

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' EN PAPA Y TOMATE
EN LOS ESTADOS DE NUEVO LEÓN Y SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO**

POR:

GERARDO ONTIVEROS GUERRA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN

SEPTIEMBRE 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' EN PAPA Y TOMATE
EN LOS ESTADOS DE NUEVO LEÓN Y SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO**

POR:

GERARDO ONTIVEROS GUERRA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

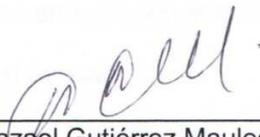
CON ESPECIALIDAD EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN

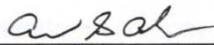
SEPTIEMBRE 2012

TESIS REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

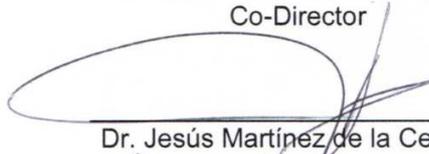
COMITÉ PARTICULAR



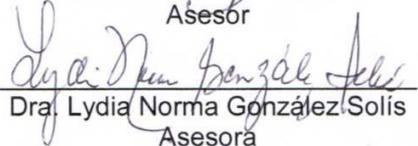
Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón
Director de Tesis



Dr. Omar G. Alvarado Gómez
Co-Director



Dr. Jesús Martínez de la Cerda
Asesor



Dra. Lydia Norma González Solís
Asesora



Ph. D. Francisco Zavala García
Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

A Dios, creador y sustentador de todas las cosas, por permitirme concluir mis estudios de posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por finalizar el proyecto de investigación y por la beca proporcionada durante el posgrado.

A todos mis maestros que creyeron en este proyecto de investigación además de su apoyo incondicional durante todo el periodo.

A mis compañeros y amigos que siempre estuvieron pendientes de la evolución del proyecto, aconsejándome y brindándome su apoyo en todo el proceso de la Maestría en Ciencias.

DEDICATORIA

A mi madre, Micaela Guerra Matamoros por darme la vida y creer en mí, por enseñarme la honestidad y darme las fuerzas para enfrentar la vida.

A mi Padre, Pedro Ontiveros Reyna, por creer en mí, agradeciendo todo el apoyo incondicional, experiencia, además por aconsejarme en esta etapa de mi vida.

A mis hermanos, Mónica, Pedro, Jessie, Lupe y Nena, por escucharme y darme la felicidad, la unión y la confianza que siempre he necesitado.

A Jessy M. por apoyarme en esta etapa de mi vida que hoy se culmina, agradeciendo su paciencia y perseverancia.

Se lo dedico al Dr. Hazael Gutiérrez Mauleon por creer en mí para realizar este proyecto de investigación, así como al Dr. Omar G. Alvarado Gómez, al Dr. Jesús Martínez de la Cerda, a la Dra. Lydia Norma González Solís así como al Dr. Francisco Zavala García.

A mis amigos y compañeros de trabajo, agradeciendo de antemano a toda aquella persona que directa e indirectamente participó para la culminación de este trabajo.

CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Producción Mundial de papa (<i>Solanum tuberosun</i> L.)	5
2.2. Producción Nacional de papa.....	6
2.3. Producción de papa en el estado de Nuevo León.....	7
2.4. Producción Mundial de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	8
2.5. Producción nacional de tomate.....	9
2.6. Producción de tomate en el estado de San Luis Potosí.....	10

2.7. Descripción de la bacteria ‘ <i>Ca. L. solanacearum</i> ’.....	11
2.8. Distribución e importancia del la bacteria ‘ <i>Ca. L. solanacearum</i> ’.....	12
2.9. Métodos de detección.....	17
2.2. Pruebas biológicas.....	17
2.2.1. Detección por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	18
2.2.2. Secuencia del genoma de ‘ <i>Ca. L. solanacearum</i> ’.....	20
2.2.3. Vector.....	21
2.2.4. Ciclo de vida	21
2.2.5. Control químico de bacterias fitopatógenas.....	26
2.2.6. Control químico.....	27
2.2.7. Bactericidas de contacto.....	28
2.2.8. Bactericidas sistémicos (Antibióticos).....	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Ubicación de la zona muestreo.....	33
3.2. Muestreo.....	33
3.3. Extracción de ADN total utilizando el método del producto comercial DNAzol ES [®]	35
3.4. Análisis de muestras.....	37
3.5. Selección de los iniciadores.....	38
3.6. Condiciones de reacción de la PCR y programas térmicos.....	38

3.7. Secuenciación de ADN.....	40
3.8. Análisis de secuencias.....	40
IV. RESULTADOS.....	42
4.1. Detección de 'Ca. L. solanacearum' por PCR.....	42
4.2. Secuenciación y comparación de secuencias.....	50
V. DISCUSIÓN.....	54
VI. CONCLUSIONES.....	58
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	59
VIII. APÉNDICE.....	64
8.1. Preparación de soluciones químicas.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales países productores de papa durante 2007 (FAOSTAT, 2008).....	5
2	Principales países productores de tomate durante 2004 (FAOSTAT, 2004).....	8
3	Ciclo Biológico de <i>B. cockerelli</i> [Sulc].....	22
4	Muestreos realizados en plantas de tomate durante el ciclo agrícola Primavera-Verano 2011 en San Luis Potosí.....	34
5	Muestreos realizados en el cultivo de papa durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2011 en Nuevo León.....	35
6	Oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de ‘ <i>Ca. L. solanacearum</i> ’.....	38
7	Resultados obtenidos a través de las amplificaciones realizadas con diferentes oligonucleótidos, en muestras de tomate y papa obtenidas en diferentes localidades, en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí.....	50
8	Fragmentos moleculares obtenidos con los iniciadores CL514F y CLi.poF de cada una de las secuencias obtenidas.....	51
9	Alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas a partir de plantas procedentes de Cedral y Vanegas, S.L.P.....	52
10	Alineamiento y comparación entre las secuencias obtenidas a partir de muestras de dos parcelas “El Tokio” Municipio de Galeana, Nuevo León y las reportadas en el GenBank, Washington, D.C. EE.UU.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales estados productores de papa en México, durante el año 2010 (SIAP, 2010).....	6
2	Principales municipios productores de papa en el estado de Nuevo León, durante el año 2010 (SIAP, 2010).....	7
3	Principales estados productores de tomate durante el 2010 (SIAP, 2010).....	9
4	Municipios productores de tomate en San Luis Potosí, durante el 2010 (SIAP, 2010).....	10
5	Diagrama representativo del genoma de 'Ca. L. solanacearum', representación circular de 1.26 Mbp (1,258,278 bp).....	20
6	Plantas de tomate con huevecillos del insecto <i>B. cockerelli</i> (Sulc). A) Huevos de coloración amarillo recién ovipositados por los psílidos. B) planta de tomate con huevecillos en bordes del foliolo.	23
7	Plantas de tomate con ninfas de <i>B. cockerelli</i> [Sulc]. A) ninfa en el 5to instar antes de pasar a adulto. B) Ninfas de <i>B. cockerelli</i> en el envés del foliolo de la planta tomate (Abdullah, 2008b).....	23
8	Descripción morfológica del insecto <i>B. cockerelli</i> [Sulc], en fase adulta mostrando ambos sexos macho y hembra, así como la descripción de sus alas y patas (Abdullah, 2008; Nielsen, 2008).....	24
9	Plantas de tomate con presencia de 'Ca. L. solanacearum', en el estado de San Luis Potosí; a) Planta de tomate en Vanegas, S.L.P. en etapa de cosecha. b) Planta de tomate en etapa vegetativa.....	43
10	Plantas de tomate con presencia de 'Ca. L. solanacearum', en la localidad el "Carril", Cedral, S.L.P. a) plantas de tomate indeterminadas con síntomas severos de la enfermedad. b) Plantas de tomate de hábito indeterminado cultivadas bajo malla sombra, con presencia de 'Ca. L. solanacearum' en Cedral, S.L.P.....	44

