



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS
CONTRA EL PSILIDO DE LA PAPA (*Bactericera cockerelli*
Sulc.) EN METEPEC, EDO. DE MÉXICO Y TRANSMISIÓN
DE BACTERIAS NO CULTIVADAS ASOCIADAS A
ENFERMEDADES EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.)”**

MARIA FELIPA LOPEZ DURAN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

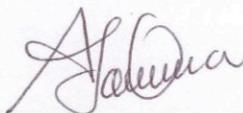
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

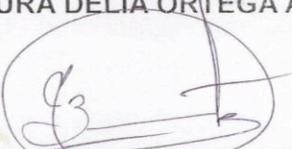
2009

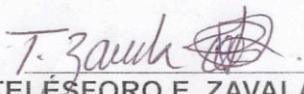
La presente tesis titulada: Efectividad biológica de insecticidas contra el psílido de la papa (*Bactericera cockerelli* Sulc.) en Metepec, Edo. de México y transmisión de bacterias no cultivadas asociadas a enfermedades en papa (*Solanum tuberosum* L.) realizada por la alumna María Felipa López Durán, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS

ASESOR: 
DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

ASESOR: 
M. C. TELÉSFORO E. ZAVALA QUINTANA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2009

AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO Y PERMITIRME SEGUIR DISFRUTANDO DE LA VIDA.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) POR EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO A LOS ESTUDIANTES CON DESEOS DE SUPERACION.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS Y AL PERSONAL ACADEMICO DEL PROGRAMA DE ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA POR LA OPORTUNIDAD Y EL APRENDIZAJE INVALUABLE QUE ME OTORGARON.

A LA DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS, POR SU ACERTADA DIRECCIÓN, DISPONIBILIDAD, COLABORACIÓN, SUGERENCIAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO Y SOBRE TODO POR SU GRAN APOYO Y AMISTAD.

AL DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ Y M.C. TELÉSFORO ZAVALA QUINTANA, POR SU VALIOSO APOYO, SUGERENCIAS Y OBSERVACIONES PARA LA MEJORA DEL PRESENTE TRABAJO.

A LA DRA. HILDA SILVA ROJAS, POR SU GRAN APOYO, TENACIDAD, CONSTANCIA Y DISPOSICIÓN PARA COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS EN EL CAMPO DE LA BIOLOGIA MOLECULAR CON SUS ALUMNOS, ES USTED FUENTE DE ADMIRACIÓN Y MOTIVACIÓN.

AL DR. CRISTIAN NAVA DIAZ, POR SU APOYO, ASESORIA, DISPONIBILIDAD Y AMISTAD QUE DEMUESTRA CON TODOS LOS QUE NOS ACERCAMOS A EL.

A LOS ING. SALVADOR JOAQUIN Y RENE CANO DEL CESAVEM POR SU APOYO EN CAMPO.

A MIS COMPAÑEROS DE CLASES, LABORATORIO E INVERNADERO DEL COLEGIO POR COMPARTIR GRANDES MOMENTOS, FUE UNA ESTANCIA Y CONVIVENCIA MUY GRATA.

A MIS PADRES GUILLERMO Y FELIPA, POR LA CONFIANZA Y APOYO INCONDICIONAL QUE ME HAN DEMOSTRADO EN TODO MOMENTO.

A MIS HERMANOS MAURO, MARTHA, ESTELA, FRANCISCO Y GUILLERMO LES AGRADEZCO ENORMEMENTE SU APOYO Y CONSEJOS, ESPERO CONTAR CON USTEDES SIEMPRE.

A JORGE...PORQUE A PESAR DE TODO ESTA CON NOSOTROS, ES EL ANGEL DE LA FAMILIA.

A DAVID, ISMAEL Y RAFAEL

CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN GENERAL.....	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPITULO 1. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS CONTRA EL PSILIDO DE LA PAPA (<i>Bactericera cockerelli</i> Sulc.) EN METEPEC, EDO. DE MÉXICO.....	2
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1 Variables evaluadas.....	7
2.1.1 Adultos de <i>B. cockerelli</i> por trampa.....	7
2.1.2 Adultos, huevos y ninfas por foliolo.....	7
2.1.3 Incidencia de PMP.....	8
2.1.4 Rendimiento.....	9
2.2 Análisis estadístico.....	9
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
3.1 Adultos por trampa.....	10
3.2 Adultos por foliolo.....	11
3.3 Huevos por foliolo.....	12
3.4 Ninfas por foliolo.....	13
3.5 Incidencia de PMP.....	15
3.6 Rendimiento.....	17
IV. CONCLUSIONES.....	20
V. LITERATURA CITADA.....	21

CAPITULO 2. TRANSMISION DE BACTERIAS NO CULTIVADAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES EN PAPA (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	26
RESUMEN.....	26
ABSTRACT.....	27
I. INTRODUCCIÓN.....	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1 Cría del psílido.....	30
2.2 Material vegetativo.....	31
2.3 Fuente de inóculo.....	31
2.4 Pruebas de transmisión.....	32
2.5 Determinación del Agente Causal.....	33
2.5.1 Extracción de ADN del tejido vegetal e insectos.....	33
2.5.2 PCR.....	34
2.5.3 Electroforesis y visualización de productos.....	34
2.5.4 Clonación de productos de PCR.....	34
2.5.5 Secuenciación del patógeno.....	35
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1 Eficiencia de <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc. en la transmisión.....	35
3.2 Detección de fitopatógenos con PCR- directa y anidada	42
IV. CONCLUSIONES.....	47
V. LITERATURA CITADA.....	49

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Densidad poblacional de adultos de <i>B. cockerelli</i> por punto cardinal y su significancia en cultivo de papa <i>S. tuberosum</i> var. Gigant a diferentes días después de la siembra en Metepec, Edo. de México.....	11
Cuadro 2. Promedio individuos de <i>B. cockerelli</i> Sulc. en tres estados de desarrollo, por foliolo en diferentes días después de la siembra en Metepec, Edo de México.	12
Cuadro 3. Incidencia máxima (IM%), área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y tasa de infección aparente (TIA) de PMP en papa <i>Solanum tuberosum</i> var. Gigant en Metepec, Edo. de México.....	17
Cuadro 4. Rendimiento (t ha ⁻¹) y daños en tubérculos en papa <i>S. tuberosum</i> por tratamiento.....	19
Cuadro 5. Porcentaje de plantas que mostraron síntomas 30 ddt, al utilizar como fuente de inóculo, una planta enferma de papa o una planta sana de Chile, considerando el Estado de Desarrollo del Psílido (EDP), Número de Psílicos por Planta (NPP) y el tiempo de inoculación.....	37
Cuadro 6. Porcentaje de tubérculos dañados por planta, 30 ddt al utilizar como fuente de inóculo una planta enferma de papa o una planta sana de Chile, considerando el Estado de Desarrollo del Psílido (EDP), Número de Psílicos por Planta (NPP) y el tiempo de inoculación.....	40

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Progreso de PMP a través del tiempo en cada tratamiento (s) de insecticidas aplicados en papa <i>Solanum tuberosum</i> var. Gigant en Metepec, Edo. de México.....	16
Figura 2. Tubérculos de papa con brote de hilo o sin brote en el tratamiento testigo...	18
Figura 3. Tubérculos de papa con manchado interno en el tratamiento testigo.....	18
Figura 4. Cría del psílido <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc.....	31
Figura 5. Fuente de inóculo (planta enferma de papa).....	32
Figura 6. Planta de papa después de la transmisión con adultos.....	36
Figura 7. Planta de papa después de la transmisión con ninfas.....	37
Figura 8. Amplificación de productos de PCR, con primers P1/P7 y primers R16F2n/R16R2, muestras después de inocular con adultos.....	43
Figura 9. Amplificación de productos de PCR, con primers rp(L2F3)/rp(1)RIA, rpF1C/rp(1)RIA, muestras después de inocular con adultos.....	43
Figura 10. Amplificación de productos de PCR, con primers OA2/ OI2C, muestras después de inocular con adultos. (1, 2) 15 min de inoculación con 3 psílicos, (3) 15 min. de inoculación con 10 psílicos, (5, 8) 15 min. de inoculación con 5 psílicos, (6) 15 minutos con 1 psílido.....	44
Figura 11. Amplificación del gel de agarosa con ADN extraído de plantas de papa después de haber realizado la transmisión.....	45
Figura 12. Dendograma filogenético de las secuencias obtenidas correspondientes a bacterias no cultivadas en plantas de papa (<i>S. tuberosum</i> L).....	46

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS CONTRA EL PSÍLIDO DE LA PAPA
(*Bactericera cockerelli* Sulc.) EN METEPEC, EDO. DE MÉXICO Y TRANSMISIÓN DE
BACTERIAS NO CULTIVADAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES EN PAPA
(*Solanum tuberosum* L.).

María Felipa López Durán, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009.

Con el propósito de identificar insecticidas efectivos para el manejo del psílido de la papa *Bactericera cockerelli* Sulc., y reducir la incidencia de la Punta Morada de la Papa (PMP), se realizó un experimento en Metepec, Edo. de México, donde se evaluaron siete insecticidas de diferentes grupos toxicológicos. Los mejores insecticidas para el control de huevos y adultos del psílido fueron extracto de nim y abamectina con 69.8 y 84.8% de efectividad biológica, mientras que para ninfas fueron spiromesifen, bifentrina, abamectina y flufenoxuron con 77.7% de efectividad. Sin embargo, ningún producto fue efectivo para reducir la incidencia de la Punta Morada de la Papa.

El objetivo del segundo estudio fue determinar si *B. cockerelli* Sulc. transmite el agente causal de enfermedades como Amarillamiento del Psílido, Punta Morada de la Papa o Zebra Chip en papa, e identificar el fitopatógeno. Se confirmó que *B. cockerelli* Sulc. es capaz de transmitir bacterias no cultivables. La eficiencia de la transmisión depende del estado biológico, tiempo de inoculación y número de psílicos por planta. Los adultos fueron más eficientes que las ninfas en adquirir la bacteria requiriendo un periodo mínimo de inoculación de 60 minutos; sin embargo, tres psílicos la transmiten en 15 min y un psílido en 60 min. Las plantas de papa infectadas produjeron más tubérculos, 6.62 en promedio, de los cuales 42.85 % fueron carentes de brote o presentaron brote de hilo. Se obtuvieron tres secuencias de bacterias y se depositaron en el GenBank (número de acceso FJ458403, FJ458404 y FJ458405).

Palabras clave: *Candidatus* Liberibacter, control químico, fitoplasmas, incidencia, infección, inoculación, paratrioza, psílido, punta morada de la papa, severidad, transmisión.

EFFECTIVENESS BIOLOGICAL OF INSECTICIDES AGAINST THE PSYLLID OF POTATO
(*Bactericera cockerelli* Sulc.) IN METEPEC, EDO. DE MÉXICO AND TRANSMISSION OF
NONCULTIVABLES BACTERIAS ASSOCIATED TO DISEASES OF POTATO (*Solanum
tuberosum* L.).

María Felipa López Durán, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009.

In order to identify effective insecticides for the management of potato psyllid *Bactericera cockerelli* Sulc., and to reduce Potato Purple Top (PPT) incidence, seven insecticides of different toxicological groups used in Metepec, Edo. of México, were evaluated. Significantly fewer eggs and adults were found on extract of nim and abamectina treatment with 69.8 and 84.8% effectiveness biological; whereas for nymphs, spiromesifen, bifentrina, abamectina and flufenoxuron provided adequate control (77.7% effectiveness). However, any product was effective to reduce the Potato Purple Top (PPT) incidence.

The objective of second study was to determinate whether *B. cockerelli* Sulc. can transmit causal agent of diseases like Yellow of Psyllid, Potato Purple Top or Zebra Chip of potato, and to identificate phytopathogen. Results indicate, that *B. cockerelli* Sulc. could transmit noncultivable bacteria. The efficiency of the transmission depends on the biological state, time of inoculation and number of psyllids by plant. The adults were more efficient than the nymphs in acquiring the bacterium requiring a minimum period of inoculation of 60 min; nevertheless, three psyllids transmit in 15 min and one psyllid in 60 min. The infected plants produced more tubercles, 6.62 in average, of which 42.85% were devoid of sprouting or presented hairy sprouting. Three sequences of bacteria associated with potato diseases were identified and they deposited in the GenBank (access number FJ458403, FJ458404 and FJ458405).

Key words: *Candidatus* Liberibacter, Chemical control, phytoplasmas, incidence, infection, inoculation, Paratrioza, Potato Purple Top, psyllid, severity, transmission.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Para México, el cultivo de papa *Solanum tuberosum* L. representa una actividad importante dentro de la horticultura nacional, debido a que tiene una producción de 1,750,797.34 ton, con un valor estimado de la producción de \$ 7,762,137.76 (SIAP, 2007). Sin embargo, es uno de los cultivos más afectados por fitopatógenos (Salazar, 1997); en el Edo. de México, sobresalen los daños ocasionados por las enfermedades de Punta Morada de la Papa (PMP), Amarillamiento del Psílido (AP) y Zebra Chip (ZC) que pueden limitar la producción y hacer incosteable su cultivo¹.

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

Por lo anterior, la presente investigación tuvo como finalidad evaluar la efectividad biológica de insecticidas contra el psílido de la papa en Metepec Edo. de México y determinar la capacidad de *B. cockerelli* como vector de patógenos asociados al cultivo de papa .

