

Detección de *Ca Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas en cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Valle de Toluca

Detection of *Ca Liberibacter solanacearum* and phytoplasma in potato crop (*Solanum tuberosum* L.) in Toluca Valley

Ana Tarin Gutiérrez-Ibáñez^{*}, Jesús Ricardo Sánchez Pale^{**}, Antonio Laguna Cerda^{***}, José Francisco Ramírez Dávila^{****}, Artemio Balbuena Melgarejo^{*****}, Omar Guadalupe Alvarado Gómez^{*****}

Resumen

En México y Centro América se han detectado tubérculos de papa con manchado interno. Recientemente en Texas EUA a esta enfermedad se le ha denominado "Zebra Chip" (ZC) o rayado de la papa, los síntomas foliares se asemejan al síndrome denominado "Punta Morada de la Papa" (PMP) o enfermedad del "amarillamiento por psilidos" la cual es asociada con la presencia de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*". El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de esta bacteria y de fitoplasmas en plantas de papa que presentaban la coloración purpura de los foliolos. Durante el ciclo primavera – verano 2011 y 2012 se hizo un muestreo en los municipios de Tenango del Valle, Zinacantepec, Villa de Allende y San José del Rincón, del Estado de México. La detección de ambos patógenos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores específicos para fitoplasmas: P1/P7, R16mF2/R16mR1 y para *Ca Liberibacter solanacearum*: OA2/Oi2c, resultando el 35,8% de las plantas positivas para fitoplasmas y el 11,6% para la bacteria. Los resultados indican que en algunas regiones productoras de papa del Estado de México, los dos presuntos agentes causales del síndrome de PMP, fitoplasmas y *Ca. Liberibacter solanacearum*, pueden estar asociados.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, Fitoplasma, punta morada.

Abstract

In Mexico and Central America have been detected stained potato tubers with internal browning; recently in Texas, USA, this disease has been called "Zebra Chip" (ZC) or striped potato, foliar symptoms resemble the syndrome called "Potato Purple Top" (PPT) or "psyllid yellows" disease which is associated with the presence of "*Candidatus liberibacter solanacearum*". The aim of the current work was to detect the presence of this bacterium and phytoplasma in potato plants with purple top symptoms. During 2011 and 2012 Spring – Summer cycle, a directed sampling was carried out in Tenango del Valle, Zinacantepec, Villa de Allende and San José del Rincón, State of México. The detection of both pathogens was

^{*} Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMex, Campus Universitario Toluca-Ixtlahuaca, Km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México CP 50200; *Autor para correspondencia e-mail: atarini@uaemex.mx .

^{**} Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMex, Campus Universitario Toluca-Ixtlahuaca, Km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México CP 50200; e-mail: jrsanchez@uaemex.mx .

^{***} Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMex, Campus Universitario Toluca-Ixtlahuaca, Km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México CP 50200; e-mail: alagunac@uaemex.mx

^{****} Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMex, Campus Universitario Toluca-Ixtlahuaca, Km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México CP 50200; e-mail: jframirez@uaemex.mx

^{*****} Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMex, Campus Universitario Toluca-Ixtlahuaca, Km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México CP 50200; e-mail: abalbuenam@uaemex.mx

^{*****} Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. e-mail: omar-alvarado@prodigy.net.mx

performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers for phytoplasmas: P1/ P7, R16mF2/R16mR1 and for *Ca Liberibacter solanacearum*: OA2/Oi2c, being 35,8 % from the positive plants for phytoplasmas and 11,6 % for this bacterium. These results indicated that in some areas these two PPT syndrome suspected causative agents, phytoplasmas and *Ca. Liberibacter solanacearum*, could be associated in the State of Mexico potato-producing region.

Key words: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, Phytoplasma, Purple Top.

Recibido: octubre 24 de 2012

Aprobado: junio 24 de 2013

Introducción

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los más importantes en el Estado de México, con una superficie cosechada de 1,677 ha y un rendimiento de 19,39 ton/ha para el año 2010. Un defecto llamado "papa manchada" fue reportado por primera vez en México en 1994, y se caracteriza por desarrollar un patrón de necrosis estriada en cortes transversales del tubérculo, necrosis que se acentúa cuando las rebanadas de los tubérculos se fríen. Se considera que la producción de papa ha sufrido pérdidas económicas del 70 al 90% por este tipo de daños. La misma sintomatología fue observada en el año 2000 en Texas, E.U.A nombrándole "zebra chip" y posteriormente en Guatemala en donde se le llamó "papa rayada" (Munyanza *et al.*, 2007), recientemente el mismo síndrome fue reportado en plantaciones de papa en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2008). Se considera que los daños económicos son significativos en estos países y se ha dirigido la investigación a conocer sus causas. Los síntomas de la enfermedad conocida como PMP en México son similares a ZC.