11	Plantas de papa con presencia de la bacteria ‘ <i>Ca. L. solanacearum</i> ’ en muestras procedentes de la localidad de “El Tokio” Nuevo León. a) Planta de papa mostrando síntomas de entrenudos cortos además de atizamiento foliar. b) Planta de papa con síntomas de amarillamiento foliar y quemaduras de ápices y bordes de folíolos.....	45
12	Gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos en muestras de tomate procedentes de la parcela denominada “El Carril” municipio de Cedral, San Luis Potosí, utilizando los iniciadores OA2 y Oi2c. Carril 1, marcador molecular 100 bp (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 5, nervaduras de folíolos con clorosis intervenal; Carriles 7, pecíolos de folíolos expresando síntomas de amarillamiento; Carriles 4, 6, 8, 9 y 10 muestras negativas.....	46
13	Gel de agarosa mostrando los resultados de las reacciones de PCR utilizando los iniciadores OA2 y Oi2c en muestras procedentes de la parcela denominada “El Carril” municipio de Cedral S.L.P. Carril 1, marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 5, nervaduras central folíolo; Carril 7, pecíolos de folíolos con amarillamiento; Carril 9, pecíolos de hojas asintomáticas; Carril 10, nervadura central de folíolo asintomático; Carriles 4, 6 y 8 muestras negativas.....	47
14	Gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos de las reacciones utilizando los iniciadores OA2 y Oi2c, en muestras de tomate, procedentes de el municipio de Cedral S.L.P. presentando diferentes síntomas. Carril 1, marcador molecular 100 bp (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 4, nervaduras central folíolo; Carril 5, pecíolos de folíolos con amarillamiento; Carril 7, pecíolos de hojas sintomáticas, muestras procedentes del municipio de Vanegas S.L.P; Carriles 6, 8, 9 y 10 muestras negativas.....	47
15	Gel de agarosa al 1.5% mostrando los resultados de las reacciones. Carril 1, Marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 6; muestra positiva a ‘ <i>Ca. L. solanacearum</i> ’ extraída del floema; Carriles 4 y 5 muestras negativas.....	48

16	Gel de agarosa al 1.5% mostrando los resultados de las amplificaciones realizadas con los primers CLi.po/Oi2c Carril 13, Marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 12, control positivo; Carril 10, muestra positiva a la bacteria <i>Ca. L. solanacearum</i> , fragmento obteniendo de 1,070 pb; Carriles 7, 8 y 9 muestras negativas.....	48
17	Gel de agarosa mostrando los resultados de las amplificaciones en muestras procedentes de las localidades de Cedral y Vanegas S.L.P. en plantas de tomate cultivadas en campo abierto y malla sombra.....	49

RESUMEN

Dos de las enfermedades de importancia económica en especies de la familia Solanáceae es el amarillamiento por psíidos y zebra chip (ZC), ocasionadas por la bacteria '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', la cual es transmitida por el insecto *Bactericera cockerelli* [Sulc] (=Paratrioza), considerada plaga primaria de Solanáceas, el objetivo de esta investigación, fue detectar la presencia de '*Ca. L. solanacearum*', en tomate y papa en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí. Durante el ciclo agrícola 2011, se realizaron recorridos de campo colectando muestras de plantas de papa en Nuevo León y tomate en San Luis Potosí, el muestreo se realizó de forma dirigida hacia plantas que expresaron síntomas de amarillamiento irregular, deformaciones en folíolos, atizonamientos foliares, así como entrenudos cortos. Durante el periodo de la investigación, se analizaron 146 muestras de papa y tomate. En el Estado de Nuevo León, se muestrearon parcelas en las localidades: "El Tokio", "San Joaquín", "Pocitos" y "San Roberto", Municipio de Galeana. En San Luis Potosí, se muestrearon parcelas en los Municipios de: Matehuala, Villa de Guadalupe, Cedral y Vanegas, las especies vegetales muestreadas fueron papa (*Solanum tuberosum* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), siendo las dos hortalizas de mayor impacto en la horticultura nacional. Se realizó la técnica de PCR punto final y los oligonucleótidos OA2/Oi2c, CL514F/R, Lp Frag 4-(1611F)/LP Frag 4-480R y CLi.po.F/Oi2c, obteniéndose amplificaciones del patógeno en muestras de tomate sólo con los primers OA2/Oi2c y CL514F/R, mientras que para las muestras de papa sólo se obtuvo amplificación con los oligonucleótidos

CLi.po.F/Oi2c, y no se obtuvo amplificación con los primers Lp Frag 4-(1611F)/Lp Frag 4-480R.

Las secuencias nucleotídicas de 'Ca. L. solanacearum', obtenidas de fragmentos amplificados fueron comparadas con las de mayor homología registradas en el portal electrónico del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), la secuencia obtenida a partir de amplificaciones de muestras sintomáticas, procedentes de la localidad de Cedral, obtuvo un 99% de similitud con la secuencia de 'Ca. L. solanacearum' del GenBank (FJ914618.1). Por lo tanto, la secuencia obtenida a partir de productos amplificados de muestras procedentes de la localidad de Vanegas, San Luis Potosí, obtuvo un 99% de homología con la secuencia de 'Ca. L. solanacearum' GenBank (CP002371.1).

Los fragmentos amplificados de las muestras de plantas de papa, procedentes de la localidad "El Tokio", Municipio de Galena, Nuevo León, fueron secuenciados con el iniciador CLi.po.F obteniéndose una similitud del 95% con la secuencia de 'Ca. L. solanacearum' GenBank (JN848751.1). Con estos resultados se confirma la presencia de esta bacteria en esta zona agrícola.

ABSTRACT

Both economically important diseases in the family Solanaceae species are psyllid yellows and Zebra Chip (ZC), caused by the bacterium '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', which is transmitted by the insect *Bactericera cockerelli* [Sulc] (=Paratrioza), Solanaceae primary pest considered, the objective of this research was to detect the presence of '*Ca. L. solanacearum*' in potato and tomato in Nuevo Leon and San Luis Potosi states. During the agricultural cycle 2011, field trips were made by samples collected potato plants in Nuevo Leon and tomato in San Luis Potosi, sample was performed directed toward expressing plants yellowing symptoms irregular, leaves distortions, foliars burns and short internodes. During the research period, were analyzed 146 samples of potato and tomato. In Nuevo Leon state, plots were sampled in the locations: "El Tokio", "San Joaquin", "Pocitos" and "San Roberto", of Galeana. In San Luis Potosi state, plots were sampled in: Matehuala, Villa de Guadalupe, Cedral and Vanegas, plant species were sampled potato (*Solanum tuberosum* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.), both vegetables are the highest impact in the national horticulture. Was realized endpoint PCR and oligonucleotides OA2/Oi2c, CL514F/R, LpFrag 4-(1611F)/LP and Frag 4-480R CLi.po.F/Oi2c, pathogen amplifications was obtained in tomato samples only with primers OA2/Oi2c and CL514F/R, while that potato samples only was obtained amplification with oligonucleotides CLi.po.F/Oi2c, and there was not amplification with primers LpFrag 4-(1611F)/LPFrag 4-480R.

The nucleotide sequences of '*Ca. L. solanacearum*', amplified fragments obtained were compared with those of high homology registered on the Web site of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the sequence obtained of symptomatic samples amplifications, from the location of Cedral, was obtained 99% similar to the sequence of '*Ca. L. solanacearum*' GenBank (FJ914618.1). Therefore, the sequence obtained of products amplified of samples from Vanegas location, San Luis Potosi, was obtained a 99% homology with the sequence of '*Ca. L. solanacearum*' GenBank (CP002371.1).

The amplified fragments of potato plants samples, from "El Tokio", location of Galena, Nuevo Leon state, were sequenced with primer CLi.po.F was obtained 95% similar with the sequence of '*Ca. L. solanacearum*' GenBank (JN848751.1). These results confirm the presence of this bacterium in this agricultural area.

I. INTRODUCCIÓN

En México, los cultivos de papa y tomate representan una actividad importante dentro de la horticultura nacional, el tomate alcanzó una producción nacional de 2.1 millones de toneladas, destacando los estados de Sinaloa, Baja California, Zacatecas, Baja California Sur, San Luis Potosí y Jalisco (SIAP, 2010), mientras que el cultivo de papa alcanzó una producción de 1.5 millones de toneladas, concentrándose la mayor producción del tubérculo en los estados de Sinaloa, Chihuahua, Sonora, Nuevo León, Coahuila y Guanajuato (SIAP, 2010).