¹Comunicación personal. 2008. Joaquín T., S. Coordinador Campaña Fitosanitaria. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México.

CAPITULO 1

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS CONTRA EL PSILIDO DE LA PAPA (*Bactericera cockerelli* Sulc.) EN METEPEC, EDO. DE MÉXICO.

RESUMEN

Con el propósito de identificar insecticidas efectivos para el manejo del psílido de la papa *Bactericera cockerelli* Sulc., y reducir la incidencia de la Punta Morada de la Papa (PMP), se realizó un experimento en Metepec, Edo. de México, donde se evaluaron siete insecticidas de diferentes grupos toxicológicos usados en la región de estudio. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con ocho tratamientos y cuatro repeticiones; las evaluaciones se realizaron de julio a octubre de 2006. Los mejores insecticidas para el control de huevos y adultos del psílido fueron extracto de nim y abamectina con 69.8 y 84.8% de efectividad biológica, mientras que para ninfas fueron spiromesifen, bifentrina, abamectina y flufenoxuron con 77.7% de efectividad. Estos insecticidas pertenecen a diferentes grupos toxicológicos, no comparten el mismo modo de acción y se pueden utilizar en un sistema de manejo integrado. Sin embargo, ningún producto fue efectivo para reducir la incidencia de la Punta Morada de la Papa.

Palabras clave: control químico, fitoplasmas, incidencia, paratrioza, punta morada de la papa, severidad.

ABSTRACT

In order to identify effective insecticides for the management of potato psyllid *Bactericera cockerelli* Sulc., and to reduce Potato Purple Top (PPT) incidence, seven insecticides of different toxicological groups used in Metepec, Edo. of Mexico, were evaluated. It was used an experimental design of blocks at random with eight treatments and four repetitions; the evaluations were carried out from July to October of 2006. Significantly fewer eggs and adults were found on extract of nim and abamectina treatment with 69.8 and 84.8% of effectiveness biological; whereas for nymphs, spiromesifen, bifentrina, abamectina and flufenoxuron provided adequate control (77.7% effectiveness). These results provide comparative data on the effectiveness of insecticides belongs to different toxicological groups, and support the potential of using these as an integrated management tool against potato psyllid. However, any product was effective to reduce the Potato Purple Top (PPT) incidence.

Key words: Chemical control, phytoplasmas, incidence, Paratrioza, Potato Purple Top, severity.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es una actividad económica importante. Según datos del SIAP (2007) en México, la superficie sembrada fue de 65,617.05 ha, con una producción anual de 1,750,797.34 t, y un rendimiento de 27.06 t ha⁻¹, mismas que se destinan al consumo interno. No obstante, existen diversos factores que limitan su rentabilidad, siendo los fitosanitarios los de mayor importancia (Martínez *et al.*, 2007).

Entre las plagas de este cultivo destaca por su importancia el psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* Sulc., que puede limitar la producción nacional (Cadena y Galindo, 1985; SENASICA, 2004). La capacidad destructiva de este insecto radica en su alto potencial reproductivo y capacidad para transmitir fitoplasmas que provocan la enfermedad Permanente de Tomate en tomate, *Solanum lycopersicon* L., y Punta Morada de la Papa (PMP) en papa, *S. tuberosum* L. (Marín *et al.*, 1995; Garzón, 2003). Esta última, se distribuye en todo México y puede destruir el 95% de la producción (Ramírez *et al.*, 1978; Cadena *et al.*, 2003), debido a que disminuye la calidad de los tubérculos al provocar manchado interno así como la ausencia de brotación o brote de hilo de los mismos cuando se destinan a producción de semilla (Cadena *et al.*, 1985).

Para controlar esta plaga, se han usado insecticidas como Forato y Aldicarb aplicados a la siembra, así como Ometoato, Metamidofos e Imidacloprid aplicados al follaje, que disminuyen la incidencia y severidad de PMP al reducir la densidad poblacional y la habilidad del psílido para transmitir el fitoplasma, ya que no muere al momento de ingerir o estar en contacto con el ingrediente activo, sino que hay una acumulación de la acetilcolina, que disminuye el metabolismo del insecto, reflejado inicialmente por una disminución en la alimentación y reproducción (Liu *et al.*, 1993; Cadena, 1999).

En el Altiplano Potosino, Tiscareño *et al.* (2002) señalan que Imidacloprid ejerció una reducción de huevos y control de ninfas de *B. cockerelli* en el cultivo de chile serrano, a diferencia de Permetrina, Nim, Metamidofos y Endosulfan. Insecticidas sistémicos como Imidacloprid y Pyriproxifen, inhibieron la alimentación del psílido, pero insecticidas de contacto como Pymetrozine incitaron al psílido a alimentarse con mayor frecuencia en tomate, lo que aumentó la diseminación de patógenos en el cultivo y plantas aledañas (Liu *et al.*, 2004).

Díaz *et al.* (2005) propusieron el uso de productos bioracionales y entomopatógenos, debido a que las aplicaciones con Endosulfan (2.0 L ha⁻¹), fueron tan efectivas como las de productos bioracionales (extracto de Nim al 5% y sal sódica derivada de ácido graso a 6 g L⁻¹) y de productos microbianos a base de *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* para suprimir las poblaciones de ninfas del psílido.

Actualmente existen productos en el mercado para el control del psílido como Imidacloprid + Ciflutrin, Esfenvalerato, Fenpropatrina, Dimetoato, Fipronil, Acetamiprid, Lambda-cialotrina, Azatina y Spinosad (Aviles *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2008), pero se desconoce su efectividad *in situ* en zonas productoras del cultivo, por lo que continúan realizándose pruebas de efectividad con la finalidad de ofrecer productos alternativos que garanticen el control de la plaga sin deterioro de la salud del hombre y su entorno. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad biológica de siete insecticidas de diferentes grupos toxicológicos (Abamectina, Acetamiprid, Bifentrina, Flufenoxuron, Imidacloprid, Nim y Spiromesifen), contra el psílido de la papa y su impacto en la incidencia y severidad de la PMP en Metepec, Edo de México.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó de junio a octubre de 2006 en el municipio de Metepec, Edo. de México, ubicado en el Valle de Toluca, 19° 15' 00" N y 99° 36' 10" O, a 2670 m de altitud. Las condiciones ambientales prevalecientes durante el estudio fueron 15 ± 5 °C y precipitación media de 144.3 mm (SMN-CONAGUA)¹.

Se usaron plantas de papa (*S. tuberosum* L.) variedad Gigant, sembradas el 30 de junio y cosechadas el 21 de octubre de 2006. La preparación del terreno consistió en las prácticas de barbecho, rastreo, surcado, fertilización (NPK 18-46-00) y aplicación de flutolanil (Moncur[®] 50 WP AgrEvo).

Se evaluaron siete formulaciones comerciales de insecticidas pertenecientes a diferentes grupos toxicológicos y que constituyen los productos más utilizados para el control del psílido en el Valle de Toluca: 1) Abamectina, AGRIMEC[®] 1.8 CE, 1.2 L ha⁻¹, SYNGENTA AGRO, S.A. de C.V. México, lactonas macrocíclicas; 2) Acetamiprid, RESCATE[®] 20 PS, 375 g ha⁻¹, DuPont México, cloronicotinílicos; 3) Bifentrina, TALSTAR[®] 100 CE, 0.5 L ha⁻¹, FMC Agroquímica de México, piretroide; 4) Imidacloprid, CONFIDOR[®] 350 SC, 1.0 L ha⁻¹, BAYER de México, cloronicotinílicos; 5) *Azadirachta indica*, PHC[™] NEEEM[™], 50 mL en 15 L⁻¹, Plant Health Care de México, insecticida botánico; 6) Flufenoxuron, CASCADE[®] 5 CD, 75 mL en 100 L agua, BASF Mexicana, regulador de crecimiento; 7) Spiromesifen, OBERON[®] 240 SC, 1.0 L ha⁻¹, BAYER de México, inhibidor de la síntesis de ácidos tetrónicos. Se incluyó un testigo al que sólo se aplicó agua.

Las aplicaciones iniciaron 21 días después de la siembra (dds), se realizaron 10 aplicaciones después de la emergencia del cultivo, a intervalos de 7 d, hasta los 85 dds; a excepción de

¹ <http://smn.cna.gob.mx/>

Imidacloprid que se aplicó al momento de la siembra. Se utilizó una mochila manual Swissmex de 15 L y boquilla de cono hueco D-6 marca Yamaho[®]. El equipo se calibró para aplicar 312.5 L ha⁻¹.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con ocho tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por cinco surcos de 7 m de largo, 0.5 m entre plantas y 0.90 m entre surcos (31.5 m²). La parcela útil se conformó por los tres surcos centrales.

2.1 Variables evaluadas

2.1.1 Adultos de *B. cockerelli* por trampa

Se utilizaron cinco trampas amarillas a una distancia de 60 m entre ellas, cilíndricas (20x13 cm), colocadas en cuatro puntos cardinales (NE, SE, SO y NO) y al centro de la parcela experimental, soportadas por estacas a una altura de 50 cm. Las trampas se remplazaron semanalmente, utilizando hojas removibles de papel lustre amarillo impregnadas con una ligera capa adhesiva (Tangle up[®]). Para cuantificar el número de adultos capturados por trampa se utilizó un microscopio estereoscópico.

2.1.2 Adultos, huevos y ninfas por foliolo

Para determinar el número de individuos por tratamiento, se seleccionó al azar un foliolo del tercio medio de la planta (Nava *et al.*, 2006), de 10 plantas por parcela útil, 40 plantas por tratamiento en total para registrar el número de huevos, ninfas y adultos. Los muestreos se realizaron semanalmente durante todo el ciclo del cultivo y antes de la aplicación de los tratamientos, con los datos se determinó el porcentaje de efectividad biológica de los tratamientos mediante la formula de Abbott:

% EB= (Tτ-Tí)/Tτ, donde

Tτ=Número de individuos en el tratamiento testigo

Tí=Número de individuos en el tratamiento í.

2.1.3 Incidencia de PMP

La incidencia PMP por unidad experimental se registró semanalmente y durante todo el ciclo del cultivo, mediante el registro del número de plantas sanas y enfermas que presentaran los síntomas causados por el fitoplasma, como clorosis foliar, enchinamiento, acartonamiento y doblamiento de la hoja en forma de empanada, coloración púrpura, acortamiento y engrosamiento de entrenudos, achaparramiento, abultamiento de yemas, y presencia de tubérculos aéreos, utilizando la fórmula:

$$I_i = \frac{\sum n_i}{N_i}$$

donde, I_i es la incidencia de la enfermedad en el momento i ; n_i es el número de plantas enfermas en el momento i ; N_i es el número total de plantas evaluadas en el momento i .

La comparación del progreso de la enfermedad, se realizó utilizando la variable área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), con la fórmula:

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

donde, n es el número de mediciones, y_i es el porcentaje de plantas con síntoma de punta morada al día de medición i , y t_i es el número de días desde la siembra a la fecha de medición i . La tasa de infección aparente se obtuvo al someter los datos de incidencia al análisis de curva mediante la inversa del parámetro b del modelo Weibull (Cambell y Madden, 1990). El modelo se implementó mediante el procedimiento Dudd y se ejecutó con PROC NLIN (SAS[®], 2004) con la

fórmula:

$$y = 1 - e^{-\left[\left(\frac{t}{b}\right)^c\right]}$$

donde, y es la intensidad de enfermedad en % de incidencia, e la base de los logaritmos naturales, t el tiempo en días después de la inoculación, b el inverso del estimador de la tasa de infección aparente y c es un estimador de la forma de la curva.

2.1.4 Rendimiento

El rendimiento por unidad experimental se cuantificó pesando el total de la producción (tubérculos sanos y enfermos) a los 114 dds. De cada unidad experimental, se tomaron 3 kg de tubérculos al azar, y se almacenaron hasta la brotación (5 meses), se separaron en sanos y enfermos por PMP y se determinó la incidencia y severidad por tratamiento mediante la escala propuesta por Cadena (1996) donde: 1) sin pardeamiento; 2) pardeamiento muy leve; 3) leve; 4) leve moderado; 5) moderado; 6) moderado fuerte y 7) fuerte. El rendimiento se expresó en $t\ ha^{-1}$.

2.2 Análisis estadístico

Los datos de las variables adultos, huevos y ninfas fueron transformados con la función $\text{Log}_{10}(x + 1)$ para el cálculo de las varianzas con ANOVA, usando SAS (2004). Las medias se compararon usando DMS ($\alpha \leq 0.05$).