Por observaciones al microscopio electrónico y PCR anidado, Secor *et al.*, (2009) hipotizaron que "zebra chip" era causada por un fitoplasma, y que *Bactericera cockerelli* estaba asociado con la enfermedad (Munyanza *et al.*, 2007). Liefting *et al.*, (2008) observaron en un experimento con papa que además de los síntomas

mencionados, las plantas afectadas envejecían antes de tiempo y los rendimientos disminuían hasta un 60% comparado con el rendimiento esperado.

Paralelamente Liefting *et al.*, (2008) determinaron que los síntomas de "zebra chip" están asociados con una nueva bacteria cuyo nombre propuesto es "*Ca Liberibacter solanacearum*", la cual parece ser la misma bacteria que causa el amarillamiento de los psíldos en tomate y chile, Hansen *et al.*, (2008) proponen como "*Ca L. psyllaureous*", la cual sería la cuarta especie conocida hasta ahora del género *Liberibacter*.

De acuerdo con los investigadores referidos, esta nueva bacteria es transmitida por el psílido *Bactericera cockerelli*, insecto ampliamente distribuido en la mayoría de las zonas agrícolas, en fechas recientes, en otras regiones productoras de papa en el mundo se ha determinado como agente causal a la bacteria *Liberibacter*. Con la idea de contribuir al conocimiento de esta enfermedad. La presente investigación tuvo como objetivo detectar la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas en cultivos comerciales de papa, en las principales zonas productoras en el Estado de México.

Materiales y métodos

El muestreo se realizó en variedades comerciales de papa de cuatro municipios productores del Valle de

Tabla 1. Ubicación geográfica de las localidades muestreadas para determinar la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.).

Municipio	Altitud (msnm)	Latitud (N)	Longitud (O)
Tenango del Valle	2,857	19° 06' 30.63"	99° 39' 08.72"
Zinacantepec	3,041	19° 14' 12.04"	99° 48' 37.30"
Villa de Allende	2,380	19° 22' 00"	100° 09' 05.92"
San José del Rincón	2,760	19° 45' 11"	100° 09' 36.84"

Toluca (Zinacantepec, San José del Rincón, Tenango del Valle y Villa de Allende) (tabla 1), en el ciclo primavera- verano 2011 y 2012; cuando las plantas se encontraban en floración y expresaban síntomas de la enfermedad PMP. Se colectaron 30 muestras por municipio correspondientes a folíolos con coloración púrpura, y se procesaron en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

La extracción de ADN de tejido foliar se realizó a partir de 0.3 g siguiendo el método descrito por Dellaporta *et al.*, 1983, utilizando el kit de extracción comercial Plant DNAzol Reagent® (Invitrogen™). Para observar la integridad del ADN extraído se preparó un gel de agarosa a una concentración de 0.8% teñido con bromuro de etidio (0.1 µg mL⁻¹). Mediante un transiluminador de luz UV GVM20 Syngene se visualizaron las bandas de ADN, la calidad y la concentración de ADN se midió en un biofotómetro marca Eppendorf. El ADN obtenido se diluyó en agua destilada estéril para obtener una concentración final de 20 ng µL⁻¹ y se guardó a -20 °C para su uso posterior (Dellaporta *et al.*, 1983).

La amplificación consistió en tomar el ADN de cada muestra y someterlo a una primera reacción de PCR utilizando el par de iniciadores P1/P7:(5´-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3´/5´-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3´) y en una segunda amplificación se utilizaron los iniciadores R16mF2/R16mR1: 5´-CATGCAAGTCGAACGGA-3´-5´-CTTAACCCCAATCATCGA). El programa térmico utilizado en las PCR´s para la detección de Fitoplasmas fue el reportado por Lee *et al.*, 1993

Para la detección de *Ca Liberibacter solanacearum* se utilizaron los iniciadores específicos: OA2/Oi2c (5´-GCGCTATTTTAATAGGAGCGGCA-3´/5´-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3´), los cuales fueron diseñados a partir de la región 16S rDNA y que amplifican un fragmento de 1160pb (Liefing *et al.*, 2008; Liefing *et al.*, 2009).

Las muestras se amplificaron en un termociclador automático PTC-100 MJ Research y los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (P1/P7 1.0%, R16mF2/R16mR1 1.3%, OA2 y Oi2c 1.0%) teñidos con bromuro de etidio (0.1 µg mL⁻¹) en buffer TAE 1X, usando un transiluminador de luz UV GVM20 Syngene. El tamaño de los fragmentos obtenidos se determinó con el software Gene Tools 3.1. con respecto al marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Invitrogen ®).