Entre las principales enfermedades que afectan la producción hortícola se encuentran la Cenicilla (Temorfo *Leveillula taurica*), podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), marchitez (*Pythium sp.*, *Fusarium sp.*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*), peca bacteriana (*Pseudomonas syringae pv. tomato.*), Virus mosaico del pepino (*Cucumber Mosaic Virus*) y las enfermedades causadas por las bacterias limitadas al floema, que se caracterizan por inducir necrosis del floema, “amarillamientos” (clorosis foliar), crecimiento reducido, falta de vigor y muerte de la planta (Fletcher y Wayadande, 2009).

La bacteria ‘*Ca. L. solanacearum*’ esta causando daños severos a la producción agrícola en solanáceas. Está enfermedad causada por esta bacteria es denominada zebra chip (ZC), provoca el oscurecimiento interno del tubérculo (papa) al momento de freírlas, síntoma similar al “amarillamiento por psílicos”. Se observó por primera

vez en la localidad de Auckland, Nueva Zelanda; ambas enfermedades son provocadas por la bacteria 'Ca. *L. solanacearum*', que manifiesta síntomas del rayado del tubérculo y en tomate expresa síntomas de enrollamiento y amarillamiento de folíolos, forma asimétrica del fruto, así como disminución en el crecimiento de la planta, identificándose como vector al psílido *B. cockerelli* [Sulc] (=Paratrioza) (Hemiptera; Triozidea) (Liefiting *et al.*, 2008; Workneh, 2012).

La producción de papa en México, es una actividad preponderante, como lo demuestran sus 55 mil has con una producción de 1.5 millones de toneladas; la producción del tubérculo está adquiriendo mayor impulso en los últimos 10 años. Actualmente se cultiva en 22 estados de la República Mexicana (SIAP, 2010); sin embargo, la producción de este cultivo es afectada por una gran cantidad de factores parasitológicos, la enfermedad de "zebra chip" está causando mayores daños que la comúnmente conocida "punta morada", ya que actualmente está afectando al 50% de la superficie nacional y sobre la cual se ha determinado a *B. cockerelli* como vector (Salas, 2006).

Para el caso de tomate, la superficie sembrada en México es de 55 mil hectáreas en sus diferentes modalidades, campo abierto y agricultura de ambiente controlado (SIAP, 2010). La mayor producción de tomate se concentra en los estados de Sinaloa, Guanajuato, Michoacán y San Luis Potosí (SIAP, 2010), aunado a esto, se presentan una gran cantidad de plagas y enfermedades que afectan la producción del cultivo, *B. cockerelli* (=Paratrioza) [Sulc] ocasiona daños directos a la planta al succionar la savia (Munyanza *et al.*, 2007). Cabe mencionar que 'Ca. *L.*

solanacearum', se reportó por primera vez en tomate en "La Cruz de Elota" y en Culiacán, Sinaloa, México; la incidencia de la bacteria se reportó en un 18% a 40% de la superficie sembrada, mostrando síntomas de clorosis, excesivo crecimiento de brotes axilares y crecimiento reducido de las plantas (Munyanzeza *et al.*, 2009b). En los últimos años se ha identificado en el suroeste de EE.UU. un problema en el cultivo de papa para fritura, que causa el oscurecimiento interno de los tubérculos crudos y un color completamente oscuro de las hojuelas. La decoloración se muestra con frecuencia como rayas o franjas y se le ha dado el nombre común de "zebra chip". Los síntomas foliares incluyen clorosis, enrojecimiento de la punta de los brotes y chamuscado de las hojas. Esporádicamente se producen tubérculos aéreos en las plantas enfermas. La enfermedad ha sido asociada con el psílido de la papa *B. cockerelli* (=Paratrioza) [Sulc] (Crosslin y Munyanzeza, 2009), los síntomas de la enfermedad en tomate incluyen enrollamiento y amarillamiento de las hojas, adquiere forma asimétrica el fruto así como efecto reducido en el crecimiento de la planta (Liefiting *et al.*, 2008).

Debido a la importancia que está causando esta enfermedad en los cultivos de tomate y papa, se plantea esta investigación con el siguiente objetivo.

1.1. OBJETIVO

Detectar la presencia de *Ca. L. solanacearum* en tomate y papa en siembras comerciales en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí.

1.2. HIPÓTESIS

Existe la presencia de 'Ca. L. solanacearum' en cultivos comerciales de papa en Nuevo León y de tomate en San Luis Potosí.

Se podrá detectar la presencia de 'Ca. L. solanacearum' en las regiones productoras de papa en Nuevo León y de tomate en San Luis Potosí a través del método PCR punto final.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Producción Mundial de papa (*Solanum tuberosum* L.)

El sector mundial del cultivo de papa atraviesa grandes cambios. Hasta inicios de 1990, cerca del total de los tubérculos se producían y consumían en Europa, América del Norte y en los países de la antigua Unión Soviética. Desde entonces, se ha producido un severo aumento de la producción y demanda del cultivo en Asia, África y América Latina (Cuadro 1), donde la producción aumentó de 30 millones de toneladas a principios de 1960 a más de 165 millones de toneladas en el 2007. En 2005, por primera vez la producción de tubérculo de los países en desarrollo excedió comparada con los países desarrollados. Actualmente China es el primer productor mundial de papa seguido por la India, ubicándose como los principales países productores de papa (Cuadro 1, FAOSTAT, 2008).

Cuadro 1. Principales países productores de papa durante el 2007 (FAOSTAT, 2008).

País	Producción (millones de Ton)
China	72.0
India	26.0
Estados Unidos	20.0
Ucrania	19.0
Polonia	11.0
Alemania	11.0
Belarús	8.7
Países Bajos	7.2
Francia	6.3

2.2. Producción Nacional de papa

En México, se sembraron 54,000 has de papa para consumo, con un rendimiento promedio de 27 ton ha⁻¹ y una producción anual de 1.5 millones de toneladas destacando Sonora y Sinaloa (Figura 1, SIAP, 2010).

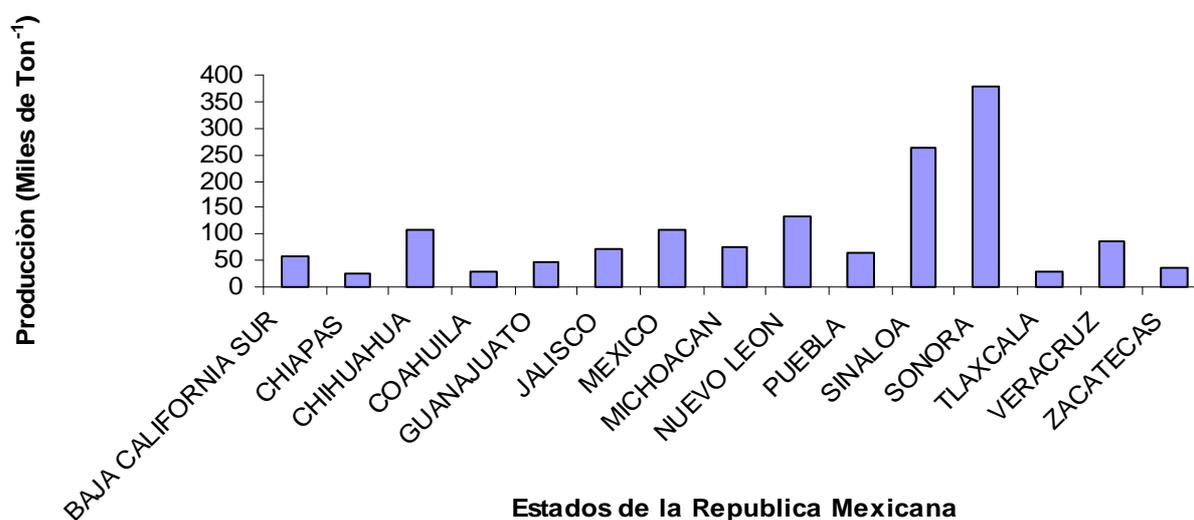


Figura 1. Principales estados productores de papa en México durante el 2010 (SIAP, 2010).

El consumo *per cápita* de papa en México es de 17 Kg, pero las importaciones de Canadá y los Estados Unidos no han dejado de aumentar en los últimos 8 años. EE.UU. se sitúa con el 75% de las importaciones mientras que Canadá con el 25% restante (INEGI, 2007).