III.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Adultos por trampa

Los adultos de *B. cockerelli* estuvieron presentes todo el ciclo de cultivo. La población fluctuó de 2 a 17 adultos por semana; con la mayor población al final del desarrollo vegetativo (79 dds), asociándose a temperaturas de 20 °C, óptimas para su desarrollo (Marín *et al.*1995), a migraciones del psílido y presencia de malezas alrededor de la parcela como la jarilla (*Senecio salignus* DC = *Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) H. E. Robins. & Brett.). Por tanto, el coeficiente de variación fue alto entre fechas durante el desarrollo del estudio a pesar de que el total de adultos por trampa no difirió entre los puntos cardinales (Cuadro 1). De esta forma, a los 21-36 dds se registró una mayor densidad de individuos en el sureste y suroeste, que coincidió con la dirección de las corrientes de aire en la parcela experimental y posteriormente la población de psílicos se distribuyó uniforme dentro ésta. Este comportamiento fue reportado por Tiscareño *et al.* (2002) al evaluar la efectividad biológica de insecticidas para el control de insectos chupadores en el cultivo de chile en el Altiplano Potosino. Según Cadena *et al.* (1985) y Nava (2003) la densidad de adultos por trampa y en consecuencia la incidencia del “permanente del tomate” es influida por la fecha de siembra. Fechas tempranas de tomate y papa, en general, son más susceptibles puesto que alrededor de 10 psílicos capturados en las trampas son suficientes para causar incidencias de 30 a 57%, aspecto que se acentúa si la infestación ocurre durante el periodo crítico de infección, entre la quinta y sexta floración en tomate. Sin embargo, a pesar de que la parcela experimental se estableció en una fecha tardía (30 junio) la población de adultos durante todo el ciclo de cultivo superó el umbral de acción definido por Nava (2003).

Cuadro 1. Densidad poblacional de adultos de *B. cockerelli* por punto cardinal y su significancia en cultivo de papa *S. tuberosum* var. Gigant a diferentes días después de la siembra en Metepec, Edo. de México.

Posición	Días después de la siembra													Promedio (no. adultos)
	7	14	21	28	36	42	50	58	64	71	79	85	91	
NO	1	1	0	1	1	0	4	4	4	2	9	1	2	2.14 a*
NE	1	1	1	0	0	1	0	6	2	1	0	0	0	0.92 a
C	0	2	3	0	2	1	3	2	2	4	6	3	0	2.00 a
SO	1	0	6	4	4	2	3	0	1	0	0	1	0	1.57 a
SE	2	1	4	3	6	3	3	2	-	1	2	3	0	2.38 a
Total	5	5	14	8	13	7	13	14	9	8	17	8	2	9.46

*Medias con diferente letra en una columna son diferentes ($\alpha \leq 0.05$).
C. V.=100.5

3.2 Adultos por foliolo

La población de adultos varió de 0 a 2 individuos por foliolo hasta los 71 dds, sin diferencias entre tratamientos. Una semana después (79 dds), se presentó el menor número de individuos en las plantas tratadas con nim y abamectina (0.07) y la mayor densidad (0.45) en el testigo (sólo agua) que significó un 84.4% de efectividad biológica. Sin embargo, 85 dds todos los tratamientos tuvieron un comportamiento similar al testigo (Cuadro 2).

Los insecticidas que mostraron un efecto significativo en contra de adultos de *B. cockerelli* fueron el nim y abamectina (Cuadro 2), el nim mostró repelencia al encontrarse de uno a tres adultos posados sobre las plantas. Estos resultados coinciden con González *et al.* (2006) quienes obtuvieron buen control del insecto con aplicaciones de nim, pero anotan que las diferencias entre tratamientos se evidenciaron hasta los 79 dds. Resultados similares fueron encontrados por Weathersbee *et al.* (2005) al evaluar productos contra el psílido *Diaphorina citri*, entre ellos el

nim, éste actuó como repelente durante 7 d, pero no tuvo efectos en la preferencia para la oviposición entre plantas tratadas y no tratadas en laboratorio e invernadero.

Cuadro 2. Promedio individuos de *B. cockerelli* Sulc. en tres estados de desarrollo, por foliolo en diferentes días después de la siembra en Metepec, Edo de México.

Tratamiento	Adultos			Huevos			Ninfas		
	71 \varnothing	79	85	71	79	85	71	79	85
Abamectina	0.00 a	0.07 b	0.07 a	3.37 a	2.50 d	3.50 a	2.62 a	3.87 b	3.37 c
Acetamiprid	0.00 a	0.26 a	0.11 a	5.87 a	5.25 c	6.25 a	5.12 a	4.75 b	3.87 b
Bifentrina	0.07 a	0.15 a	0.07 a	4.00 a	3.00 c	2.75 a	3.50 a	3.00 b	3.25 c
Flufenoxuron	0.07 a	0.31 a	0.15 a	4.75 a	3.37 c	4.37 a	3.50 a	4.50 b	2.75 c
Imidacloprid	0.00 a	0.26 a	0.07 a	4.87 a	6.87 b	4.62 a	5.37 a	5.12 b	4.62 b
Nim	0.07 a	0.07 b	0.07 a	4.25 a	2.37 d	4.87 a	6.25 a	6.50 a	7.00 b
Spiromesifen	0.00 a	0.26 a	0.07 a	3.25 a	4.75 c	4.00 a	2.62 a	1.50 b	3.37 c
Testigo	0.15 a*	0.45 a	0.15 a	5.62 a	7.87 a	5.62 a	7.00 a	6.75 a	7.75 a

\varnothing Días después de la siembra

*Medias con diferente letra en una columna son diferentes ($\alpha \leq 0.05$).

3.3 Huevos por foliolo

La presencia de huevos de *B. cockerelli* se registró a los 42 dds, y al igual que para adultos la mayor infestación (35 huevos por foliolo) se registro en el testigo, mientras que la abamectina y nim mostraron la menor incidencia (Cuadro 2) y 69.8% de efectividad biológica a los 79 dds. Estas diferencias se constataron al realizar el análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$), aunque no se precisó si el efecto de los productos se debió a un poder repelente sobre los adultos, o inhibitorio de la oviposición. Dado que la abamectina tiene acción translaminar, es probable que la actividad residual del insecticida no permitiera el establecimiento de adultos y consecuentemente la

oviposición (Lagunes y Villanueva, 1995). El nim, como lo indican Schmutterer y Rembold (1980) contiene compuestos con actividad inhibidora de la oviposición, esterilizante, antialimentaria y reguladora de crecimiento (Steets y Schmutterer, 1975). Estos resultados coinciden con Weathersbee *et al.* (2005) pues mediante la aplicación de un bioplaguicida a base de nim redujeron la oviposición de *Diaphorina citri*, tanto en condiciones de laboratorio como de invernadero. Según Steets y Schmutterer (1975) y Schulz (1981) la baja fecundidad y/o retardo en la oviposición se debe a que la azadiractina y otros principios activos del nim provocan un efecto esterilizante reflejado en el encogimiento de oocitos y ovariolos, seguido de una reabsorción a nivel del vitelario y el oviducto. La baja actividad del imidacloprid, contrario a lo registrado por Liu y Trumble (2004), probablemente se deba a la influencia del cultivar en la supervivencia del psílido lo cual alteró la eficacia del plaguicida. Aunque Salked y Potter (1953) señalan que la efectividad de los insecticidas en la fase del huevo es variable, porque depende de la susceptibilidad del embrión, así como de la permeabilidad del corion y de las membranas embrionarias, factores que cambian con la especie en consideración, edad y grado de desarrollo del huevo.

3.4 Ninfas por foliolo

La población de ninfas se hizo evidente hasta los 28 dds, incrementándose gradualmente en todos los tratamientos, sin embargo, a partir de 42 dds la población aumentó rápidamente en las plantas testigo, hasta 40 ninfas en promedio a los 85 dds. Contrario a ello, donde se aplicó spiromesifen, el número de ninfas no rebasó cinco individuos durante el ciclo de cultivo.

El análisis de varianza indicó diferencias entre insecticidas ($\alpha \leq 0.05$) a 79 y 85 dds, donde sobresalió el insecticida OBERON[®] (spiromesifen), con el menor número de ninfas (1.05 y 3.37 a los 79 y 85 dds, respectivamente) con relación al testigo con 6.75 y 7.75 ninfas por foliolo, a

los 79 y 85 dds respectivamente y 77.7% de efectividad biológica, lo que demuestra el espectro de acción y la residualidad que dicho producto posee. Contrario a lo anterior, el nim, imidacloprid y acetamiprid resultaron inefectivos para suprimir las poblaciones de ninfas en el cultivo (Cuadro 2). Resultados que concuerdan parcialmente con lo encontrado en California, EE.UU., pues se reporta que densidades de 3 a 5 ninfas por planta de papa fueron suficientes para producir síntomas iniciales del “amarillamiento por psílido”, y que se requieren de ≥ 15 ninfas por planta para producir síntomas severos (Anónimo 1985 y 2002).

Al parecer la efectividad del spiromesifen se debe a que es un producto de reciente introducción (2005 en California, EE. UU. y Baja California, México) y tiene un modo de acción (inhibición de la biosíntesis lípida) diferente al de los insecticidas y acaricidas que actualmente existen en el mercado. Por el contrario, la inefectividad del imidacloprid para el control del *B. cockerelli* se relaciona con la exposición continua y con el posible desarrollo de resistencia como fue demostrado por Liu y Trumble (2007), al trabajar con poblaciones de psílicos invasivos de California, EE.UU. Mientras que los tratamientos con bifentrina, abamectina y flufenoxuron mostraron efectividad biológica similar, pertenecen a diferente grupo toxicológico (piretroide, lactona macrocíclica y acilurea o regulador de crecimiento), no comparten el mismo modo de acción y no se ha observado resistencia cruzada entre éstos (Lagunes y Villanueva, 1995). Además, han registrado un buen control de los psílicos *Cacopsylla pyri* y *Ctenarytaina spatulata*, con abamectina y flufenoxuron, este último incluso se propuso como estrategia de control para el manejo de la resistencia y por no tener efectos negativos en organismos benéficos (Kocourek y Stará, 2006; Pérez *et al.*, 2006). La efectividad de los insecticidas spiromesifen, abamectina bifentrina y flufenoxuron se reconfirmó en una parcela de papa variedad Marciana de dos meses

de edad, ubicada en Mesa de Dolores, municipio de Valle de Bravo, Estado de México, en marzo de 2007, con infestaciones de 8-15 psílicos por trampa por semana (Joaquín, 2007)².

La aplicación alternada y racional de estos cuatro productos, se puede integrar en un programa de manejo de la resistencia de insecticidas. Sin embargo, se debe considerar que la variedad o cultivar empleado pueden afectar la efectividad de los insecticidas y la aptitud biológica del psílido (Liu and Trumble, 2004; Liu *et al*, 2006; Liu and Trumble, 2006).

3.5 Incidencia de PMP

Los primeros síntomas de PMP se detectaron a los 21 dds en todos los tratamientos (Figura 1), debido a que probablemente algunas semillas estaban infectadas con el fitoplasma. A partir de ese momento inició el progreso de la enfermedad con tasas de infección aparente entre 0.404 (bifentrina) y 0.910 (imidacloprid) unidades por día (Cuadro 3). La incidencia incrementó de manera gradual conforme se desarrollo el cultivo y varió de 0.39% en abamectina a 13.07% con nim a los 75 dds. En los restantes tratamientos la incidencia no rebaso 10%. Sin embargo, a partir de esa fecha hubo un aumento repentino de plantas enfermas que se acentuó al final del cultivo. La incidencia de PMP fue mayor en plantas tratadas con nim con 717.3 unidades de área bajo la curva (ABCPE) y 38% de incidencia máxima (IM); seguida de las plantas testigo con 692.9 unidades de ABCPE y 31% de IM; valores que no difieren respecto a los demás tratamientos ($\alpha > 0.05$), lo que permite aseverar que ningún tratamiento fue efectivo para retrasar o disminuir la incidencia de la enfermedad.

Los resultados de este estudio coinciden con Tiscareño *et al.*(2002) quienes anotan que después de evaluar varios productos insecticidas ninguno fue lo suficientemente efectivo para

² Comunicación personal. 2008. Joaquín T., S. Coordinador Campaña Fitosanitaria. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México.

controlar la enfermedad. Esto confirma la eficiencia del psílido para transmitir fitoplasmas, pues una población mínima (~1 adulto/trampa/semana) es suficiente para causar porcentajes de plantas enfermas elevados ($\geq 30\%$) (Nava 2003).

La distribución de plantas infectadas por fitoplasmas en campo son un referente para la identificación de insectos vectores presentes y algunos aspectos de su comportamiento (Weintraub *et al.* 2006). Sin embargo, la presencia de múltiples fitoplasmas en campo y la interacción entre ellos en las plantas e insectos, pueden ocasionar una variación de los síntomas (Zhang *et al.*, 2004). En este estudio, se observó que las invasiones del psílido dentro de la parcela experimental coincidieron con la orientación de los vientos, y esto a su vez con la ocurrencia de plantas con síntomas característicos de PMP.

