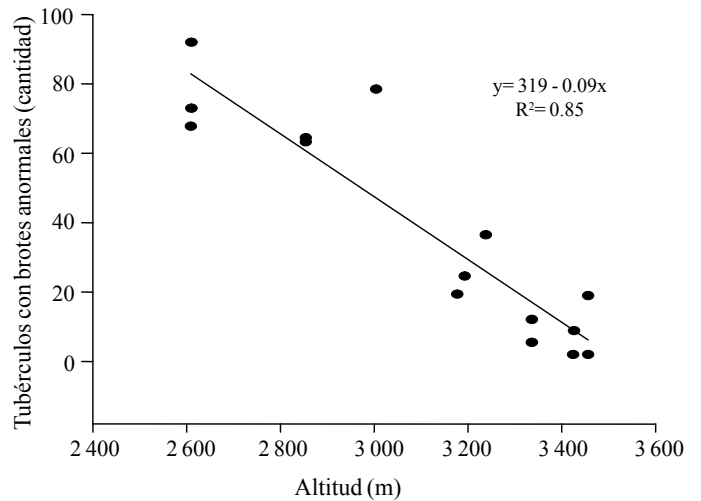
Las observaciones sobre la presencia de ninfas en las plantas de cada sitio, revelaron que solamente los sitios con más de 3 400 msnm (Loma Alta, Raíces I y Raíces II) estuvieron libres de ellas. Los resultados del monitoreo regional de los insectos adultos y la ausencia de ninfas en los lugares más altos, indica que la movilización de los adultos es constante, pero que prefieren las partes más cálidas para establecerse.

El análisis de la Figura 2, indica que el porcentaje de tubérculos con brotes anormales aumenta conforme se incrementa la población de *B. cockerelli*, la cual está en función directa de la altura y por lo tanto es de esperarse que también exista una estrecha relación entre la brotación anormal y la altura como se observa en la Figura 3.

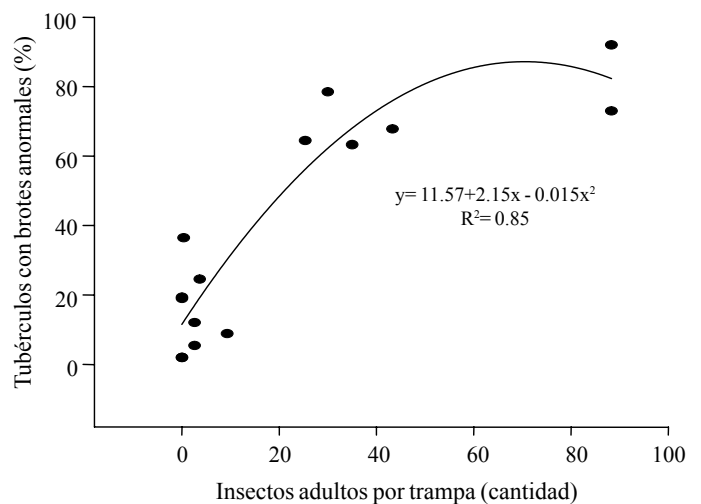
El análisis integral de estas tres figuras nos indica que el psilido de la papa está implicado en la aparición de los síntomas de brotación anormal de los tubérculos. En los primeros

the regional monitoring of the adult insects and the absence of nymphs in higher places indicate that the mobilization of adults is constant, but they prefer to settle in warmer parts.

Figure 2 indicates that the percentage of tubers with abnormal sprouts increases as the population of *B. cockerelli* grows; the latter depends directly on the altitude, and it is therefore also expected to be a wide relation between abnormal sprouting and altitude, as observed in Figure 3.



**Figura 2. Relación entre la altitud y la brotación anormal de los tubérculos.**  
**Figure 2. Relation between altitude and abnormal sprouting of the tubers.**



**Figura 3. Relación entre la población de insectos adultos de *B. cockerelli* y la brotación anormal de los tubérculos.**  
**Figure 3. Relation between the population of adult *B. cockerelli* insects and the abnormal sprouting of the tubers.**



estudios sobre *B. cockerelli*, se pensaba que las ninfas del insecto inyectaban una toxina al alimentarse en el floema de las plantas, que esto provocaba el amarillamiento de las hojas y en los tubérculos podría provocar brotaciones prematuras (Carter, 1939; Edmunson, 1940) y brotes ahilados (Snyder *et al.*, 1946); sin embargo, la toxina nunca ha sido aislada.