2.3. Producción de papa en el estado de Nuevo León

En el estado de Nuevo León, anualmente se establece una superficie aproximada de 3,600 ha de papa bajo condiciones de riego, con un rendimiento promedio de 37 ton ha⁻¹, siendo uno de los más altos a nivel nacional, concentrándose la mayor producción en el municipio de Galeana (Figura 2, SIAP, 2011).

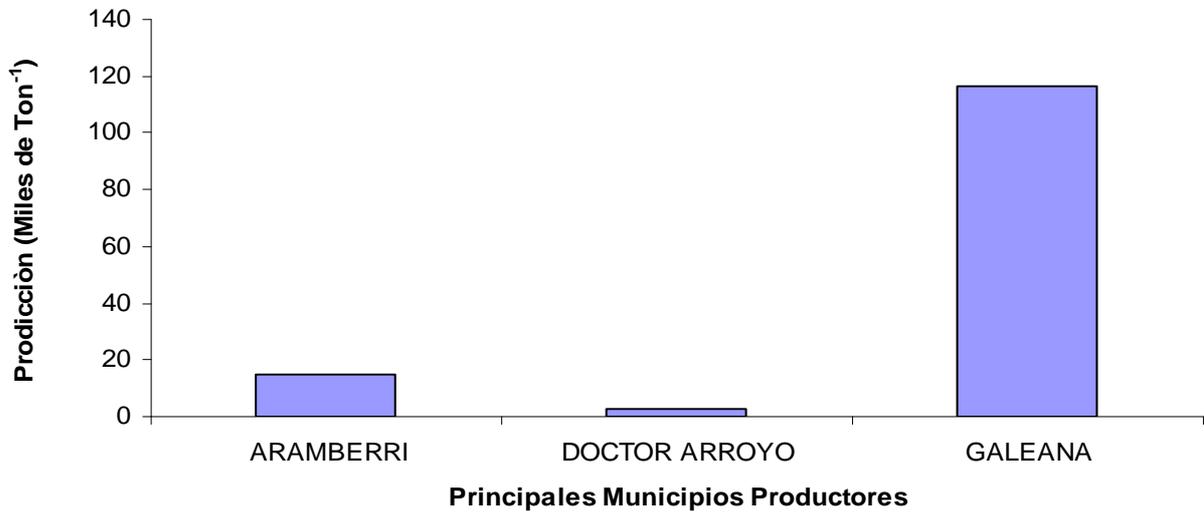


Figura 2. Principales municipios productores de papa en el estado de Nuevo León durante el 2010 (SIAP, 2010).

2.4. Producción Mundial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El fruto de tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años, se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada, esto se atribuye a las nuevas tecnologías que implementan países desarrollados para abastecer el mercado interno (Cuadro 2, FAOSTAT, 2004).

Cuadro 2. Principales países productores de tomate durante 2004 (FAOSTAT, 2004).

País	Producción (millones de ton)
China	30.1
Estados Unidos	12.8
Turquía	8.0
India	7.6
Italia	7.5
Egipto	6.8
España	4.4
Irán	4.2
México	2.1
Nigeria	0.9

2.5. Producción nacional de tomate

En México, se cuenta con una superficie aproximada de 54 mil has cultivadas de tomate en sus diferentes modalidades, campo abierto y agricultura de ambiente controlado. Los principales estados productores son Sinaloa (687,000 ton), Baja California Norte (221,000 ton), Baja California Sur (103,000 ton), Michoacán (155,000 ton), Zacatecas (144,00 has) y San Luis Potosí (98,000 ton) (Figura 3). En el altiplano potosino la producción de tomate ha adquirido un gran impulso. La producción anual de tomate supero las 2 millones de ton. Esta agroindustria cuyo cultivo, cosecha y comercialización genera 72 mil empleos directos y aproximadamente 10.7 millones de empleos indirectos (SIAP, 2011).

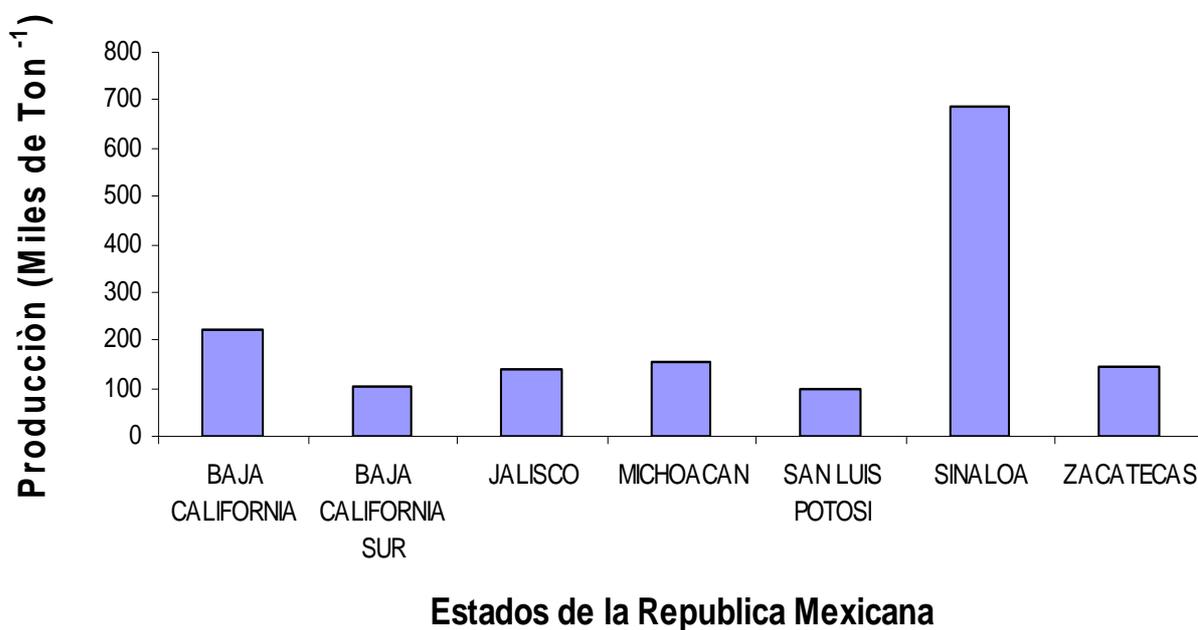


Figura 3. Principales estados productores de tomate durante el 2010 (SIAP, 2010).

2.6. Producción de tomate en el estado de San Luis Potosí

En el estado de San Luis Potosí, se siembra anualmente una superficie aproximada a 2,200 ha de tomate bajo condiciones de campo abierto y agricultura de ambiente controlado, concentrándose la mayor producción en los Municipios de Villa de Guadalupe y Vanegas, ambos Municipios registran los rendimientos más altos en el estado (Figura 4, SIAP, 2010).

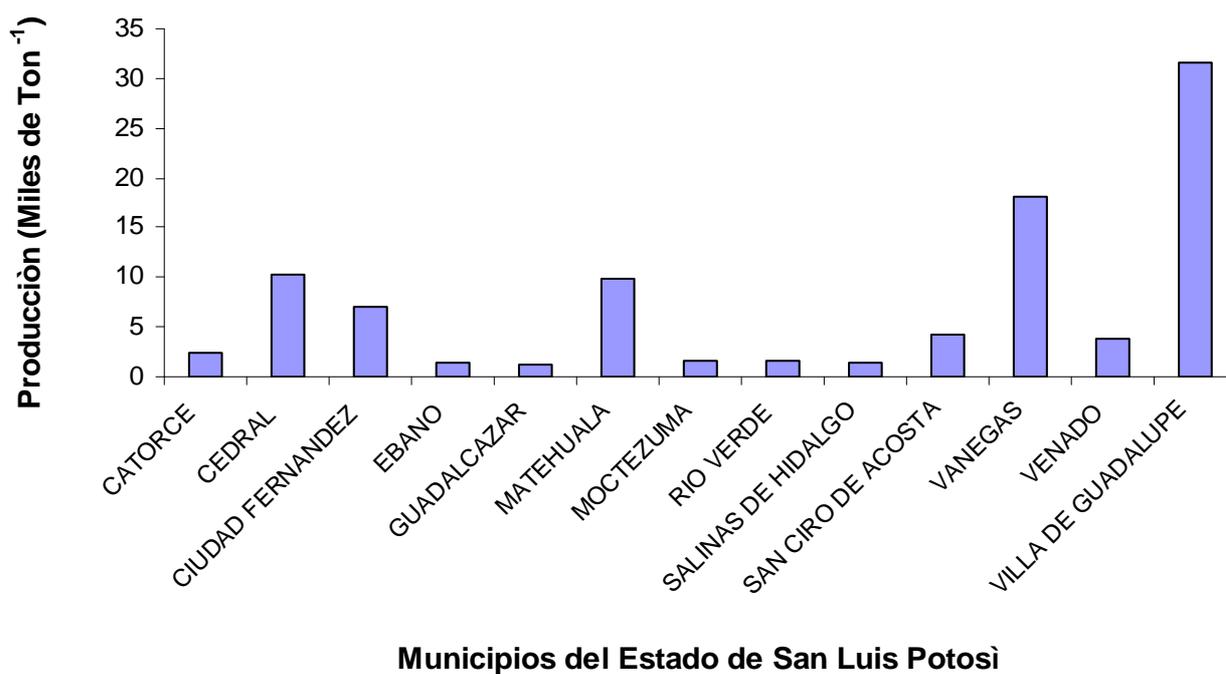


Figura 4. Municipios productores de tomate en San Luis Potosí durante el 2010 (SIAP, 2010).