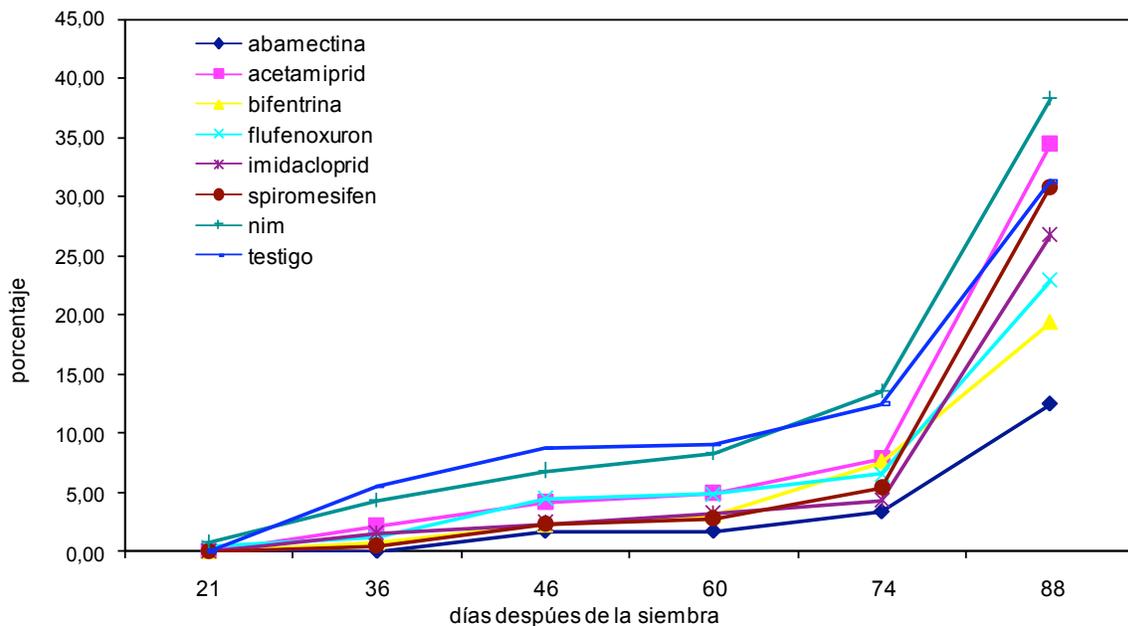


Figura 1. Progreso de PMP a través del tiempo en cada tratamiento (s) de insecticidas aplicados en papa *Solanum tuberosum* var. Gigant en Metepec, Edo. de México.

Cuadro 3. Incidencia máxima (IM%), área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y tasa de infección aparente (TIA) de PMP en papa *Solanum tuberosum* var. Gigant en Metepec, Edo. de México.

Tratamiento	IM(%)	ABCPE	TIA	^b r ²	Pr>F ^z
Abamectina	16.61 a ^a	171.9 a	0.709	0.68	0.0001
Acetamiprid	34.41 a	497.4 a	0.820	0.77	0.0001
Bifentrina	19.38 a	320.8 a	0.404	0.39	0.0011
Flufenoxuron	22.91 a	387.9 a	0.501	0.46	0.0003
Imidacloprid	26.72 a	340.0 a	0.910	0.86	0.0001
Spiromesifen	30.84 a	286.7 a	0.883	0.85	0.0001
Nim	38.26 a	717.3 a	0.810	0.74	0.0001
Testigo	31.26 a	692.9 a	0.545	0.51	0.0001

^a Tratamientos con diferente letra son diferentes ($\alpha \leq 0.05$).

^b Coeficiente de determinación entre los valores predichos y observados

^z Significancia de la prueba de predichos y observados.

3.6 Rendimiento

No se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, de la variable rendimiento del cultivo ($\alpha > 0.05$) (Cuadro 4). En general, el rendimiento por tratamiento fue bajo, debido probablemente a la intervención de factores como: 1) siembra tardía de la papa para la región de estudio; 2) susceptibilidad de la variedad Gigant a la PMP; 3) presencia de psíldos durante todo el ciclo de cultivo; 4) ubicación y condiciones prevalecientes durante el estudio.

Los rendimientos variaron de 3.33 a 5.77 t ha⁻¹, valores inferiores al promedio estatal (28.29 t ha⁻¹) para el Estado de México (SIAP, 2007). Los bajos rendimientos obtenidos, la baja calidad comercial y la incidencia de PMP registrada confirman lo expuesto por Nava (2003) respecto a que los ataques de *B. cockerellii* en etapas tempranas del cultivo reducen el número y calidad del producto. La baja productividad en los tratamientos se asocia a la presencia de altos porcentajes

de brote de hilo o sin brote de los tubérculos hasta en 100% y un manchado interno severo (Cuadro 4), resultados que se contraponen con lo reportado por Cadena *et al.* (2003), quienes señalan que la severidad de manchado o pardeamiento en los tubérculos de la variedad Gigant es de leve a leve-moderado (severidad 3 y 4) y con brote fino común de los tubérculos (Figura 2 y 3). Al parecer las diferencias en la severidad del daño quizás se deban al momento en que ocurre la infestación de psílidos, puesto que si la infestación ocurre antes o durante el inicio de la formación de los tubérculos, aún si las poblaciones son relativamente bajas, la producción es seriamente afectada. En cambio, si el arribo de insectos ocurre una vez que los tubérculos se han formado, las plantas toleran el daño (Anónimo, 1985 y 2002).



Figura 2. Tubérculos de papa con brote de hilo o sin brote en el tratamiento testigo.



Figura 3. Tubérculos de papa con manchado interno en el tratamiento testigo.

Cuadro 4. Rendimiento ($t\ ha^{-1}$) y daños en tubérculos en papa *S. tuberosum* por tratamiento.

Tratamiento	Rend. ($t\ ha^{-1}$)	TSS (%)	TBH (%)	TSB (%)	[†] SMIT
Abamectina	4.34 a	37.5	33.33	29.17	5
Acetamiprid	4.19 a	37.5	0.0	62.5	6
Bifentrina	4.76 a	42.86	28.57	28.57	5
Flufenoxuron	4.52 a	40.0	28.0	32.0	7
Imidacloprid	4.34 a	36.0	36.0	28.0	6
Spiromesifen	5.77 a	38.46	61.54	0.0	6
Nim	3.33 a	36.0	28.0	36.0	7
Testigo	5.17 a	35.71	28.58	35.71	7

TSS= Tubérculos sin síntomas

TBH= Tubérculos con brote de hilo

TSB= Tubérculos sin brote

SMIT= Severidad manchado interno del tubérculo

[†]Escala de valores propuesta por Cadena (1996).

El umbral económico, en el caso de insectos vectores, tiende a ser cero, estándar que puede lograrse en cultivos protegidos pero en cultivos abiertos resulta imposible tener un control de todos los factores que afectan a la planta y merman su producción. En este caso, y como lo señalan De León y Becerra (1991) a pesar de que los insecticidas mantuvieron las densidades de población relativamente bajas, su efecto no fue contundente para disminuir la incidencia y diseminación de fitoplasmas asociados a la PMP.

El uso de insecticidas para el control del psílido es una herramienta importante, sin embargo, no debe ser la única estrategia de manejo, al no ser redituable, debido a que implica el aumento de los costos de producción, contaminación del ambiente, mayor presión de selección en las poblaciones del insecto por las frecuentes y elevadas dosis en las aplicaciones del insecticida, lo

cual ocasionaría el pronto desarrollo de la resistencia del insecto ante varios grupos toxicológicos.

Bactericera cockerelli es un insecto con características morfológicas y biológicas que le permiten desplazarse a grandes distancias para encontrar hospedantes que le sirven de alimento, protección y reproducción. Es conveniente realizar los primeros muestreos del psílido, en las orillas del cultivo de acuerdo a la dirección del viento, debido a que las primeras poblaciones se localizan en estos lugares, aunque después no presenta ningún patrón de distribución. Mientras que en una distribución vertical muestran cierta preferencia por el tercio medio de la planta.

La composición y diversidad vegetativa de los hábitats donde se establecen cultivos vulnerables a *B. cockerelli* y a fitoplasmas, influyen en la interrelación planta-vector-patógeno teniendo efectos en su dispersión, distribución, en la incidencia y severidad de la enfermedad PMP, lo cual ha permitido alcanzar epidemias de enormes dimensiones en el cultivo.

Establecer fechas de siembra, coordinar prácticas culturales en el manejo de cultivos susceptibles, evitar focos de infestación, utilizar semilla-tubérculo sano, la utilización del control biológico, el establecimiento de medidas y técnicas de aplicación para el control químico y el control legal a nivel regional, pueden facilitar el manejo integrado de psílido en cultivos susceptibles.

IV. CONCLUSIONES

Los mejores insecticidas para el control de huevos y adultos del psílido de la papa fueron Nim y Abamectina, mientras que para ninfas lo fueron el Spiromesifen, Bifentrina, Abamectina y Flufenoxuron. Estos insecticidas pertenecen a diferente grupo toxicológico, no comparten el modo de acción y se pueden utilizar en un sistema de manejo de la resistencia a insecticidas. Sin embargo, ningún producto fue efectivo para retrasar o disminuir la incidencia de la enfermedad.

V. LITERATURA CITADA

Anónimo. 1985. Integrated pest management for tomatoes. Second edition. University of California. Publication 3274. Oakland, CA, USA. 105 p.

Anónimo. 2002. UC IPM Pest management guidelines. University of California Publication 3470. Oakland, CA, USA. 63 p. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/||selectnewpest.>

[tomatoes.html](#)

Aviles, G., M. C., J. A. Garzón T., J. A. Marín, y P. H. Caro M. 2003. El psílido del tomate *Paratyoza cockerelli* (Sulc.): biología, ecología y su control. *In*: Taller sobre *Paratyoza cockerelli* Sulc. como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Fundación Produce Sinaloa, A. C. 2 da. ed. Culiacán, México. pp: 21- 35.

Cadena, H. M. A. 1996. La Punta Morada de la Papa en México: Efecto de cubiertas flotantes, genotipos y productos químicos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14(1): 20-24.

Cadena, H. M. A. 1999. Potato Purple Top in México: III. Effects of plant spacing and insecticide application. *Rev.Mex. Fitopatol.* 17(2): 91-96

Cadena, H. M. A., y J. Galindo A. 1985. Reducción de la incidencia de la Punta Morada de la Papa por medio de fechas de siembra, genotipo de la planta y aplicación de insecticidas. *Rev. Mex.Fitopatol.* 3(2): 35-40.

Cadena, H. M. A., R. Guzmán P., M. Díaz V., T. E. Zavala Q., O. S. Magaña T., I. H. Almeida L., H. López D., A. Rivera P., y O. Rubio C. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en los valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21(3): 248-258.

- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Willey and Sons, New York. 532 p.
- De León, M. J. R., y E. N. Becerra L. 1991. Evaluación de insecticidas contra áfidos y mosquita blanca y su efecto en el porcentaje de plantas virosas en tomate. XXVI Congreso Nacional de Entomología, Univ. Cristóbal Colon. pp: 272-273.
- Díaz, G. O., E. I. Tejada M., y L. Avalos A. 2005. Efecto de insecticidas biorracionales y mezclas de hongos sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc.)(Homoptera: Psyllidae). Entomol. Mex. 5: 539-541.
- SIAP. 2007. Producción agrícola por cultivo y por estado <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1043&tipo=1> Consulta abril 12 de 2008.
- Garzón, T. J. A. 2003. Asociación de *Paratrioza cockerelli* Sulc. con enfermedades en papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon lycopersicon* Mil. Ex Fawnl) en México. *In*: Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Fundación Produce Sinaloa, A.C. 2 da. ed. Culiacán, México. pp: 79- 87.
- González, V. R., E. Guerrero, R. Mendoza V., M. Flores D., y J. Ponce S. 2006. Efecto insecticida de extractos vegetales en *Bactericera cockerelli* (Homoptera:Psyllidae). Entomol. Mex. 5(2):1022-1025.
- Kocourek, F., and J. Stará. 2006. Management and control of insecticide-resistant pear psylla (*Cacopsylla pyri*). J. Fruit Ornamental Plant Res. 14(3):167-174.
- Lagunes T., A., y J. A. Villanueva J. 1995. Toxicología y Manejo de Insecticidas. Colegio de Postgraduados. 264 p.

- Liu, D., L. Johnson, and T. J. Trumble. 2006. Differential responses to feeding by the tomato/potato psyllid between two tomato cultivars and their implications in establishment of injury levels and potential of damaged plant recovery. *Insect Sci.* 13:195-204.
- Liu, D., and T. J. Trumble. 2004. Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 97(3):1078-1085.
- Liu, D., and T. J. Trumble. 2006. Ovipositional preference, damage thresholds, and detection of the tomato-potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera:Psyllidae) on selected tomato accessions. *Bull. Entomol. Res.* 96:1-8.
- Liu, D., and T. J. Trumble. 2007. Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). *Entomol. Exp. Appl.* 123:35-42.
- Liu, M. Y., and J. E. Casida. 1993. High affinity binding of (3H) imidacloprid in the insect acetylcholina receptor. *Pestic Biochem. Physiol.* 46: 40-46.
- Liu, T. X. 2004. Toxicity and efficacy of spiromesifen, a tetrionic acid insecticide, against sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on melons and collards. *Crop Protection* 23(6):505-513.
- Marín, J. A., J. A. Garzón T., A. Becerra F., C. Mejía A., R. Bujanos M., y K. F. Byerly M. 1995. Control biológico y morfología del salerillo *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae) vector de la enfermedad “Permanente del Tomate” en el Bajío. *Manejo Integrado de Plagas* 38:25-32.
- Martínez, S. J. P., N. E. Leyva L., K. Aviña P., y J. C. Ochoa S. 2007. La “Punta Morada” de la papa en México. *Claridades.* pp: 27-33.
- Nava, C. U. 2003. Muestreo, monitoreo y umbrales económicos del psílido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc.). *In: Taller sobre Paratrioza cockerelli* Sulc. como plaga y vector de

- fitoplasmas en hortalizas. Fundación Produce Sinaloa, A. C. 2 da. ed. Culiacán, México. pp: 57-78.
- Nava, C. U., J. Maltos B., y M. C. Aviles G. 2006. Disposición espacial y elaboración de planes de muestreo del psílido del tomate *Bactericera (=Paratrioza) cockerelli* (Sulc.). Entomol. Mex. 5(2):714-719.
- Pérez, O. R., P. Mansilla V., and P. Mansilla S. 2006. Biology and control of the new eucalyptus pest *Ctenarytaina spatulata* Taylor in Galicia. Bol. Sanidad Veg. Plagas. 32.3:429-437.
- Ramírez, M. M., and J. Ramos-Elorduy C. 1978. Populations of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) on 12 varieties of potato in Chapingo, México, and their possible relation to “purple-top wilt” disease. Agrociencia 34:79-90.
- Salked, E. H., and C. Potter. 1953. The effect of the age and stage of development of insect eggs on their resistance to insecticides. Bull. Entomol. Res. 44: 527-580.
- SAS (SAS Institute Inc.). 2004. SAS/STAT[®] 9.1 User’s Guide. Cary, NC. SAS Institute Inc. USA. 5136 p.
- Schmutterer, H. and H. Rembold. 1980. Effects of some pure fractions of extracts from neem (*Azadirachta indica*) seeds on feeding activity and metamorphosis of *Epilachna varivestis* (Col:Coccinellidae). Z. Angew. Ent. 89: 179-188.
- Schulz, W. P. 1981. Pathological alterations in the ovarioles of *Epilachna varivestis* induced by an extract from neem kernels. Proc. 1st. Int. Neem Conf. (West Germany, 1980). pp: 81-96.
- SENASICA. 2004. Manual operativo para la atención de la Paratrioza (*Bactericera cockerelli* Sulc). México, D. F. 43 p.
- Steets, R., and H. Schmutterer. 1975. The effect of azadirachtin on the longevity and reproduction of *Epilachna varivestis* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae). Z. PflSchutz J. Plant Dis. Prot. 82: 176-179.