En un estudio reciente, Venkatesan *et al.* (2010) observaron que *B. cockerelli* por sí sola, sin portar *Candidatus Liberibacter*, puede causar los síntomas de la PMP en la parte aérea de la planta, pero no en los tubérculos y solamente que el psilido de la papa sea portador de la bacteria entonces aparece el manchado interno en los tubérculos. Los mismos investigadores señalan que se desconoce el mecanismo por medio del cual *B. cockerelli* por sí sola causa los síntomas en la parte aérea de la planta.

En el presente estudio se observó pardeamiento interno en 36% de los tubérculos con brote fino y en 58% de los tubérculos sin brote (Cuadro 2), y los análisis moleculares para *Candidatus Liberibacter* a partir de tubérculos enfermos fueron positivos en 54.1% de los tubérculos con brote fino, y 55% de los que no brotaron.

**Cuadro 2. Resultados del análisis de fitoplasmas y de *Candidatus Liberibacter* en tubérculos con brotación anormal.**  
**Table 2. Results of the analysis of phytoplasmas and *Candidatus Liberibacter* in tubers with abnormal sprouting.**

Tipo de brote	Tubérculos manchados (%)	Tubérculos con <i>Candidatus Liberibacter</i> (%)	Tubérculos con fitoplasmas (%)
Sin brote	58 a*	55 a	2 a
Brote fino	36 b	51.4 a	5 a

\*= Letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo a una prueba de t ( $p=0.05$ ).

Estos resultados sugieren que en la región de Toluca, *B. cockerelli* y *Candidatus Liberibacter psyllauros*, están implicados en la aparición de los síntomas de brotación anormal y manchado interno de los tubérculos. Los resultados coinciden con los reportados en otros países, donde se ha observado que *B. cockerelli* es vector de *Candidatus Liberibacter* y que esta bacteria tiene una estrecha asociación con el síntoma de “Zebra Chip” (Hansen *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009; Venkatesan *et al.*, 2010).

La ausencia de brotes o la presencia de estos pero en forma ahilada, son síntomas que también pueden ser provocados por fitoplasmas (Maramorosch, 1998; Almeyda *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro estudio se encontró que sólo 2% y 5% de los tubérculos sin brotes

The integral analysis of these three figures indicates that the potato psyllid is implied in the appearance of the symptom of abnormal sprouting in the tubers. In the first studies on *B. cockerelli*, it was believed that the nymphs of the insect injected a toxin into the plant's phloem when feeding, and this would cause leaves to turn yellow, along with premature sprouting in the tubers (Carter, 1939; Edmunson, 1940) and threadlike sprouts (Snyder *et al.*, 1946); however, the toxin has never been isolated.

In a recent study, Venkatesan *et al.* (2010) observed that *B. cockerelli* on its own, not carrying *Candidatus Liberibacter*, can cause the symptoms of PMP in the aerial section of the plant, but not in the tubers, and only if the potato psyllid is a carrier of the bacteria will stains appear inside the tubers. The same researchers point out that the mechanism by which *B. cockerelli* on its own causes the symptoms in the aerial part of the plant are unknown.

In the present study, 36% of the tubers with fine sprouting displayed internal browning, as was the case of 58% of the tubers without sprouts (Table 2) and the molecular analyses

for *Candidatus Liberibacter* from diseased tubers were positive in 54.1% of tubers with fine sprouts and 55% of those with no sprouts.

These results suggest that in the Toluca area, *B. cockerelli* and *Candidatus Liberibacter psyllauros* are implied in the appearance of abnormal sprouting and internal stains in the tubers. Results agree with those from studies in other countries, where *B. cockerelli* has been observed to be a vector of *Candidatus Liberibacter*, and that this bacteria is widely related to the ‘Zebra Chip’ symptom (Hansen *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009; Venkatesan *et al.*, 2010).

The absence of sprouts or their threadlike presence is symptoms that can also be caused by phytoplasmas (Maramorosch, 1998; Almeyda *et al.*, 1999;

y con brotes finos respectivamente, fueron positivos a fitoplasmas; en cambio, *Candidatus Liberibacter* estuvo presente en más 50% de los tubérculos con brotación anormal, lo cual indica la mayor importancia de la bacteria en la inducción de estos síntomas.