2.7. Descripción de la bacteria 'Ca. L. solanacearum'

Existe una bacteria denominada 'Ca. L. solanacearum', descubierta recientemente, que afecta la producción en cultivos como la papa, tomate, pimiento (*Capsicum annum*) y zanahoria (*Daucus carota*); esta bacteria es miembro del genero *Liberibacter*, pertenece a la subdivisión Proteobacteria, posee tres capas de células sobre la pared de la membrana exterior y en la membrana citoplasmática interna, además se desarrolla en el floema de las plantas y en el sistema digestivo del insecto vector (*Bactericera cockerelli*) [Sulc]; no se ha podido cultivar *in vitro*, teniendo registros de dos especies definidas por secuencias de ADN en tres regiones diferentes del genoma, la 16S rRNA, indicando que estas bacterias pertenecen al grupo de las *Alphaproteobacterias* (Liefting *et al.*, 2009; Nachappa *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2012).

El agente causal de esta enfermedad 'Ca. L. solanacearum' es una bacteria que a la fecha no se podido cultivar artificialmente, es del tipo Gram-negativa la cual está restringida al floema de las plantas hospederas, esta bacteria pertenece al género *Candidatus Liberibacter*, de la que se conocen las especies asociadas con plantas solanáceas, éstas son; *psyllauros* y *solanacearum*, que probablemente sean sinónimos basados en la secuencias del análisis del gen 16S rRNA. (Bové, 2006; Crosslin y Munyaneza 2009).

2.8. Distribución e importancia de la bacteria 'Ca. L. solanacearum'

A finales del 2008 se reportaron nuevas especies de 'Ca. Liberibacter' asociadas a solanáceas como tomate y papa; también, se indicó que el psílido *B. cockerelli* (=Paratrioza) [Sulc] es el vector que transmite la bacteria 'Ca. L. psyllaurus' (Hansen *et al.*, 2008).

En Marzo del 2009, se reportó una nueva enfermedad en solanáceas en tres invernaderos comerciales en el área de Auckland, Nueva Zelanda, esta enfermedad se presentó en plantas de tomate y pimientos. Los síntomas que se observaron en tomate incluían; enrollamiento y amarillamiento de las hojas, disminución en el crecimiento de la planta y desarrollo anormal del fruto. En los pimientos se presentaron hojas deformadas de color verde pálido o amarillo, con tallos cortos, caída de flores y muerte inmediata de las partes aéreas de las plantas (Liefiting *et al.*, 2008b).

En Sinaloa, plantas de chile exhibieron síntomas similares a los expresados por 'Ca. L. solanacearum', se detectó este patógeno en el cultivo de chile en la localidad de "La Cruz Elota" Sinaloa. Esta enfermedad, además de incluir síntomas semejantes al amarillamiento por psílidos, también redujo el desarrollo de la planta causando, entrenudos cortos y crecimiento apical clorótico (Munyanesa *et al.*, 2009); en ese mismo año, se reportó la presencia de 'Ca. L. solanacearum', en el cultivo de chile, variedad Centella, en Yurécuaro, Tanhuato y Vista Hermosa, Michoacán, con los síntomas de clorosis y fuerte disminución del área foliar, así como deformaciones de

las hojas, reducción del tamaño de la planta y aborto de flores (Hernández, 2009). Síntomas similares se observaron en tomate en la localidad de Lubbock, Texas, asociados a 'Ca. L. solanacearum' (French, *et al.*, 2010). Durante el invierno 2006-2007 en Arizona, 130 ha de tomate fueron infestadas por el psílido *B. cockerelli* (=Paratrioza), estas plantas manifestaron síntomas de amarillamiento y reducción del crecimiento (Brown *et al.*, 2010).

En el 2010 se reportó la presencia de 'Ca. L. solanacearum', en zanahoria en el sur de Finlandia, la transmisión fue atribuida al psílido *Trioza apicalis*, insecto plaga que se presentó en el Norte y Centro del continente Europeo. Los síntomas observados fueron; amarillamiento, deformación de las hojas, clorosis, reducción del tamaño de la planta y proliferación de raíces secundarias (Munyanza *et al.*, 2010). Posteriormente, investigaciones más recientes en la península Ibérica, indicaron que el insecto plaga, *Trioza apicalis* vector de 'Ca. L. solanacearum', se presentó en el Verano de 2008, los síntomas fueron, deformaciones de las hojas con coloraciones amarilla, bronce y púrpura, deformación del pecíolo, retraso en el crecimiento de brotes y raíces primarias, así como proliferación de raíces secundarias, estos síntomas se observaron en 18 lotes comerciales de zanahoria gravemente infestados por psílicos (Alfaro *et al.*, 2012). Además, los daños ocasionados por este insecto plaga en Noruega; afectaron al 70% de los lotes comerciales y todas las variedades cultivadas mostraron aproximadamente del 10 a 100% de plantas sintomáticas. Se ha encontrado también al insecto vector *Trioza apicalis*, plaga de zanahoria en el Norte y Centro de Europa, incluyendo a Noruega; cabe mencionar que los síntomas en las plantas afectadas incluyen deformación de las hojas, clorosis, hojas púrpura,

retraso en el crecimiento y proliferación de raíces secundarias (Munyanza *et al.*, 2012).

Por otro lado, en México se reportaron tubérculos de papa sintomáticos (necrosis y rayado) y asintomáticos en la zona agrícola de Saltillo, Coahuila. Al realizarse el análisis de PCR utilizando los oligonucleótidos CL514F/R y OA2/OI2c, específicos para amplificar al fragmento 16S rDNA, ambos indicaron la presencia de 'Ca. L. solanacearum' (Munyanza *et al.*, 2009c). Estos iniciadores fueron utilizados en el análisis molecular de las muestras de tomate procedentes de Jocotitlan, Estado de México, las plantas expresaron síntomas definidos de clorosis intervenal, aborto de flores y reducción en el tamaño de los frutos, al realizarse las pruebas de PCR correspondientes, se obtuvieron dos fragmentos amplificados a una talla de 669 y 1,168 pb, correspondientes al patógeno 'Ca. L. solanacearum' (Ling *et al.*, 2011).

De acuerdo con las investigaciones realizadas, los análisis de tubérculos mostraron que los extractos metabólicos de las plantas sintomáticas infectadas con 'Ca. L. solanacearum', revelaron una alteración importante en los aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos, además, las concentraciones de tirosina se incrementaron hasta ocho veces, en algunos tubérculos sintomáticos (Navarrete *et al.*, 2009). Se ha demostrado que durante el ataque patogénico de la bacteria 'Ca. L. solanacearum', las células presentan una sobreproducción de oxígeno, esto provoca estrés oxidativo y daño fisiológico. Las plantas aprovechan estas moléculas reactivas para desarrollar estrategias que conducen a la autoprotección contra el patógeno (Sánchez *et al.*, 2010).

Se ha considerado que “zebra chip” o “rayado del tubérculo”, es un problema que a nivel bioquímico, muestra alteraciones en la composición mineral del tubérculo, resultando en la producción de manchas neuróticas internas en el mismo, tanto en la pulpa como en cutícula, indicando también, en resultados de análisis, niveles altos en P (fósforo), K (Potasio) y Ca (Calcio) en el tejido del floema, mientras que en otros tubérculos infectados, se han expresado niveles mayores de los minerales Mg (Magnesio), Cu (Cobre), Zn (Zinc) y B (Boro) (Miles *et al.*, 2009).