- Tiscareño, I. M. A., L. D. Ortega A., C. Rodríguez H., y C. Villar M. 2002. Efectividad biológica de insecticidas para el control de insectos chupadores en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en el altiplano potosino. BIOTAM Nueva Serie 13(3):47-62.
- Vega, G. M. T., J. C. Rodríguez M., O. Díaz G., R. Bujanos M., D. Mota S., J. L. Martínez C., A. Lagunes T., y J. A. Garzón T. 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). Agrocencia 42(4):463-471.
- Weathersbee, A. A., and C. L. McKenzie. 2005. Effect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition and development of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). Fl. Entomol. 88(4):401-407.
- Weintraub P. G. and Beanland L. 2006. Insects vectors of phytoplasmas. Ann. Rev. of Entomol. 51: 91-111.
- Zhang, J., S. A. Hogenhout,, L. R. Nault , C. W. Hoy, and S. A. Miller2004. Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. Phytopathology. 94:842-849.

CAPITULO 2

TRANSMISIÓN DE BACTERIAS NO CULTIVADAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.).

RESUMEN

Bactericera cockerelli Sulc. es el principal vector de bacterias no cultivadas asociadas a enfermedades en papa; en esta interacción insecto-bacteria, es importante determinar el periodo que el insecto tarda en infectarse y es capaz de transmitir el patógeno a la planta. El objetivo del estudio fue determinar si *B. cockerelli* Sulc. transmite el agente causal de enfermedades como Amarillamiento del Psílido, Punta Morada de la Papa o Zebra Chip en papa, e identificar el fitopatógeno. Se realizaron diferentes experimentos considerando la fuente de inóculo, estado biológico del psílido, tiempo de inoculación y número de psílicos por planta. Se confirmó que *B. cockerelli* Sulc. es capaz de transmitir bacterias no cultivables. La eficiencia de la transmisión depende del estado biológico, tiempo de inoculación y número de psílicos por planta. Los adultos fueron más eficientes que las ninfas en adquirir la bacteria requiriendo un periodo mínimo de inoculación de 60 minutos; sin embargo, tres psílicos la transmiten en 15 min y un psílido en 60 min. Las plantas de papa infectadas produjeron más tubérculos, 6.62 en promedio, de los cuales 42.85 % fueron carentes de brote o presentaron brote de hilo. Se obtuvieron tres secuencias de bacterias y se depositaron en el GenBank (número de acceso FJ458403, FJ458404 y FJ458405).

Palabras clave: *Candidatus* Liberibacter, infección, inoculación, paratiroza, psílido, transmisión.

ABSTRACT

Bactericera cockerelli Sulc. is the main vector of noncultivable bacteria associated to diseases of potato; in this interaction insect-bacterium, it is important to determine the period that the insect takes in becoming infected and is able to transmit the pathogen to the plant. The objective of this study was to determine whether *B. cockerelli* Sulc. can transmit causal agent of diseases like Yellow of Psyllid, Potato Purple Top or Zebra Chip of potato, and to identify the phytopathogen. Different experiments were conducted considering the source of inoculum, psyllid biological state, inoculation period and number of psyllids by plant. Results indicate, that *B. cockerelli* Sulc. could transmit noncultivable bacteria. The efficiency of the transmission depends on the biological state, time of inoculation and number of psyllids by plant. The adults were more efficient than the nymphs in acquiring the bacterium requiring a minimum period of inoculation of 60 min; nevertheless, three psyllids transmit in 15 min and one psyllid in 60 min. The infected plants produced more tubercles, 6.62 in average, of which 42.85% were devoid of sprouting or presented hairy sprouting. Three sequences of bacteria associated with potato diseases were identified and they deposited in the GenBank (access number FJ458403, FJ458404 and FJ458405).

Key words: *Candidatus* Liberibacter, infection, inoculation, paratuberculosis, psyllid, transmission.

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las principales especies hortícolas cultivadas en México, y también es uno de los cultivos más afectados por fitopatógenos (Salazar, 1997). La presencia de enfermedades como la Punta Morada de la Papa (PMP), Amarillamiento del Psílido (AP) y Zebra Chip (ZC) pueden limitar la producción, ésta última se registro recientemente en EE.UU. y Centroamérica (Hansen *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2009; Liefing *et al.*, 2009). Los síntomas ocasionados por ZC se asemejan a aquellos causados por la PMP y AP, debido a que las plantas afectadas exhiben amarillamiento y enrollamiento de las hojas hacia el haz, disminución del crecimiento y desarrollo de la planta, acortamiento de entrenudos, engrosamiento de nudos, brote anormal de yemas axilares, formación de pequeños tubérculos aéreos en la parte basal del tallo y necrosis vascular de tubérculos. En un estado avanzado, la planta se marchita y los folíolos jóvenes adquieren tonalidades que varían del amarillo a morado (Cadena *et al.*, 1986). El rendimiento y calidad de los tubérculos disminuye considerablemente, debido a que se desarrollan tubérculos secundarios pequeños (Martínez *et al.*, 2007) y los almidones se transforman en azúcares provocando un manchado obscuro en su interior que afecta su calidad (Arsla *et al.*, 1985; Bayer de México, 2005; Abad *et al.*, 2009). Cuando la producción se destina a la obtención de tubérculo-semilla, éstos no producen plantas o no brotan, o si lo hacen, producen brotes finos o débiles (Cadena *et al.*, 1986).

Hasta hace poco se asumía que el AP era ocasionado por la inyección de toxinas de *B. cockerelli* Sulc. al alimentarse de la planta (Severin, 1940; Wallis, 1948; Liu *et al.*, 2006). La PMP se asocia con al menos cinco grupos de fitoplasmas 16SrI-A, 16SrII, 16SrIV, 16SVI, 16SXII (Ramírez *et al.*, 1978; Cadena *et al.*, 1986; Marín *et al.*, 1995; Cadena, 1996; Leyva *et al.*, 2002; Cadena *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Garzón *et al.*, 2005; Lee *et al.*,

2006; Alarcón, 2007; García, 2007; Martínez *et al.*, 2007); sin embargo, los resultados de Lee *et al.* (2004 y 2006), dieron soporte para el reconocimiento de un nuevo fitoplasma APPTW (American Potato Purple Top Wilt), el cual representa al grupo '*Ca. Phytoplasma americanum*', en plantas de papa con síntomas de "Potato Purple Top", colectadas en Texas y Nebraska. A la enfermedad ZC se le asocia con *Candidatus Liberibacter psyllauros*, perteneciente al grupo α -Proteobacteria, bacterias no cultivadas restringidas al floema (Hansen *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2009; Liefting *et al.*, 2009).

El género *Candidatus Liberibacter*, se asocia también a la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos o Huang Long Bing (HLB); sin embargo, el género encontrado en plantas de papa afectadas por ZC se considera una nueva especie por afectar a solanáceas y por transmitirse a través de *B. cockerelli* Sulc. (Hansen *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2009; Liefting *et al.*, 2009).

La principal forma de diseminación de fitoplasmas, ocurre a través del tubérculo-semilla (Cadena 1974, Cadena *et al.*, 1986, Cadena 1987; Garzón, 2002). Sin embargo, la transmisión a través de insectos vectores se señala como una fuente importante de diseminación asociada a esta enfermedad (Ramírez *et al.*, 1978; Marín *et al.*, 2006).

El psílido *Bactericera* (= *Paratrioza*) *cockerelli* Sulc. se considera el principal vector de PMP (Garzón, 2002; Martínez *et al.*, 2007) y ZC (Hansen *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2009; Liefting *et al.*, 2009). También se señala que no hay transmisión transovárica de fitoplasmas, y que las ninfas transmiten el agente causal en un corto tiempo (Binkley, 1929). Sin embargo, Severin (1940), atribuye la capacidad de transmisión a los adultos de *P. cockerelli* y *Macrosteles divisus*. Garzón *et al.* (2005), reportan la transmisión de los fitoplasmas asociados al Permanente de Tomate con ninfas de *B. cockerelli* Sulc., en solamente 15 minutos después de su adquisición en plantas de tomate.

Los ensayos realizados por diversos investigadores sugieren una asociación del psílido con AP, PMP y ZC, por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar si *B. cockerelli*, puede transmitir e identificar al agente causal asociado (s) a estas enfermedades.

II. MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se llevó a cabo en el invernadero del área de Insectos Vectores del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo, Edo. de México, durante los meses de septiembre de 2006 a diciembre de 2007.

2.1 Cría del psílido

Para la realización del trabajo se estableció una cría con adultos y ninfas de *B. cockerelli* Sulc., colectados en plantas de papa var. Alpha en la región de Zinacantepec, Edo. de México, en septiembre de 2006. Los psílicos se colocaron en plantas sanas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) de tres a cuatro meses de edad, dentro de jaulas entomológicas (60x40x60 cm) cubiertas con tela de organza. Los insectos se mantuvieron sobre las plantas durante 7 d para que ovipositaran y se retiraron con un aspirador. Con la finalidad de contar con una cría de psílicos sanos, se realizaron reinfestaciones periódicas colocando las hojas de chile con huevos próximos a eclosionar, con los peciolos inmersos en un frasco con algodón húmedo para evitar su deshidratación, junto a la planta sana de chile (Figura 4). Las plantas infestadas se trasladaron a otra jaula para esperar la emergencia de individuos de cada estado de desarrollo. La colonia se mantuvo, en condiciones de invernadero a temperatura de 32.7 ± 5 °C, HR de 36% y fotoperiodo de 12 h luz. El ciclo biológico completo del psílido en dichas condiciones de invernadero tuvo una duración promedio de 28 a 30 días.



Figura 4. Cría del psílido *Bactericera cockerelli* Sulc.

2.2 Material vegetativo

Para realizar las pruebas de transmisión se utilizaron plantas de papa var. Alpha de 30 d de edad desarrolladas a partir de tubérculos-semillas sembradas en macetas de plástico (2 kg), con tierra estéril y Peet Moss[®] (1:1) como medio de soporte. Cada planta se colocó en forma individual en una jaula cilíndrica de multimalla (70x80 cm) cubierta con tela de organza. Las plantas de papa se regaron frecuentemente sin saturar el sustrato y se mantuvieron en condiciones de invernadero a temperatura de $32.7\pm 5^{\circ}\text{C}$, HR 36.0% y fotoperiodo de 12 h luz.

2.3 Fuente de inóculo

Se empleó como fuente de inóculo plantas de papa var. Alpha con evidentes síntomas de la enfermedad (enchinamiento, ápice de color púrpura, acortamiento de entrenudos) colectadas en Zinacantepec, Edo. de México. Cada planta se mantuvo en forma individual en invernadero dentro de jaulas entomológicas, hasta realizar las pruebas de transmisión (Figura 5).



Figura 5. Fuente de inóculo (planta enferma de papa)

2.4 Pruebas de transmisión

Previo a realizar las pruebas de transmisión, se tomaron muestras de la fuente de inóculo (planta enferma), material vegetativo (plantas de papa libres del patógeno) e insectos de la cría, para analizarlas con la técnica de PCR y verificar su sanidad.

Las plantas se dispusieron en un diseño al azar con arreglo factorial de tratamientos. Los factores ensayados fueron: fuente de inóculo (planta de papa enferma y planta de chile sana), estado de desarrollo del psílido (adultos y ninfas de tercer y cuarto instar), tiempo de inoculación (15, 60 min y 24 h), densidad de psílicos colocados en la planta (1, 3, 5 y 10) y plantas sin insectos como testigo. En total se incluyeron 48 tratamientos con cuatro repeticiones y 200 unidades experimentales.