En forma similar a lo encontrado en nuestro estudio, Liefiting *et al.* (2009b) reportaron un caso de infección mixta de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y *Candidatus Phytoplasma australiense* en lotes comerciales de papa en Nueva Zelanda con síntomas de PMP. En estudios recientes, las técnicas de microscopía electrónica han permitido observar, en los elementos cribosos del floema de plantas de papa con los síntomas de “Zebra Chip”, microorganismos parecidos a bacterias (denominados BLOs por sus siglas en inglés), los cuales han sido denominados *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Secor *et al.*, 2009).

Es importante señalar que también los fitoplasmas causantes de los síntomas de la punta morada de la papa, se localizan principalmente en el floema (Maramorosch, 1998), por lo que es de esperarse que los síntomas provocados por ambos patógenos sean similares al estar bloqueando el sistema de transporte de la savia en el floema de las plantas. La interacción entre fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter* no se puede dilucidar en este estudio, aunque es de suponerse que la infección conjunta de ambos patógenos agrave los síntomas en la parte aérea de las plantas y tubérculos, debido que los dos afectan su sistema vascular. Actualmente se desconoce si los fitoplasmas solos pueden causar el manchado interno de los tubérculos, en cambio se ha demostrado que *Candidatus Liberibacter* sí está asociada con este síntoma (Hansen *et al.*, 2008; Liefiting *et al.*, 2008; Crosslin y Bester, 2009; Secor *et al.*, 2009; Venkatensan *et al.*, 2010).

En este estudio, el análisis de *Candidatus Liberibacter* se hizo siguiendo la técnica descrita por Hansen *et al.* (2008) para *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, y por eso se reporta la presencia de esta especie en lotes comerciales de papa de la región de Toluca, Estado de México. Sin embargo, existen evidencias moleculares que indican que *Candidatus Liberibacter psyllaourous* y *Candidatus Liberibacter solanacearum* reportada por Liefiting *et al.* (2008), son la misma especie (Secor *et al.*, 2009). Hasta la fecha solo existe otro estudio que indica que *Candidatus Liberibacter psyllaourous* está presente en México (Munyaneza *et al.*, 2009c). Éstos investigadores reportaron que en 11 muestras de tubérculos con manchado interno colectadas en Saltillo,

Cadena *et al.*, 2003). However, the present study found that only 2% and 5% of tubers without sprouts and with fine sprouts, respectively, gave positive for phytoplasmas. On the other hand, *Candidatus Liberibacter* was present in over 50% of tubers with abnormal sprouting, indicating the greater importance of the bacteria in the induction of these symptoms.

In a similar fashion to the present study, Liefiting *et al.* (2009b) reported a case of mixed *Candidatus Liberibacter solanacearum* and *Candidatus Phytoplasma australiense* infection in commercial potato batches in New Zealand, with PMP symptoms. In recent studies, electronic microscopy techniques have helped to observe microorganisms similar to bacteria (BLOs), in the sieve tube elements of the phloem in potato plants with ‘Zebra Chip’ symptoms; such microorganisms have been named *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Secor *et al.*, 2009).

It is worth pointing out that also phytoplasmas that cause PMP symptoms are found mainly in the phloem (Maramorosch, 1998), therefore the symptoms caused by both pathogens are expected to be similar, since they block the flow of the sap in the phloem’s of the plants. The interaction between phytoplasmas and *Candidatus Liberibacter* cannot be explained in this study, although one can assume that the infection of both pathogens could aggravate the symptoms in the aerial section and tubers of the plant, since they both affect the vascular system. There is currently no knowledge on whether phytoplasmas can, on their own, cause the internal staining of tubers, although it has been proven that *Candidatus Liberibacter* is related to this symptom (Hansen *et al.*, 2008; Liefiting *et al.*, 2008; Crosslin and Bester, 2009; Secor *et al.*, 2009; Venkatensan *et al.*, 2010).

In this study, the analysis for *Candidatus Liberibacter* was carried out following the technique described by Hansen *et al.* (2008) for *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, which is why the presence of this species is reported in commercial potato batches in the area of Toluca, State of Mexico. However, there is molecular evidence that *Candidatus Liberibacter psyllaourous* and *Candidatus Liberibacter solanacearum* reported by Liefiting *et al.* (2008), are the same species (Secor *et al.*, 2009). Up to date, there is only one other study indicating that *Candidatus Liberibacter psyllaourous* is present in Mexico (Munyaneza *et al.*, 2009c). These researchers report that in 11 samples of tubers with internal stains gathered in Saltillo, Coahuila, 63.7% gave positive for *Candidatus Liberibacter*.