Resultados y discusión

El ADN obtenido se encontró dentro del rango de pureza adecuado para realizar la PCR (1.7-2.0) (Sambrook *et al.*, 1989).

En la PCR-anidada se observó un fragmento de 1200 pb, tanto en el testigo positivo como en las muestras problema (figura 1), detectándose de esta manera la presencia de fitoplasmas en 43 plantas de papa.

La presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se detectó en 14 plantas con sintomatología de PMP, por la amplificación de un fragmento de 1160 pb (Figura 2).

Se detectó la presencia de fitoplasmas en un 35,8% de las muestras analizadas observándose el porcentaje más alto (15%) en las muestras que provenían de

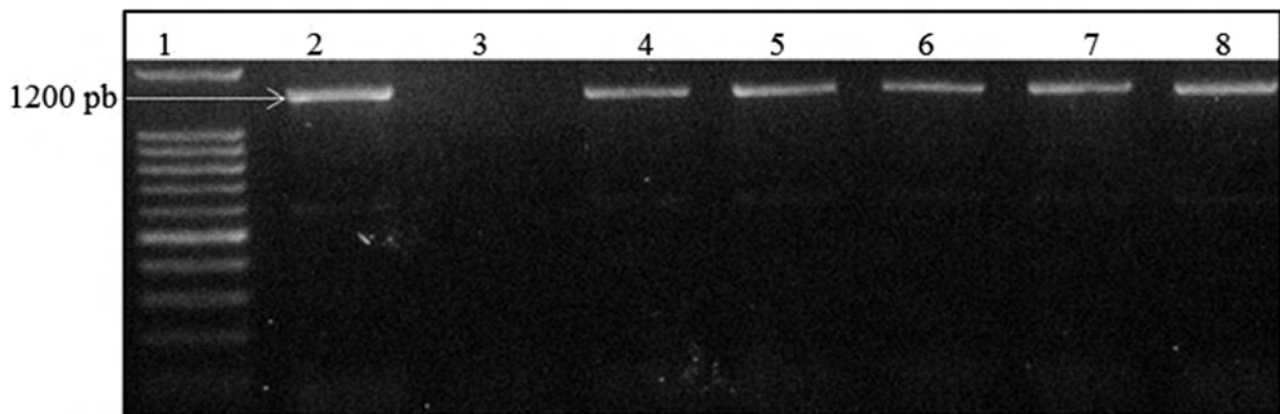


Figura 1. Productos amplificados por PCR-anidada. Pozo 1. marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen ®), 2. control positivo (ALC), 3. control negativo, 5-8. muestras de plantas de papa.

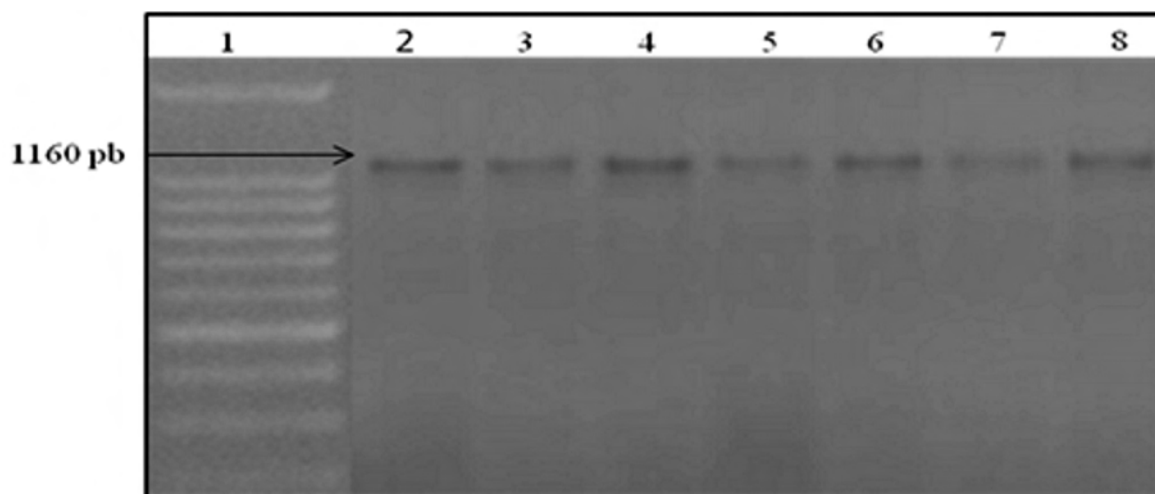


Figura 2. Productos amplificados por PCR, con los iniciadores OA2 y Oi2c Pozo 1 marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb (invitrogen ®), 2 control positivo, 3-8 muestras de plantas de papa.