Los resultados de muestreos realizados en el cultivo de papa procedentes de la localidad de Mecatepec, Estado de México, revelaron que el 36% de los tubérculos con brotes finos presentaron un color pardo interno y el 58% de los tubérculos sin brotes presentaron el mismo síntoma. El 54% de los tubérculos con brotación anormal fue positivo a ‘*Ca. L. psyllaurus*’, estando asociado esto también, con síntomas de la “punta morada” de la papa en la región de Toluca, Estado de México (Rubio *et al.*, 2011). El manchado interno del tubérculo es un síntoma característico causado por la bacteria ‘*Ca. L. solanacearum*’ (Secor *et al.*, 2009) y se ha encontrado también que esta bacteria afecta la germinación y la morfología del tubérculo, considerados como daños colaterales de la enfermedad en el cultivo de la papa (Henne *et al.*, 2010).

Generalmente, ‘*Ca. L. psyllaurus*’ y ‘*Ca. L. solanacearum*’, son transmitidos por el psílido *B. cockerelli* [Sulc], insecto polífago que se alimenta del floema de una amplia variedad de plantas, entre las que se encuentran principalmente el tomate, la papa y el chile (Hansen *et al.*, 2008). Además, este insecto tiene un amplio número de

plantas hospederas, entre las que se encuentran; la Hierba Mora (*Solanum nigrum*), Toloache (*Datura stramonium*), Jara o jarilla (*Senecio salignus*), Mala mujer o duraznillo (*Solanum rostratum*), Hojasén (*Flourensia cernua*), Correhuela (*Convolvulos arvensis*) y Cilindrillo (*Lycium berlandieri*), entre otras (Galaviz *et al.*, 2010; Goolsby *et al.*, 2008).

El amarillamiento por psílicos, se ha considerado como una reacción de la planta a compuestos existentes en la saliva del psílido y que se trasmite al alimentarse éste de la planta (Eyer, 1937; Richards y Blood, 1933). Los avances en la investigación de las técnicas moleculares, han permitido detectar el “rayado del tubérculo”, síndrome causado por ‘Ca. L. solanacearum’ (Sengoda *et al.*, 2009).

La bacteria *Liberibacter*, causa el amarillamiento de las hojas, reduciendo el número de tubérculos y en casos severos, puede causar la muerte de la planta. Este amarillamiento de las hojas ha sido llamado “amarillamiento por psílicos”, que ha sido reportado en cultivos de papa en los EE.UU. de Norteamérica (Hansen *et al.*, 2008).

Actualmente, la estrategia más efectiva para controlar esta enfermedad es enfocarse al control químico del psílido utilizando sustancias activas como el Imidacloprid[®] además, realizar aplicaciones de Abamectina y Spiromesifen[®]. Aunque es importante considerar que un manejo más efectivo de este insecto plaga, requiere también del conocimiento de su biología, ecología, distribución geográfica y dinámica poblacional (Munyaneza *et al.*, 2011; Gharalari *et al.*, 2009).

Otra valoración que se recomienda considerar en el Manejo Integrado de la Plaga (MIP), es lo referente al papel potencial de los enemigos naturales del insecto entre los que se han identificado a *Orius tristicolor*, *Geocoris pallens*, *Hippodamia convergens* y el parasitoide *Tamarixia triozae*. Estos se han utilizado en California EE.UU. con este propósito y han dado buenos resultados (Douglas, 2011).

2.9. Métodos de detección

Los métodos utilizados para detectar a la bacteria limitada al floema de la planta *Ca. L. solacearum*, incluyen las pruebas biológicas utilizando plantas indicadoras, aunque las nuevas tecnologías de detección utilizan las pruebas moleculares como la PCR tiempo real y punto final. Ambas técnicas moleculares son de alta precisión para su diagnóstico, por lo que actualmente su uso está adquiriendo un gran impulso en la agricultura, por la efectividad que estas representan.

2.2. Pruebas biológicas

Por tratarse de una bacteria que se limita al floema de la planta, es necesario utilizar una fracción de tejido (brotes) vegetal infectado con este patógeno y colocarlo en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del tejido transferido. Una vez obtenido el nuevo brote de la planta, aproximadamente después de la tercera semana se presenta la reacción consistiendo en quemaduras en bordes y ápices, además de una disminución en el crecimiento de la planta, así como también, una clorosis foliar (Crosslin y Munyaneza, 2009).

2.2.1. Detección por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La técnica de PCR utilizada como método de diagnóstico basado en la detección del ácido nucleico (ADN), fue desarrollada en 1985 por el científico Karry B. Mullis. El termino "Reacción en Cadena de la Polimerasa", se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco se duplican por el ADN polimerasa; al final de cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. En general, los componentes requeridos para una PCR son iniciadores (oligonucleótidos) específicos que amplifican al gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; una mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), solución amortiguadora de reacción y ADN polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos que son los siguientes.

1) Desnaturalización (92-98 °C 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.

2) Alineamiento (50-60 °C, 30-60 segundos), en esta etapa se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.

3) Extensión (70-74 °C 30-90 segundos), el ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero contiene ahora el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza éstas en cadenas dobles (Barrera, 1993).

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial (2^{17}) del segmento de ADN blanco, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la PCR, es el resultado de la suma de la longitud de los dos iniciadores más la distancia del ADN blanco amplificado por éstos (Barrera, 1993).

El uso de una enzima termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq) en vez de una enzima termolábil (fragmento Klenow de la polimerasa de ADN) ha simplificado mucho el proceso (Sambrook y Russell, 2001).

Este notable proceso fue ideado por el investigador de la Compañía Cetus, en Emerville, California EE.UU. Ese mismo año, la PCR fue perfeccionada por otros investigadores del mismo grupo y se aplicó exitosamente en el diagnóstico clínico. Desde entonces, el crecimiento de artículos que se basan en la PCR, más que

exponencial, cada día con más aplicaciones de esta metodología en áreas muy variadas de la biomedicina (Barrera, 1993).

2.2.2. Secuencia del genoma de 'Ca. L. solanacearum'

Zebra chip esta asociada con 'Ca. L. solanacearum' una alfa proteobacteria transmitida por el psílido vector, *B. cockerelli* [Sulc]. Con el propósito de conocer con exactitud el genoma de 'Ca. L. solanacearum', se realizaron más de 200,000 resecuenciaciones. Estos esfuerzos condujeron al cierre exitoso de todas las aberturas de la secuencia en el genoma, dando como resultado el ensamblaje en el cromosoma circular consistente en 1,258,278 pb (Figura 5, Lin *et al.*, 2011).

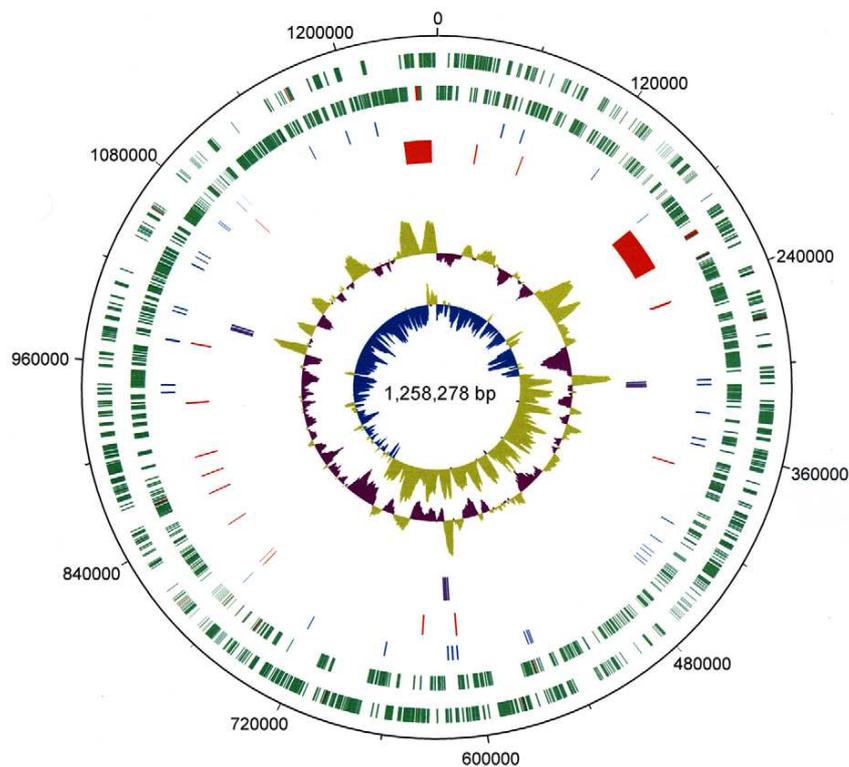


Figura 5. Diagrama representativo del genoma de 'Ca. L. solanacearum', representación circular de 1.26 Mbp (1,258,278 bp).