Coahuila, el 63.7% fue positivo a *Candidatus Liberibacter*. La amplificación del DNA (16S rDNA) con análisis de BLAST (ZC OA2/OI2c), mostró 100% de similitud con muestras de *Candidatus Liberibacter* obtenidas de *B. cockerelli* de Texas y tubérculos de Kansas, Estados Unidos. La secuencia del fragmento amplificado con los iniciadores OA2/OI2c, también fue idéntica al 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter psyllae* reportado por Hansen *et al.* (2008). Estos resultados nos sugieren que el complejo de síntomas conocido como PMP en México y “Zebra Chip” en Estados Unidos de América tienen el mismo origen.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio realizado en la región productora de papa de Toluca, demostraron que existe una estrecha relación entre los síntomas del tubérculo (brotación anormal y pardeamiento interno), provocados por la enfermedad conocida como punta morada de la papa, con la población del psílido *Bactericera cockerelli* y la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae*.

## LITERATURA CITADA

- Almeyda, L. I. H.; Rubio, C. O. A. y Zavala, Q. T. 1999. Determinación de la implicación de fitoplasmas con la expresión sintomatológica de punta morada en papa (*Solanum tuberosum*). IV Simposio de Ciencia y Tecnología. Desarrollo Agropecuario. SEP-CONACYT. Monterrey, Nuevo León, México. 45 p.
- Almeyda, L. I. H.; Rocha, P. M. A.; Piña, R. J. and Martínez, S. J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of *Phytoplasma* sp. in different plant species in Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19:1-9.
- Almeyda, L. I. H.; Sánchez, S. J. A. y Garzón, T. J. A. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agric. Téc. Méx.* 34:141-150.
- 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.

The amplification of DNA (16S rDNA) with a BLAST (ZC OA2/OI2c) analysis, showed a similarity of 100% with *Candidatus Liberibacter* samples taken from *B. cockerelli* in Texas and tubers from Kansas, USA. The sequence of the fragment amplified with initiators OA2/OI2c, was also identical to the 16S rDNA of *Candidatus Liberibacter psyllae* reported by Hansen *et al.* (2008). These results suggest that the complex of symptoms known as PMP in Mexico and ‘Zebra Chip’ in the USA have the same origin.

## CONCLUSION

The results of this study carried out in the potato-producing area of Toluca, showed that there is a wide relation between the symptoms of the tuber (abnormal sprouting and internal browning), caused by the disease known as potato purple-tip, and the population of the psyllid *Bactericera cockerelli* and the presence of the bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae*.

*End of the English version*



- Cadena, H. M. A.; Guzmán, P. I. R.; Díaz, V. M.; Zavala, Q. T. E.; Magaña, T. O. S.; Almeyda, L. I. H.; López, D. H.; Rivera, P. A. y Rubio, C. O. A. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa en Valles Altos y Sierras del Estados de México, Tlaxcala y Distrito Federal, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:248-259.
- Caldwell, J. S. 1941. Preliminary survey of Mexican Psyllidae (Homoptera). *Ohio Journal of Science* 41(6):418-424.
- Carter, W. 1939. Injuries to plants caused by insect toxins. *Botanical Review.* 5(5):273-326.
- Cranshaw, W. S. 1993. Annotated bibliography of potato tomato Psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae). Colorado State University, Fort Collins. Agricultural Experiment Station. U. S. A. Bulletin TB93-5. 52 p.
- Crosslin, J. M. and Munyaneza, J. E. 2009. Evidence that the zebra chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and in vitro. *Ame. J. Potato Res.* 86:183-187.