Para realizar las pruebas de transmisión se colectaron psílidos adultos y ninfas de la cría, se mantuvieron en ayuno durante 24 h previas a la prueba y enseguida se transfirieron a la planta inoculo (planta de papa enferma) o planta de chile sana, donde permanecieron por una hora para que se alimentaran. Los psílidos se recolectaron con un aspirador manual y se usaron para infestar cada planta de papa sana de acuerdo al tratamiento asignado (densidad de psílidos y tiempo de inoculación). Siempre se incluyeron tratamientos testigos que consistieron de plantas sanas libres de psílidos. Al término de cada prueba, los psílidos se retiraron de las plantas y conservaron en tubos de 2 mL para realizar pruebas con PCR y verificar su sanidad.

Las plantas de papa inoculadas se mantuvieron en observación diaria durante 30 días para registrar el momento de la aparición de síntomas y al final recolectar muestras de hojas y tallos para evaluar su sanidad mediante PCR. Adicionalmente se colectaron y almacenaron tubérculos de cada planta, durante seis meses para observar la presencia o no del brote y/o manchado interno.

2.5 Determinación del Agente Causal

2.5.1 Extracción de ADN del tejido vegetal e insectos

Para la extracción de ADN, las muestras de tejido vegetal e insectos fueron etiquetadas y congeladas a -20°C , se desinfestaron con cloro al 5% y enjuagaron en agua destilada. Las muestras se trituraron con nitrógeno líquido en morteros y pistilos desinfestados. Cada muestra vegetal consistió de 5 g y de 30 individuos de psílidos separados en adultos y ninfas. El material se colocó en tubos eppendorf de 2 mL con 600 μL de solución buffer de extracción (bromuro de cetildimetiletilamonio 2%, polivinilpirrolidona 2%, NaCl 1.42 M, EDTA 20 mM, Tris-HCL pH 8 10 M y 2- β -mercaptoetanol 0.4%) y se homogeneizó e incubó por una hora a 80°C . Se continuó

con el protocolo cloroformo/fenol seguido de la precipitación con isopropanol (Bainbridge *et al.*, 1990, modificado por Cámara 2001).

2.5.2 PCR

El ADN extraído de plantas e insectos se sometió a pruebas de PCR, con primers de la región 16S y 23S (P1/P7, Pc399/P1694, FU5/rU3), seguidos de una PCR anidada (R16F2n/R16R2, P1A/P7A), primers de proteínas ribosomales (rp(L2F3)/rp(1)RIA, rpF1C/rp(1)RIA) y primers OAI1/ OAI2C. La técnica se estandarizó a las condiciones del laboratorio de Biotecnología del Área de Semillas del Colegio de Postgraduados, basadas en las publicaciones de Lee *et al.*, (1995), Smart *et al.*, (1996), Siddique *et al.*, (1998), Font *et al.*, (1999), Almeyda *et al.*, (2001), Skrzeczkowski *et al.*, (2001), Bertaccini *et al.*, (2002), Khan *et al.*, (2002), Leyva *et al.*, (2002), Cadena *et al.*, (2003), Lee *et al.*, (2004), Zhang *et al.*, (2004). Kaminska *et al.*, (2006), Lee *et al.*, (2006), Alarcón (2007), Martini *et al.*, (2007) y Abad *et al.*, (2009).

2.5.3 Electroforesis y visualización de productos

Se utilizaron geles de agarosa al 1%, donde se cargaron 5 μ L de ADN por muestra más 2 μ L de Loading Buffer. Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis, se aplicaron 90 volts por una hora en una solución amortiguadora TAE 1%, se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 μ L mL⁻¹ por 20 min y enjuagaron en agua destilada, para posteriormente visualizarlos en el transiluminador de luz ultravioleta.

2.5.4 Clonación de productos de PCR

El producto de PCR amplificado con los primers de proteínas ribosomales (rp(L2F3)/rp(1)RIA) de tamaño de 1212-1386 bp se inserto en *E. coli*. Se utilizó el Kid de

clonación pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems de Promega Corporation, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron las colonias transformadas para realizar un PCR con los primers antes mencionados, se amplificaron y seleccionaron aquellas donde las reacciones fueron positivas y de tamaño esperado.

2.5.5 Secuenciación del patógeno

Los productos de PCR y los clones positivos se limpiaron con el kit Clear PCR Products de Quagen[®], para secuenciar las hebras de ADN de cada producto, en Macrogen Corp. U.S.A. Los resultados de la secuenciación se compararon con otras secuencias depositadas en el GenBank, con la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Eficiencia de *Bactericera cockerelli* Sulc. en la transmisión

Los psílidos adultos fueron más eficientes que las ninfas en transmitir el agente causal. Los adultos transmiten el patógeno en un periodo de inoculación de 15 min, logrando una mayor eficiencia al aumentar el número de psílidos y el tiempo de inoculación. La transmisión fue efectiva con tres o más adultos por planta en un periodo de inoculación de 15 min, o con un adulto en 60 min. La máxima eficiencia se obtuvo al ensayar con 10 adultos y permitirles un tiempo de inoculación de 24 h (Cuadro 5), ya que el 100% de plantas exhibieron síntomas de la enfermedad, misma que fue confirmada mediante PCR.

Los síntomas comenzaron con clorosis en hojas, engrosamiento y acortamiento de entrenudos, tallos de color violáceo, el envés, márgenes y nervaduras de las hojas próximas al pecíolo de

color morado, ondulamiento de los bordes y doblez de las hojas hacia el haz en forma de empanada. Los síntomas aparecieron 21 ddt en los tratamientos con mayor tiempo de inoculación (24 h). Transcurridos 30 ddt, los síntomas se acentuarón y fueron muy similares a los que presentaba la fuente de inóculo (Figura 6).



Figura 6. Planta de papa después de la transmisión con adultos.

En los ensayos con ninfas de *B. cockerelli* Sulc., solamente el 25% de plantas manifestó síntomas, al exponerlas a cinco ó 10 ninfas por planta, en un tiempo de inoculación de 24 h; los cuales consistieron en un ligero tono morado del envés de las hojas y ondulamiento de los bordes (Figura 7). Estos resultados, concuerdan con lo mencionado por Carter (1950) quién indica que no todas las ninfas tienen la capacidad de producir una reacción tóxica.



Figura 7. Planta de papa después de la transmisión con ninfas.

Cuadro 5. Porcentaje de plantas que mostraron síntomas 30 ddt, al utilizar como fuente de inóculo, una planta enferma de papa o una planta sana de chile, considerando el Estado de Desarrollo del Psílido (EDP), Número de Psílicos por Planta (NPP) y el tiempo de inoculación.

Inóculo	EDP	NPP	TIEMPO DE INOCULACIÓN		
			15 min	60 min	24 h
Planta enferma de papa	Adulto	Sin psílicos	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		1	0 (-)	50 (+)	25 (-)
		3	25 (+)	25 (-)	50 (+)
		5	50 (+)	50 (+)	50 (-)
		10	50 (-)	50 (+)	100 (+)
	Ninfa	Sin psílicos	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		3	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		5	0 (-)	0 (-)	25 (-)
		10	0 (-)	0 (-)	25 (-)

Planta de chile sana	Adulto	Sin psílidos	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		3	0 (-)	25 (-)	0 (-)
		5	0 (-)	50 (-)	50 (-)
		10	25 (-)	50 (-)	0 (-)
	Ninfa	Sin psílidos	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		3	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		5	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		10	0 (-)	0 (-)	0 (-)

(-) Resultado con PCR

Como es evidente también en el Cuadro 5, al transcurrir 30 ddt, las plantas de papa expuestas a diferentes densidades de psílidos adultos, provenientes de plantas de chile sanas, exhibieron síntomas aparentemente similares (envés de color violáceo y ligero ondulamiento de los bordes de las hojas en la parte apical de la planta), acentuándose en un periodo de inoculación de 60 min o más. Mientras que, en el ensayo con ninfas no se observó ningún tipo de síntoma en las plantas (Cuadro 5). No obstante, la prueba de PCR resulto negativa en todos los ensayos, lo que indica que la causa de dicho daño se debió a otro factor y no a una enfermedad.

Liu *et al.* (2006), mencionan que los síntomas provocados por el psílido son causa de la toxina que inyectan a las plantas y no por la presencia de un fitoplasma. Estos síntomas incluyen detención del crecimiento, proliferación de brotes nuevos, clorosis y tonos purpura de las hojas, estimulación de la floración, y producción de numerosos frutos pequeños y de pobre calidad en tomate, aunado a que se puede presentar una remisión de los síntomas en variedades tolerantes, cuando los psílidos son retirados de las plantas. Lo anterior, permite considerar que los síntomas que se presentaron en las plantas, fueron provocados por el psílido al momento de alimentarse, debido a que los adultos al igual que las ninfas producen esta tóxina (Liu y Trumble, 2006). Por

su parte, Blood *et al.* (1933) y Carter (1939), anotan que los síntomas completos a causa de la inyección de toxinas, se hacen evidentes sólo si las ninfas se alimentan por un periodo continuo de 30 a 36 días, aunque Liu *et al.* (2006) observaron síntomas típicos a los 20 días, en las plantas expuestas con 40 ninfas alimentándose durante 10 días, y concluyen que la intensidad del daño depende de la densidad de ninfas.

La acumulación de altos porcentajes de almidón en las plantas afectadas, es otra característica de PMP y ZC, éstas se convierten en azúcares y originan el manchado interno en los tubérculos (Arsla *et al.*, 1985; BAYER, 2005, Abad *et al.*, 2009); sin embargo, ningún tratamiento presentó manchado interno. El daño en tubérculos consistió en la ausencia de brotación y/o brote de hilo, después de seis meses de almacenamiento, el daño se presentó en más del 25% en los ensayos con 15 min de inoculación y exposición de tres ó cinco adultos por planta. En 60 min, se tuvo daño en el 5.2% de los tubérculos con un adulto, incrementándose a 50% o más, cuando se expusieron de cinco y 10 adultos por planta. Mientras que en un tiempo de inoculación de 24 h con tres adultos, se obtuvo 12.8% de tubérculos sin brote y con brote de hilo, y cuando se expusieron a 10 adultos, el porcentaje de daño se incrementó a 45.45% (Cuadro 6). En los ensayos con ninfas se obtuvieron diferentes porcentajes de tubérculos sin brote, a los 15 y 60 min, y 24 h; incrementándose a 42.85% al exponer a la planta con 10 ninfas durante 24 h.

Por otra parte, en el ensayo con adultos provenientes de la planta sana de Chile en un periodo de 60 min y 10 psílidos, se obtuvo el 5% de los tubérculos sin brote (Cuadro 6). Estos resultados son diferentes a lo mencionado por Richards (1928), Garzón (2002) y Ferguson *et al.*, (2001), citado por Aviles (2002), donde señalan que los adultos no ocasionan daños por efecto de la toxina en los cultivos hospedantes.

Cuadro 6. Porcentaje de tubérculos dañados por planta, 30 ddt al utilizar como fuente de inóculo una planta enferma de papa o una planta sana de Chile, considerando el Estado de Desarrollo del Psílido (EDP), Número de Psílicos por Planta (NPP) y el tiempo de inoculación.

Inóculo	EDP	NPP	TIEMPO DE INOCULACIÓN				
			15 min	60 min	24 h		
Planta enferma de papa	Adulto	Sin psílicos	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
		1	0 (-)	5.2 sb (+)	0 (-)		
		3	31.5 sb (+)	0 (-)	6.4 sb / 6.4 bh (+)		
		5	26.3 sb (+)	63.6 sb (+)	0 (-)		
		10	0 (-)	50.0 sb (+)	45.4 sb (+)		
	Ninfa	Sin psílicos	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
		1	0 (-)	12.5 sb (-)	11.11 sb (-)		
		3	0 (-)	0 (-)	20.0 sb (-)		
		5	33.3 sb (-)	0 (-)	0 (-)		
		10	0 (-)	0 (-)	42.85 sb (-)		
		Planta sana de Chile	Adulto	Sin psílicos	0 (-)	0 (-)	0 (-)
				1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
				3	0 (-)	0 (-)	0 (-)
				5	0 (-)	0 (-)	0 (-)
10	0 (-)			5.0 sb (-)	0 (-)		
Ninfa	Sin psílicos		0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	1		0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	3		0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	5		0 (-)	0 (-)	0 (-)		
		10	0 (-)	0 (-)	0 (-)		

(-) Resultado con PCR

sb: sin brote

bh: brote de "hilo"

De acuerdo a la literatura, en algunos casos el patógeno está en muy bajas concentraciones, no se encuentran en determinados tejidos, no muestran síntomas externos y la severidad de la expresión de los síntomas no siempre es un indicativo de la presencia patógeno (Siddique *et al.*, 1998; Weintraub *et al.*, 2006; Bergamin, *et al.*, 2008). Considerando lo anterior, en el estudio se tuvo una planta sin síntomas visibles, en los ensayos de 15 y 60 min con 5 adultos, y en el de 24 h con tres adultos, estas plantas produjeron un 25, 75 y 66% tubérculos sin brote, respectivamente. Por otra parte, se tuvieron plantas con síntomas, que produjeron tubérculos sin manchado interno y con brote normal, lo anterior supone que las bacterias no se encontraban en esa parte de la planta, debido probablemente al comportamiento y distribución errática del patógeno en la planta.

