

Etiología, Detección Molecular y Manejo Integrado del Síndrome de la Punta Morada de la Papa en México

Alberto Flores Olivas, Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Correspondencia: aflooli@uaaan.mx;

ETIOLOGIA: El síndrome de la punta morada en México, también llamado zebra chip, se asocia a síntomas de amarillamiento causado por el psílido *Bactericera cockerelli*, que son difíciles de diferenciar de los ocasionados por la bacteria no cultivable “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (Sin. “*Ca. Liberibacter psyllaurosus*”) ya síntomas causados por “*Candidatus Phytoplasma americanum*”. La transmisión de éstos dos patógenos a papa la realizan el psílido *Bactericera cockerelli* y la chicharrita *Circulifer tenellus*, siendo el más importante *B. cockerelli* por presentarse en poblaciones numerosas. En México hemos encontrado en muestras de campo y en estudios bajo condiciones de invernadero, daño de punta morada/zebra chip asociada a “*Ca. Liberibacter solanacearum*”, o a “*Ca. Phytoplasma americanum*” o bien a una infección mezclada de ambos patógenos. Es común encontrar asociados a la enfermedad a hongos vasculares como *Fusarium* spp. y *Verticillium* spp. en etapas avanzadas de la enfermedad considerándose de etiología compleja. En México se han detectado los grupos de fitoplasmas; Grupo de amarillamiento del aster (16SrI) '*Candidatus Phytoplasma asteris*' distribuido en todas las áreas productoras de papa, el grupo escoba de bruja del cacahuate (16SrII) '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' en Guanajuato y Sinaloa, el grupo de enfermedad-X (16SrIII) en Coahuila y Guanajuato y el grupo Mexican periwinkle virescence (16SrXIII) en Sinaloa (Santos *et. al* 2010). En otros países se han encontrado grupos de “*Ca. Phytoplasma*” asociados con punta morada/zebra chip de la papa, como: 16SrIA y B, 16SrII, 16SrIII, 16SrVI, 16SrXII B y E y 16SrXVIII.

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, se ha detectado en todas las regiones productoras de papa de México, como infección simple o mezclada con fitoplasmas. En base a polimorfismos de nucleótido simple del gen 16SrRNA, de la región espaciadora intergénica 16S/23S y genes de la proteína ribosomal 50s rplJ y rplL, se han determinado los haplotipos “LsoA” en el Oeste de México, el haplotipo “LsoB” en el Este de México, el haplotipo “LsoC”, asociado a zanahoria en Finlandia transmitido por *Trioza apicalis* y el haplotipo “LsoD” asociado a zanahoria en España e Islas Canarias y transmitido por el psílido *Bactericera trigonica*, (Nelson *et. al* 2013).

DIAGNOSTICO: En la detección de “*Candidatus Phytoplasma americanum*”, la metodología más empleada es una PCR anidada, se pueden encontrar en la literatura diversos grupos de iniciadores para la amplificación del gen 16S rRNA y la región espaciadora 16S–23S. Los iniciadores universales P1/P7, seguidos de una segunda amplificación con los iniciadores R16F2n/R16R2, son los más usados

más usados. Un análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción de los amplicones producto de la PCR, usando enzimas como AluI, MseI, HhaI, Tsp509I, HpaII, RsaI, and BfaI, nos permitirá identificar el grupo al que pertenece el fitoplasma, además de comparación de secuencias del gen 16SrDNA del producto amplificado con aquellas reportadas en el NCBI Gen Bank. En el diagnóstico de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” se puede usar PCR convencional o PCR en tiempo real, confirmando mediante comparación de secuencias del gen 16SrRNA. Un buen número de iniciadores se reportan en la literatura, como se puede observar en el Cuadro 1.

Wen, *et al.* 2013, desarrollaron primers para marcadores de secuencias simples repetidas (SSR) para detección y diferenciación de haplotipos de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. El par de primers, Lso-SSR-1F y Lso-SSR-1R, producen amplicones de 180 pb y 240 pb, y se diferencian en un gel de agarosa. El amplicón de PCR de 240 pb corresponde al haplotipo A, el amplicón de PCR de 180pb corresponde al haplotipo B.