- Edmunson, W. C. 1940. The effect of psyllid injury on the vigor of seed potatoes. *Ame. Potato J.* 7(2):315-317.
- Garzón, T. J. A.; Becerra, F. A.; Marín, A.; Mejía, A. C. Y. and Byerly, M. K. F. 1992. Manejo integrado de la enfermedad permanente del tomate (*Lycopersicon lycopersicum* Karst ex FawII Mill.), en El Bajío. In: Urías, C.; Rodríguez, R. y Alejandre, T. (eds). Afidos como vectores de virus en México. Fitopatología, Colegio de Postgraduados, México. 1:116-118.
- Hansen, A. K.; Trumble, J. T.; Stouthamer, R. and Paine, T. D. 2008. New Huanglongbing (HLB) *Candidatus* species, “*C. Liberibacter psyllauros*”, found to infect tomato and potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl. Environ. Microbiol.* 74(18) 5862-5865.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) 2005. ERIC III. Extractor rápido de información climática. México.
- Lee, I. M.; Bottner, K. D. and Sun, M. 2009. An emerging potato purple top disease associated with a New 16SrIII Group Phytoplasma in Montana. *Plant Dis.* 93(9):970.
- Leyva, L. N. E.; Ochoa, S. J. C.; Leal, K. D. S. and Martínez, S. J. P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México. *Can. J. Microbiol.* 48:1062-1068.
- Liefting, L. W.; Pérez-Egusquiza, Z. C. and Clover, G. R. G. 2008. A New ‘*Candidatus Liberibacter*’ Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92(10):1474.
- Liefting, L. W.; Sutherland, P. W.; Ward, L. I.; Paice, K. L.; Weir, B. S. and Clover, G. R. G. 2009a. A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 93:208-214.
- Liefting, L. W.; Veerakone, S.; Ward, L. I. and Clover, G. R. G. 2009b. First Report of ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ in Potato. *Plant Dis.* 93(9):969-975.
- Maramorosch, K. 1998. Current status of potato purple top wilt. *Int. J. Trop. Plant Dis.* 16:61-72.
- Maya, H. V.; Ramírez, O. J.; Cortéz, O. R.; Vega, M. R. y Moreno, Ch. G. 2003. Manejo integrado del pulgón saltador en jitomate en el estado de San Luis Potosí. Campo E. Palma de la Cruz, SLP. INIFAP. México. Folleto técnico. Núm. 22. 43 p.
- Munyanenza, J. E.; Crosslin, J. M. and Upton, J. E. J. E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “Zebra Chip,” a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. *J. Econ. Entomol.* 100(3):656-663.
- Munyanenza, J. E.; Buchman, J. L.; Upton, J. E.; Goolsby, J. A.; Crosslin, J. M.; 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. *Subtrop. Plant Sci.* 60:27-37.
- Munyanenza, J. E.; Sengoda, V. G.; Crosslin, J. M.; Garzón, T. J. A. and Cárdenas, V. O. G. 2009a. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in tomato plants in Mexico. *Plant Dis.* Published online as doi:10.1094/PDIS-93-0-00000.
- Munyanenza, J. E.; Sengoda, V. G.; Crosslin, J. M.; Garzón, T. J. A. and Cárdenas, V. O. G. 2009b. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in pepper plants in Mexico. *Plant Dis.* Published online as doi:10.1094/PDIS-93-0-00000.
- Munyanenza, J. E.; Sengoda, V. G.; Crosslin, J. M.; De la Rosa-Lozano, G. and Sánchez, A. 2009c. First report of ‘*Candidatus Liberibacter psyllauros*’ in potato tubers with Zebra Chip disease in Mexico. *Plant Dis.* 93(5):552.
- Okuda, S.; Prince, J. P.; Davis, R. E.; Dally, E. L.; Lee, I. M.; Morgen, B. and Kato, S. 1997. Two groups of phytoplasmas from Japan distinguished on the basis of amplification and restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Dis.* 81:301-305.
- Rubio, C. 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. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc., en las principales zonas productoras de papa en México. *Agric. Téc. Méx.* 32(2):161-171.
- Secor, G. A.; Lee, M.; Bottner, K. D.; Rivera, V. V. and Gudmestad, N. C. 2006. First report of a defect of processing potatoes in Texas and Nebraska associated with a new phytoplasma. *Plant Dis.* 90:377-384.
- Secor, G. A.; Rivera, V. V.; Abad, J. A.; Lee, M.; Clover, G. R.; and Liefting, L. W. 2009. Association of *Candidatus Liberibacter solanacearum* with Zebra Chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy and PCR. *Plant Dis.* 93(6):574-586.
- Snyder, W. C.; Thomas, H. E. and Fairchild, S. J. 1946. Spindling or hair sprouts of potato. *Phytopathology.* 36(11):897-904.
- Venkatesan, G. S.; Munyanenza, J. E.; Crosslin, J. M.; Buchman, J. L. and Pappu, H. R. 2010. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip disease of potato. *Ame. J. Potato Res.* 87:41-49.