Asímismo, en los ensayos con adultos provenientes de la planta enferma de papa se obtuvo una mayor cantidad de tubérculos, 6.62 en promedio, mientras que las plantas provenientes de la planta sana de Chile, 5.26 tubérculos/planta. En el caso de los ensayos con ninfas no se obtuvieron diferencias significativas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Martínez *et al.* (2007), quienes indican que las plantas infectadas producen significativamente una mayor cantidad de tubérculos; y son contrarios a lo descrito por Ferguson *et al.*, (2001), citado por Aviles (2002); donde se menciona que se producen menos tubérculos en plantas enfermas. En las plantas de papa sin psíldos se obtuvieron en promedio 3.2 tubérculos.

Los resultados anteriores muestran que los adultos son mejores transmisores de la bacteria (s) que las ninfas de *B. cockerelli* Sulc., lo cual posiblemente se deba a la facilidad para desplazarse y alimentarse de cualquier parte de la planta, mientras que las ninfas con menor movilidad permanecieron en el mismo lugar, resultado que coincide con lo reportado por Swenson (1971), al efectuar pruebas de transmisión del “aster yellow” con adultos y ninfas de *M. fascifrons*.

Por otra parte, la fuente de inóculo pudo interferir en la transmisión, debido a que en los análisis con PCR, se amplificó más de una banda de diferentes tamaños de pares de bases, lo que

hace suponer que la planta pudo estar infectada por más de un grupo de patógenos. Zhang *et al.* (2004), mencionan que *Macrosteles quadrilineatus* Forbes, puede adquirir y transmitir solamente algunos fitoplasmas de plantas de lechuga infectada en un periodo de adquisición corto.

Los tubérculos producidos por las plantas de papa, no presentaron manchado interno en ninguno de los tratamientos, resultados que se apegan a lo mencionado por Cadena (2000), que considera a la var. Alpha como ligeramente tolerante a la enfermedad; o bien, que no todos los síntomas internos desarrollan síntomas externos, y por otra parte los factores ambientales como la temperatura, también pueden mediar los efectos de la infección en el insecto hospedero y en la expresión del patógeno en la planta (Lee *et al.*, 2000; Siddique *et al.*, 1998; Weintraub *et al.*, 2006; Bergamin, *et al.*, 2008). También tienen una participación importante, la especie o variedad de la planta, el estado de desarrollo de la planta, el estrato de la planta del cual se alimentaron los psilidos, la movilidad del patógeno dentro de la planta (Khan *et al.*, 1984; Wei *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006).

3.2 Detección de fitopatógenos con PCR- directa y anidada.

Los productos de PCR amplificaron bandas de diferentes tamaños (rDNA de 600-1600 bp), algunas aparentemente positivas a fitoplasmas por el tamaño esperado de 1200 bp con los primers P1/P7 y primers R16F2n/R16R2 (Figura 8) y rp(L2F3)/rp(1)RIA, rpF1C/rp(1)RIA (Figura 9); sin embargo, no correspondieron a fitoplasmas, otras secuencias mostraron sobreposición de las bases nitrogenadas. Las secuencias de muestras de plantas de papa de los tratamientos de 15 y 60 min, y 24 h con 3, 5 y 10 insectos previamente alimentados de planta de papa enferma, en comparación con otras secuencias del GenBank, corresponden a bacterias no cultivadas (Figura 12).

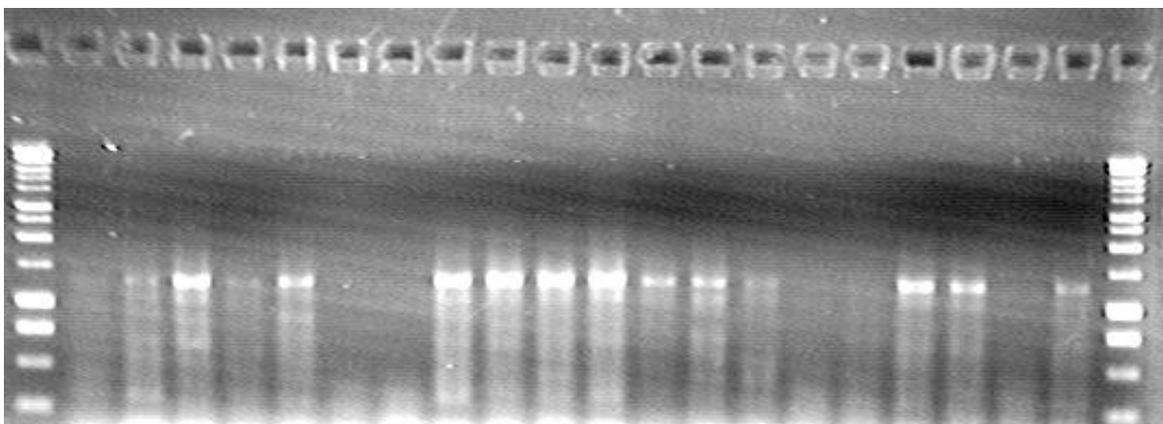


Figura 8. Amplificación de productos de PCR, con primers P1/P7 y primers R16F2n/R16R2, muestras después de inocular con adultos.

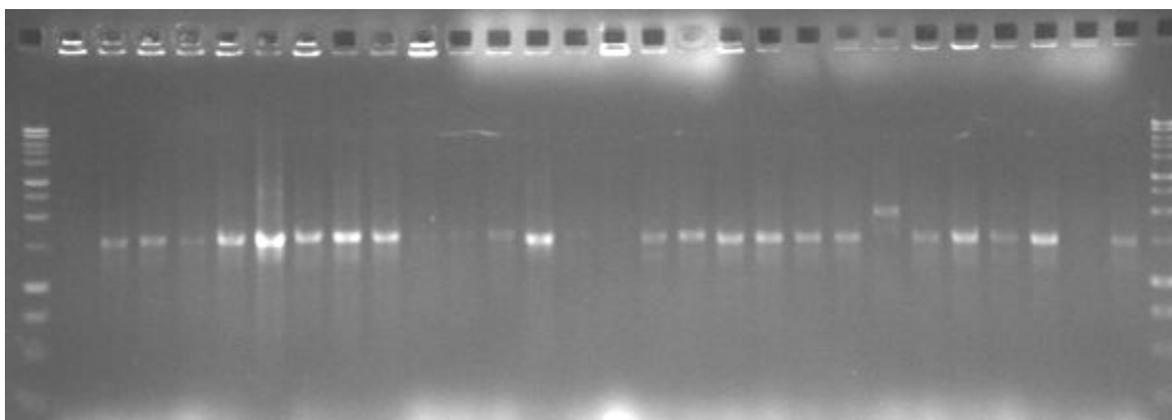


Figura 9. Amplificación de productos de PCR, con primers rp(L2F3)/rp(1)RIA, rpF1C/rp(1)RIA, muestras después de inocular con adultos.

Por otra parte, al utilizar primers OA2/ OI2C, los productos de PCR amplificaron bandas del tamaño esperado (Figura 10), sin embargo el resultado de la secuencias también muestra sobreposición de bases nitrogenadas, cabe mencionar que se utilizaron primers para la identificación de *Ca. Liberibacter* comúnmente relacionado con Rutáceas y recientemente se identifico a *Ca. Liberibacter psyllaourous*, como otra especie diferente por afectar Solanáceas (Hansen *et al.*, 2008).

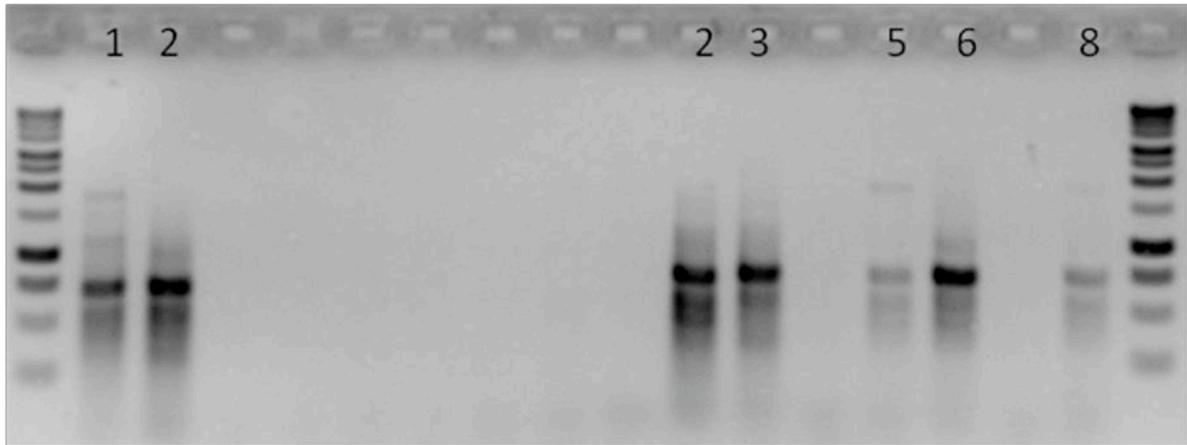


Figura 10. Amplificación de productos de PCR, con primers OA2/ OI2C, muestras después de inocular con adultos. (1, 2) 15 min de inoculación con 3 psílicos, (3) 15 min. de inoculación con 10 psílicos, (5, 8) 15 min. de inoculación con 5 psílicos, (6) 15 minutos con 1 psílido.

Lo anterior sugiere que: i) se obtuvo un ADN de buena calidad (Figura 11) sin la presencia de inhibidores o bloqueadores, debido a que en todas las reacciones siempre se tuvieron amplificaciones; ii) no se detectó el fitoplasma de la PMP en las muestras analizadas; iii) que se encuentra en la planta más de un organismo, con un peso similar que no se pueden separar; iv) que éstos organismos comparten o tienen una gran similitud (más del 90%) en la región 16S y proteínas ribosomales, con una gran cantidad de bacterias (Figura 11); Skrzeczkowski *et al.*, (2001), amplificaron bacterias del género *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, y consideran que en otros casos se trata de micoplasmas saprofitos o ADN del hospedante, además que las bandas amplificadas no pueden ser eliminadas modificando las condiciones de PCR sin reducir significativamente la sensibilidad de la prueba. Por otra parte, la detección e identificación de estos fitopatógenos, resulta complicado, debido a la incapacidad de crecer en medios de cultivo, y a que el ADN extraído del hospedante solamente 1% corresponde al patógeno (Bertaccini, 2007).

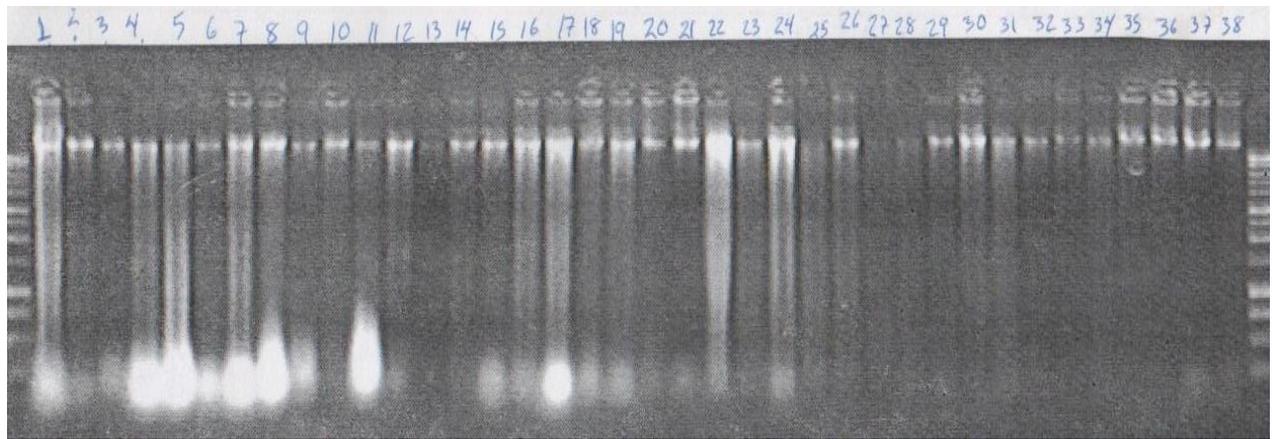


Figura 11. Amplificación del gel de agarosa con ADN extraído de plantas de papa después de haber realizado la transmisión.