2.2.3. Vector

El psílido de la papa, *B. cockerelli* [Sulc], se ha identificado recientemente como el vector de 'Ca. L. solanacearum'; actualmente, la estrategia más efectiva para manejar esta enfermedad de la papa, es enfocarse al control del psílido por medio de insecticidas. El manejo efectivo de este insecto plaga requiere del conocimiento de su biología, ecología, distribución geográfica y dinámica poblacional (Hansen *et al.*, 2008; Munyaneza *et al.*, 2009; Crosslin y Munyaneza, 2009; Munyaneza *et al.*, 2011).

2.2.4. Ciclo de vida

El insecto *B. cockerelli* expresa una metamorfosis incompleta estableciendo un periodo comprendido de 34.5 días, iniciando en la etapa de huevo y cinco etapas de ninfa hasta llegar a adulto, estas etapas se determinan por la temperatura, teniendo como optima 26-27 °C con 60 a 70% de humedad relativa. Este insecto se presenta con mayor incidencia en zonas agrícolas de papa, tomate, tomate de cáscara y chile, (Cuadro 3, Abdullah, 2008; Gao, 2009).

Cuadro 3. Ciclo Biológico de *B. cockerelli* [Sulc] (Abdullah, 2008).

Instar/Periodo	Días
Total del ciclo	34.5
Periodo total de desarrollo	28.4
Desarrollo de la ninfa	21.4
Incubación	6.7
Longevidad del adulto en laboratorio	
Macho	22.0
Hembra	48.7
Longevidad del adulto en campo	
Macho	18.0
Hembra	16.0

Huevo. De acuerdo a la Figura 6, los huevos del psílido se adjuntan a la hoja y la mayoría se ovipositan a lo largo del borde del folíolo, son de forma oblonga y un color amarillo brillante, se tornan de color naranja conforme se desarrolla el embrión. Los psílicos hembra pueden ovipositar hasta 231 huevos a lo largo de las cuatro semanas de vida (Abdullah, 2008b).

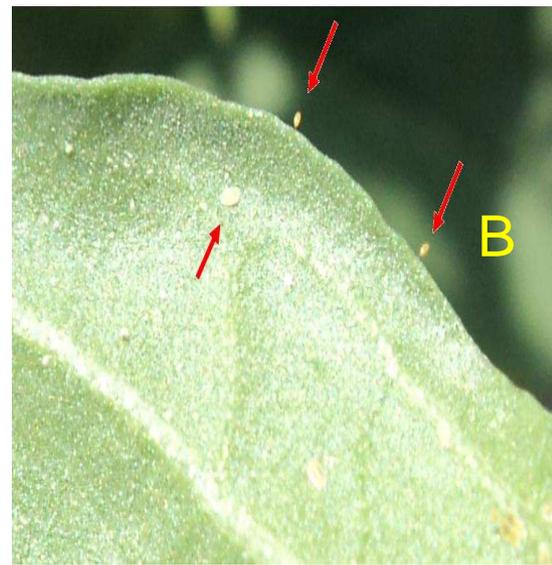
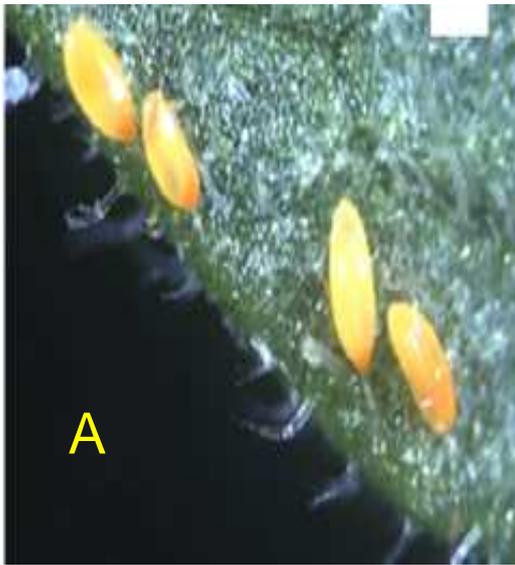


Figura 6. Plantas de tomate con huevecillos del insecto *B. cockerelli* (sulc). A) Huevos de coloración amarillo recién ovipositados por los psílidos. B) planta de tomate con huevecillos en bordes del folíolo (Abdullah, 2008).

Ninfa. En la Figura 7 se presentan las ninfas del psílido que llegan a medir 2 mm de longitud y se encuentran generalmente en la parte inferior (envés) de las hojas, estas se alimentan con frecuencia succionando savia de los folíolos (Nielsen, 2008).

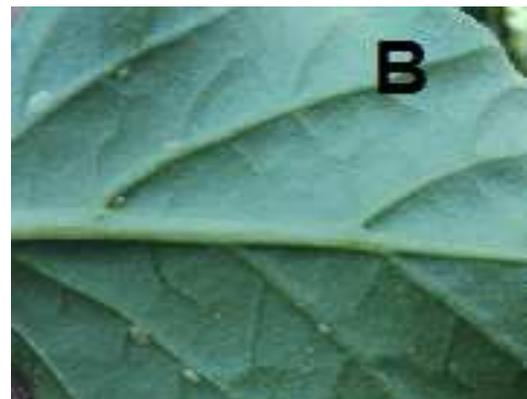
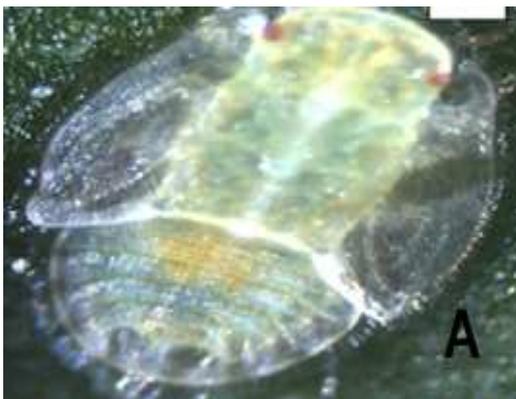


Figura 7. Plantas de tomate con ninfas de *B. cockerelli* [sulc]. A) ninfa en el 5to instar antes de pasar a adulto. B) Ninfas de *B. cockerelli* en el envés del folíolo de la planta de tomate (Abdullah, 2008).

Adulto. El psílido de la papa y del tomate es un insecto con alas claras de 2 mm de longitud, se asemejan a una pequeña cigarra, los psílidos adultos cambian de color a medida que envejecen, los adultos tienen un segmento blanquecino en su abdomen. Al igual que las ninfas, los adultos prefieren las plántulas recién trasplantadas para la oviposición (Liu y Trumble, 2006). En la Figura 8 se muestra la descripción morfológica del insecto adulto *B. cockerelli* [Sulc], a continuación se nombran algunas características de acuerdo a la Figura 8: A) Las especies pertenecientes a la familia Triozidae han trifurcado la vena basal de las alas anteriores; B) *B. cockerelli* [Sulc] puede identificarse, por los tres espolones apicales en las tibias de las patas traseras; C) La ala anterior del insecto tiene características adicionales, la membrana es transparente sin coloración; D) Insecto macho mostrando los genitales, E) Insecto hembra mostrando los genitales en el extremo del abdomen (Abdullah, 2008; Nielsen, 2008).