COMBATE: El manejo integrado de la punta morada de la papa, implica el considerar a esta enfermedad como un complejo. Así los factores que intervienen en su incidencia y desarrollo serán: a) insectos vectores y patógenos que transmiten, b) tubérculos usados como semilla, c) patógenos secundarios que aceleran e incrementan el daño, como *Fusarium* spp. El control de insectos vectores debe basarse en un muestreo y monitoreo de *B. cockerelli* y *C. tenellus*, así conoceremos que insectos arriban al cultivo y en que cantidad, además podemos detectar etapas de desarrollo del vector, adultos, huevecillos y/o ninfas, y conocer su dinámica de población. Esta información nos permite seleccionar la fecha adecuada para siembra, evitando coincidir el cultivo con picos de población de vectores; nos auxilia también a seleccionar insecticidas más adecuados, sintéticos y/o biorracionales, evitando generar resistencia. La tecnología de aplicación es clave; colocar el insecticida en el lugar preciso, la aspersión deberá llegar a las áreas en donde el insecto oviposita y las ninfas colonizan. Respecto al control biológico, en México está muy limitado en el cultivo de papa, por la gran cantidad de insecticidas que se usan. No obstante, en sitios de refugio de *B. cockerelli*, en ausencia de cultivo, se pueden liberar enemigos naturales como *Chrysoperla* spp. que depreda huevecillos y ninfas, y *Tamarixia triozae* que parasita ninfas. Se pueden usar hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metharhizium anisopliae* que depredan huevecillos, ninfas y/o adultos. Emplear semilla sana reduce en forma importante la diseminación de la punta morada. Es clave la normatividad fitosanitaria para regular el movimiento de tubérculos usados para semilla. Aplicar

Cuadro 1. Iniciadores reportados para amplificación de 16SrRNA de Lso. Mediante PCR convencional y PCR en tiempo real (varios autores).

Iniciador	Secuencia	Región	Fragmento
OA2	5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3'	16SrRNA	1160 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3,		
CLi.po.F	5'-TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT-3	16S rDNA	1070 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
ZCf	5'-CGAGCGCTTATTTT ATTAGGAGC-3'	16S rDNA	1171 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
Lp Frag4-1611F	5-GGTTGATGGGGTCATTTGAG-3	ISR-parcial	918 pb.
LP Frag 4- 480R	5- CACGGTACTGGTTCCTACTATCGGTC-3	16S rRNA- 23S rRNA	
OA2	5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3'	16SrRNA	1160 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3,		
Lib16S01F(anidado)	5'-TTCTACGGGATAACGCACGG-3'		580-pb
Lib16S01R	5'-CGTCAGTATCAGGCCAGTGAG-3'		
LsoF	5'-GTC GAG CGC TTA TTTT TA ATA GGA-3'	16SrRNA	1163 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
Lso TX 16/23 F	5'-AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG-3'	ITS 16S/23S rDNA	383-pb
Lso TX 16/23 R	5'-GGTACCTCCCATATCGC-3'		
PCR EN TIEMPO REAL			
LsoF	5'-GTC GAG CGC TTA TTTT TA ATA GGA-3'		
HLBr	5-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3		
COX	GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A		
COXr	GCC AAA ACT GCT AAG GGC ATT C		
Sonda HLBp	56-FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/3BHQ-1		
Sonda COX	5-TET/ATC CAG ATG CTT ACG CTG G/3BHQ-2		

fungicidas sistémicos reduce o evita el daño por *Fusarium* spp. cuando parasita como patógeno secundario. En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados prometedores con la aplicación de alcaloides naturales, en la inducción de resistencia sistémica adquirida contra “*Ca. Liberibacter solanacearum*” y/o “*Ca. Phytoplasma americanum*”, observando remisión de síntomas en tomate y reducción de manchado en tubérculos de papa.

Referencias Bibliograficas

Liefting LW, Veerakone S, Ward LI, Clover GRG (2009) First report of '*Candidatus*Phytoplasmaaustraliense' in potato. Plant Dis 93:969
 Nelson W. R. , Sengoda V. G., Alfaro-Fernandez A. O., Font M. I., Crosslin J. M., and Munyaneza J. E. 2013. A new haplotype of “*Candidatus*Liberibactersolanacearum” identified in the Mediterranean region. Eur J PlantPathol. 135:633 - 639.

Santos-Cervantes, M. E., Chávez-Medina, J. A., Acosta-Pardini, J., Flores-Zamora, G. L., Méndez-Lozano, J., and Leyva-López, N. E. 2010. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. Plant Dis. 94:388 - 395.
 Wen A., Johnson C. and Gudmestad N. C. 2013. Development of a PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' Haplotypes and Their Spatiotemporal Distribution in the United States. Am. J. Potato Res. 90:229 - 236