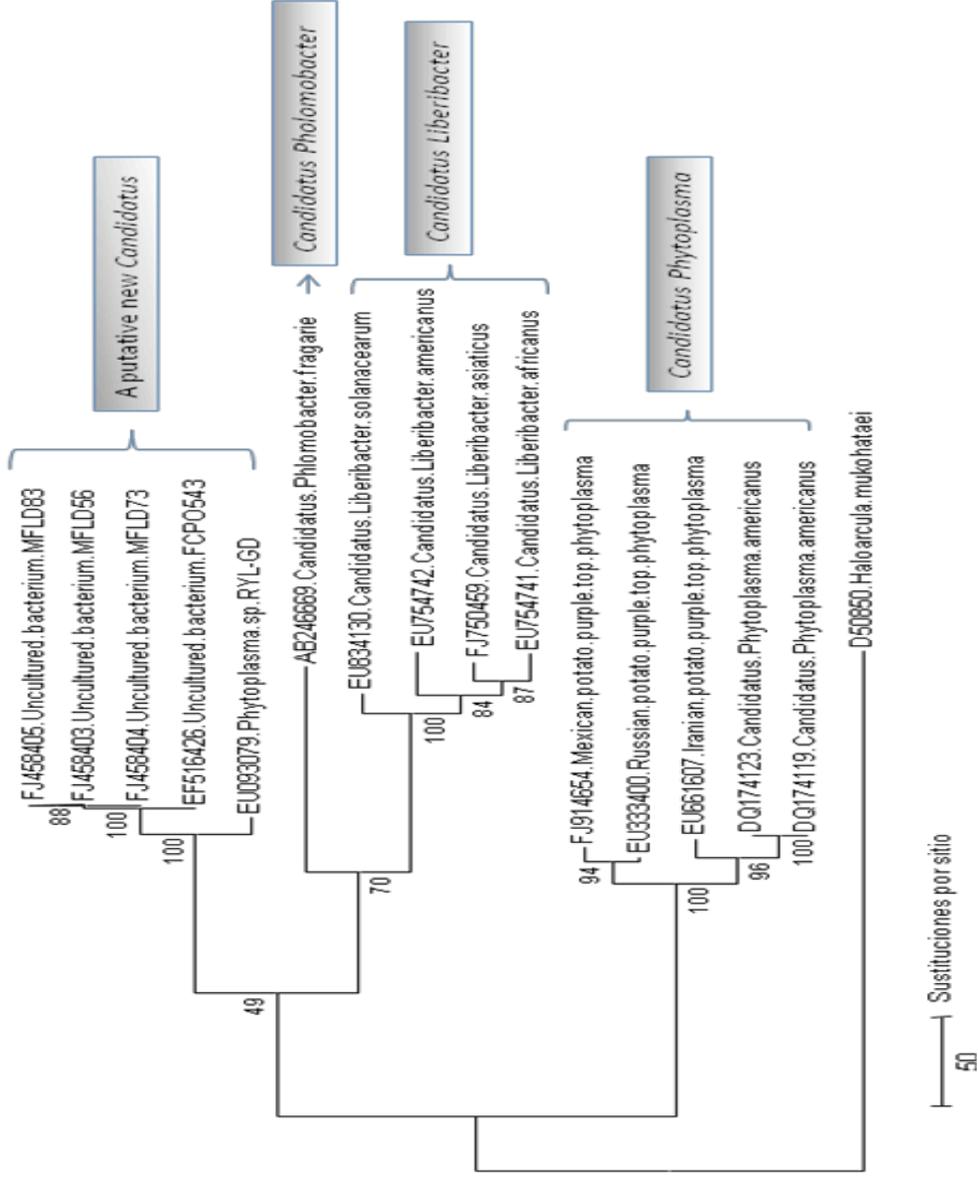


Figura 12. Dendograma filogenético de las secuencias obtenidas correspondientes a bacterias no cultivadas en plantas de papa (*S. tuberosum* L.)

IV. CONCLUSIONES

Bactericera cockerelli Sulc. es capaz de transmitir bacterias no cultivadas, conocidas como *Candidatus*.

Los adultos de *B. cockerelli* Sulc. son mejores transmisores de bacterias no cultivadas que las ninfas.

B. cockerelli Sulc. adquiere la bacteria en un periodo de 60 min y puede transmitirla en 15 min, cuando la planta es expuesta a tres psílidos infectados, o bien con un insecto en un periodo de inoculación de 60 min.

Los síntomas en plantas de papa inoculadas con adultos de *B. cockerelli* Sulc., se presentaron 21 ddt. Mientras que en el caso de ninfas de *B. cockerelli* Sulc., los síntomas se observaron transcurridos 30 d.

Los síntomas expresados por las plantas consistieron en clorosis de hojas, engrosamiento y acortamiento de entrenudos, tallos de color violáceo, el envés y márgenes de las hojas de color morado principalmente las del ápice, nervaduras próximas al pecíolo de color morado, ondulamiento de los bordes y doblez de las hojas hacia el haz en forma de empanada.

Las plantas inoculadas con adultos previamente alimentados con planta enferma de papa, produjeron una mayor cantidad de tubérculos, 6.62 en promedio, que las plantas inoculadas con adultos provenientes de la planta sana de Chile, 5.26. En el caso de los tratamientos con ninfas no se obtuvieron diferencias significativas.

No se presentó en ningún caso manchado interno de tubérculos; sin embargo, se tuvieron plantas con síntomas que produjeron tubérculos sin brotar, con brote de hilo, brote normal y sin producción de tubérculos; y plantas sin síntomas pero con tubérculos sin brote.

La detección e identificación de fitoplasmas o *Ca. Liberibacter* asociados a PMP y a Zebra Chips respectivamente, es errática desde la obtención de un ADN de calidad e integro, la

presencia de inhibidores en el ADN, la separación de más de un organismo asociados a la enfermedad que comparten la región 16S y que tienen un tamaño similar de pares de bases 1200-1600, reducen e interfieren en la sensibilidad de la prueba con PCR.

Los primers basados en proteínas ribosomales (rp) lograron amplificar mejor a las bacterias no cultivadas, que el resto de los primers utilizados.

Las secuencias obtenidas de plantas inoculadas se encuentran depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con la definición Uncultured bacterium clone MFLD56 (No. de Accession FJ458403) de 1643 bp, clone MFLD73 (No. de Accession FJ458404) de 1660 bp, y clone MFLD83 (No. de Accession FJ458405) de tamaño de 1660 bp.

V. LITERATURA CITADA

- Abad, J. A., M. Bandlia, R. D. French-Monar, L. W. Liefting and G. R. G. Clover. 2009. First Report of the Detection of 'Candidatus Liberibacter' species in Zebra Chip Disease-Infected Potato Plant in the United States. *Plant Disease*. 93:1:108 p.
- Alarcón R. N. M. 2007. Caracterización de DNA de clones de papa y fitoplasmas asociados en el valle de Toluca, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Chapingo, México. 71 p.
- Almeyda L. I. H., Rocha P. M. A., Piña R. J., Martínez S. J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19:1: 1-9 p.
- Arslan A., Bessey P. M., Matsuda K. and Oebker N. F. 1985. Physiological effects of psyllid (*Paratrioza cockerelli*) on potato. *Ame. Potato J.* 62:1: 9-22 p.
- Aviles G. M. C., Garzón T. J. A., Marin J. A., Caro M. P. H. 2002. El psílido del tomate *Paratrioza cockerelli* (Sulc.): biología, ecología y su control. Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. 21- 35 p.
- Bayer de México. 2005. La paratrioza o pulgón saltador del tomate y la papa. Boletín Técnico. División Bayer CropScience. 24 p.
- Bergamin, F.A., R.B. Bassanezi, L. Amorim and T.R.Gottwald. 2008. Epidemiology of HLB (Huanglongbing). I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora, México. SENASICA-SAGARPA. 9 p.
- Bertaccini A., Kaminska M. 2002. Molecular evidence for mixed phytoplasma infection in lily plants. *Acta Horticulture*. 568: 35-41 p.
- Bertaccini A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*. 12:673-689 p.

- Binkley A. M. 1929. Transmission studies with the new psyllid-yellow disease of solanaceous plants. *Science*. 615 p.
- Blood H. L., Richards B. L., and Wann F. B. 1933. Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology* 23:930 p.
- Cadena H. M. A. y Galindo, A. J. 1986. Reducción de la incidencia de la Punta Morada de la Papa por medio de fechas de siembra, genotipo de la planta y aplicación de insecticidas. *Rev. Mex.de Fitopatol.* 3: 100-104.
- Cadena, H. M. A. 1996. La Punta Morada de la Papa en México: Efecto de cubiertas flotantes, genotipos y productos químicos. *Rev. Mex. de Fitopatol.* 14. 1: 20-24
- Cadena H. M. A., Guzmán, P. R., Díaz V. M., Zavala Q. T. E., Magaña, T. O. S., Almeyda, L. I. H., López D. H., Rivera P. A., Rubio, C. O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en los valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Rev. Mex. de Fitopatol.* 21. 3: 248-258
- Carter W. 1939. Injuries to plants caused by insect toxins. *The Botanical Review.* 5:273-326 p.
- Carter R. D. 1950. Toxicity of *Paratrioza cockerelli* to certain solanaceous, Ph. D. Dissertation. University of California Berkeley. California, USA. 128 p.
- Da Graca, J.V. 2008. Biology, history and world status of Huanglongbing. I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora, México. SENASICA-SAGARPA. 7 p.
- Font I., Abad P., Albiñana M., Espino A. I., Dally E. I., Davis R. E. y Jorda C. 1999. Amarillos y enrojecimientos en zanahoria: una enfermedad a diagnóstico. *Bol. San. Veg. Plagas.* 25: 405-415 p.

- Garzón T. J. A. 2002. Asociación de *Paratrioza cockerelli* Sulc. con enfermedades en papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon lycopersicum* Mil. Ex Fawnl) en México. Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. 79- 87 pp.
- Garzón T. J. A., Garzón C. J. A., Velarde F. S., Marín J. A. y Cardenas V. O. G. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al “Permanente del Tomate” por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. en México. *In* Memorias del Congreso Nacional de Entomología. 672-675 pp.
- Hansen, A. K. , J. T. Trumble, R. Stouthamer, and T. D. Paine. 2008. A new Huanglongbing species, “*Candidatus* Liberibacter psyllauros,” found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl. and Environ. Microbiol.* 74:18: 5862-5865 pp.
- Kaminska M., Sliwa H., Malinowski T. 2006. Occurrence of rose degeneration symptoms in rose plants in Poland: presumed phytoplasma aetiology of rose proliferation and dieback. *Acta Horticulture.* 722: 163-174 p.
- Khan A. J., Botti S., Al-Subhi A. M., Gundersen R. D. E., Bertaccini A. F. 2002. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. *Phytopathology.* 92:10: 1038-1047 p.
- Lee I. M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D. E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. 85:6: 728-734 p.
- Lee, I. M., Bottner, K. D., Munyaneza, J. E., Secor, G. A. and Gudmestad, N. C. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Obregon. *Plant Disease.* 88: 4: 429 p.
- Lee I. M., Bottner K. D., Secor G., Rivera-Varas 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 p.

- Lee I. M., Davis R. E. and Gundersen-Rindal D. E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 221-255 pp.
- Leyva, L. N. E., J. C. Ochoa S., D. S. Leal K. y J. P. Martínez S. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México. *Canad. J. of Microbiol.* 48:12:1062-1068 p.
- Liefting, L. W., P. W. Sutherland, L. I. Ward, K. L. Paice, B. S. Weir and G. R. G. Clover. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease.* 93:3:208-214.
- Liu D., L. Johnson and J. T. Trumble. 2006. Differential responses to feeding by the tomato/potato psyllid between two tomato cultivars and their implications in establishment of injury levels and potential of damaged plant recovery. *Insect Science.* 13: 195-204 p.
- Marín, J. A., Garzón, T. J. A., Becerra, F. A., Mejía, A. C., Bujanos, M. R., Byerly, M. K. F. 1995. Control biológico y Morfología del salerillo *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) (Homoptera:Psyllidae) vector de la enfermedad "Permanente del Tomate" en el Bajío. *Manejo Integrado de Plagas.* 38:25-32
- Marín, J. A., Bujanos M. R., Garzón T. J. A. 2006. Determinación y monitoreo de chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae) en el cultivo de papa. *Soc. Mex. de Entomología.* 5:2: 706-710 p.
- Martínez S. J. P., Leyva L. N. E., Aviña P. K., Ochoa S. J. C. 2007. La "Punta Morada" de la papa en Mexico. *Claridades.* 27-33 p.
- Martini M., Lee I. M., Bottner K. D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N. A., Carraro L., Marcone C., Khan A. J., Osler R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57:2037-2051 p.

- Ramírez, M. M. Ramos, E. C. J. 1978. Populations of leafhoppers (Homoptera- Cicadellidae) on 12 varieties of potato in Chapingo, México, and their possible relation to “purple-top wilt” disease. *Agrociencia*. 34:79-90 p.
- Richards B. L. 1928. A new and destructive disease of the potato in Utah and it’s relation to the potato psylla. *Phytopathology*. 18: 140-141 p.
- Salazar, L. F. 1997. Identificación y control de enfermedades y fitoplasmas de la papa. Simposium Internacional de la Papa. Metepec, Estado de México. <http://www.redepapa.org/salazar1.pdf> Fecha de consulta 05-may-2009)
- Severin H. H. P. 1940. Potato naturally infected with California Aster Yellow. *Phytopathology*. 30: 1049-1051 p.
- Siddique A. B. M., Gurthrie J. N., Walsh K. B., White D. T., Scott P. T. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Dis*. 82:1112-1120 p.
- Skrzeczowski L. J., Howell W. E., Eastwell K. C. 2001. Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Acta Hort*.550: 417-424 p.
- Smart C.D., Schneider B., Blomquist 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 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:8:2988-2993 p.
- Swenson K. G. 1971. Relation of age, sex, and mating of *Macrostelus fascifrons* to transmission of aster yellow. *Phytopathology*. 61:657-659 p.
- Wallis, R. L. 1948. Time of planting potatoes as a factor in prevention of potato psyllid attack. *Journal of Economic Entomology*. 41:1: 4-5 pp.

- Wei W., Kakizawa S., Suzuki S., Jung H-Y., Nishigawa H. 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*. 94:244-250 p.
- Weintraub P. G. and Beanland L. 2006. Insects vectors of phytoplasmas. *Ann. Rev. of Entomol.* 51: 91-111 pp.
- Zhang J., Hogenhout S. A., Nault L. R., Hoy C. W., Miller S. A. 2004. Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. *Phytopathology*. 94:842-849 p.