Tenango del Valle y el más bajo (5%) en las pertenecientes a Villa de Allende. Con lo que respecta a *Candidatus Liberibacter solanacearum* el 12% de las plantas analizadas con síntomas de PMP resultaron positivas, encontrándose el porcentaje más alto en la localidad de Tenango del Valle con un 23,3%, mientras que para Villa de Allende no fue detectado (tabla 2).

Los resultados confirman la presencia de fitoplasmas en las cuatro zonas de estudio y de *Candidatus Liberibacter solanacearum* solamente en 3. La presencia de ambos patógenos en una misma planta solo fue detectada en Zinacantepec y Tenango del Valle.

La introducción de *Ca. L. solanacearum* en México es incierta, sin embargo la presencia del insecto vector *B.*

cockerelli asociada con su diseminación ha sido reportada desde 1947 (Vega *et al.*, 2008), tiempo antes de considerar a la bacteria potencialmente perjudicial en solanáceas. El primer reporte de ZC en México fue en 1994 en campos de papa cerca de Saltillo (Munyaneza *et al.*, 2007).

Rubio *et al.*, (2011), señalaron la presencia de fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter solanacearum* en la región productora de papa de Toluca. Dichos resultados concuerdan con los encontrados en la presente investigación al detectarse un 47,4% de plantas positivas a fitoplasmas y *Ca. Liberibacter solanacearum* mientras que el 52,6% restante negativo podría asociarse a otros patógenos, lo cual coincide con lo reportado por Secor *et al.*, 2009.

Tabla 2. Porcentaje de la presencia de fitoplasmas y *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de papa con síntomas de punta morada (*Solanum tuberosum* L.) por localidad.

Localidad	Plantas positivas para (%)*:		
	Fitoplasma	<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	Ambos patógenos
Tenango del Valle	50	23,3	13,3
Zinacantepec	43,3	20	10
Villa de Allende	16,6	-	-
San José del Rincón	33,3	3,3	-
Promedio General	35,8	11,6	5,8

*El tamaño de la muestra fue de 30 plantas por localidad

La ausencia de los dos patógenos en la mayoría de las muestras sintomáticas contrasta con el efecto que causan los fitoplasmas y *Ca. Liberibacter solanacearum* al bloquear el sistema de transporte de la savia en el floema de las plantas (Maramorosch, 1998), y expresar los síntomas de punta morada.

En la actualidad el desarrollo de estrategias de control para *Ca. L. solanacearum* y fitoplasmas en cultivos de papa se ha enfocado al manejo del vector *B. cockerelli*, debido a que ambos patógenos se encuentran limitados al floema y su medio de diseminación entre plantas es mediante injerto y vía insectos vectores (Bové, 2006).

Conclusiones

Se detectó la presencia de fitoplasmas y *Ca. Liberibacter solanacearum* en el 47,7% de las muestras de plantas de papa con síntomas de punta morada, en las principales regiones productoras del Estado de México.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el apoyo económico mediante el proyecto con clave 3056/2011ESP.

Referencias bibliográficas

Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*. 88: 7-37.

Dellaporta, S.L.; Wood, J; Hicks, J.B. 1983. A plasmid DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1:19-21.

Hansen, A.K; Trumble, J.T; Stouthamer, R; Paine, T.D. 2008. A new huanglongbing species, 'Candidatus *Liberibacter psyllaeus*', found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*. 74(18):5862-5865.

Lee, I. M; Hammond, R.W; Davis, R.E; Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*. 83:834-842.

Liefting, L. W; Sutherland, P.W; Ward, L.I; Paice, K.L; Weir, B.S; Clover, G.R.G. 2009. A new 'Candidatus *Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*. 93: 208-214.

Liefting, L.W; Perez-Egusquiza, Z.C; Clover, G.R.G; Anderson, D.A.D. 2008. A New 'Candidatus *Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease*. 92:1474.

Maramorosch, K. 1998. Current status of potato purple top wilt. *International Journal of Tropical Plant Disease*, 16:61-72.

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

Rubio, C.O.A; Almeida, L.I.H; Cadena-Hinojosa, M. A; Lobato-Sánchez, R. 2011. Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia "Candidatus *Liberibacter psyllaeus*" en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(1):17-28.

Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory. New York, USA. p. 16-59.

Secor, G.A; Rivera, V.V. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Revista Latinoamericana Papa*. (Suppl.)1:1-8.

Secor, G.A; Rivera, V.V; Lee, I.M; Clover, G.R.G; Liefting, L.W; Li, X; 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(6):574-583.

Vega, G.M.T; Rodríguez, M.J.C; Díaz, G.M.O; Bújanos, M.R; Mota, S.D; Martínez, C. J.L; Lagunés, T.A; Garzón, T.J.A. 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Trioziidae). *ciencia*. 42:463-471.