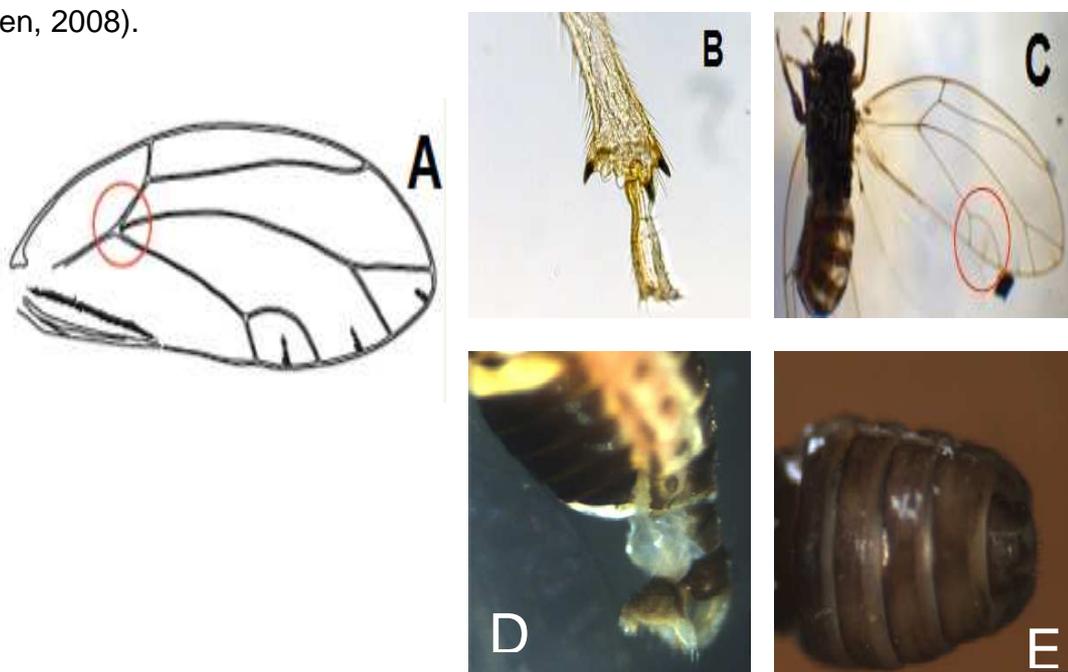


Figura 8. Descripción morfológica del insecto *B. cockerelli* [Sulc], en fase adulta mostrando ambos sexos, macho y hembra, así como la descripción de sus alas y patas (Abdullah, 2008; Nielsen, 2008).

Síntomas en tomate. Las sustancias granulares se secretan por la alimentación de las ninfas del psílido, por lo que este puede ser el indicio más evidente de la infestación por psílicos; estos efectos se notan mucho antes de que se observen daños. Cuando las ninfas se alimentan, inyectan la toxina en la planta causando amarillamiento por psílicos, los síntomas son amarillamiento de los bordes de las hojas jóvenes, que progresivamente se desarrollan en el tejido causando la muerte y el alargamiento del tallo (MAFBNZ, 2008). Durante los años 2006 – 2007 en Arizona, 129 hectáreas de agricultura protegida se infestaron con el psílido *B. cockerelli*; del 20% al 60% de las plantas exhibieron síntomas de clorosis y entrenudos cortos, así como disminución en el crecimiento. Una vez realizados los análisis de PCR y secuenciación se llegó al resultado de que las secuencias tenían un 99% de similitud con la secuencia de la bacteria ‘*Ca. L. solanacearum*’ (Brown *et al.*, 2010). En el área de Lupton, Colorado, EE.UU. plantas de tomate exhibieron síntomas de amarillamiento, crecimiento reducido, clorosis, además de frutos pequeños (McKenzie y Shatters, 2009).

Síntomas en papa. Los síntomas de la enfermedad en tubérculos de plantas afectadas por “zebra chip” (ZC), presentan oscurecimiento severo del tejido vascular concomitante con “pecas necróticas”, que en ambos casos pueden afectar al tubérculo completo. Al freírse, estos tubérculos desarrollan un patrón característico de rayado disminuyendo el valor comercial. Se ha sugerido que estos síntomas característicos en los tubérculos están asociados con muerte de las células (Miles *et al.*, 2010). En las partes aéreas, las dos enfermedades de la papa, el amarillamiento de la papa por psílicos y zebra chip (ZC), están asociadas con el psílido de la papa

B. cockerelli [Sulc]. Los síntomas aéreos de la planta por ambas enfermedades son similares, pero hay una diferencia en los síntomas del tubérculo. La enfermedad de zebra chip se ha asociado recientemente con una nueva especie de bacteria *Liberibacter*, '*Ca. L. solanacearum*', también conocida como '*Ca. L. psyllaerous*' (Sengoda *et al.*, 2009).

2.2.5. Control químico de bacterias fitopatógenas

Las bacterias son organismos microscópicos sumamente pequeños, que normalmente están constituidas por células procariontes simples. En general, los procariontes son microorganismos unicelulares que tienen una membrana celular o bien una membrana y una pared celular rodeando al citoplasma, el cual contiene pequeños ribosomas. Las bacterias se ubican en el Reino Procariotae cuyo origen es de 3.5 billones de años, constituían la única forma de vida sobre la tierra (Virgen, 2010). Existen dos clases de procariontes que ocasionan enfermedades en las plantas:

- A. Las bacterias, que tienen membrana celular, una pared rígida y con frecuencia uno o más flagelos.
- B. Los fitoplasmas los cuales carecen de pared celular y sólo poseen una membrana unitaria típica.

Las pérdidas en rendimiento causadas por enfermedades bacterianas dependen de las condiciones ambientales ya que estas afectan el desarrollo de la enfermedad y cuando su manejo es inadecuado, la enfermedad puede destruir por completo al

cultivo. En ocasiones, la productividad del cultivo se ve afectada en varias épocas, debido a que el patógeno bacteriano se ha establecido en campo

Las enfermedades causadas por bacterias son difíciles de controlar utilizando compuestos químicos, ya que éstos pueden provocar resistencia; además, las bacterias fitopatógenas producen abundantes cantidades de polisacáridos extracelulares, los cuales las protegen de algunos agentes químicos antibacteriales. El éxito en el control de una enfermedad bacterial se basa en romper con el ciclo de vida y para esto, es necesario conocer el agente causal, los síntomas, la forma de diseminación y los factores ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad; el conocimiento de estos son de utilidad ya que permite un diseño adecuado de un plan de prevención y control de la enfermedad. Sin embargo, diversos métodos de control, tales como control químico, control biológico, control cultural y uso de variedades resistentes, generan un manejo integrado (Virgen, 2010).

2.2.7. Control químico

Antes de considerar el uso de compuestos químicos para el control de bacterias fitopatógenas, se debe considerar la importancia económica de la enfermedad. (Paulin, 1992a). El control químico de bacterias fitopatógenas se ha venido realizando desde hace muchos años, especialmente después de que apareciera el caldo bórdeles, iniciando entonces la época de los bactericidas basado en

compuestos cúpricos, los cuales hoy en día siguen siendo considerados como una alternativa para el manejo de estos fitopatógenos (Paulin, 1992).

El objetivo principal del control químico es eliminar a las bacterias antes de que estas penetren el tejido hospedero, ya sea por la eliminación de la población de la bacteria ó mediante la eliminación de inóculo; se pueden eliminar con aplicaciones en las lesiones existentes (cancros ó necrosis), ó mediante la protección de los sitios potenciales de invasión (estomas en las hojas, en nectarios flores, heridas), lo cual puede lograrse con una aplicación preventiva en las plantas sanas, antes de su contaminación por la bacteria (Paulin, 1992).

Los compuestos químicos utilizados para el control de bacterias pueden clasificarse en tres categorías:

- a) Metal pesado: Cu (sales y compuestos cúpricos).
- b) Antibióticos: Estreptomina, oxytetraciclina, gentamicina, ácido oxólinico y kasugamisina.
- c) Otros compuestos: Inductores de defensa y resistencia (Fosetil-AI, Acibenzolar-S-metil) (Virgen, 2010).

2.2.8. Bactericidas de contacto

Esencialmente en este grupo se encuentran los compuestos cúpricos, los cuales incluyen sulfato tribásico de cobre, sulfato de cobre pentahidratado, hidróxido cúprico y oxiclورو de cobre, los cuales actúan dañando las membranas y proteínas de las

bacterias (Cooksey, 1990); así mismo, se ha propuesto que el Cu^{++} es tóxico por el enlazamiento a grupos ionogénicos en la superficie de la célula, causan también el rompimiento del metabolismo por daño a la membrana de la célula, desnaturalizando de manera no específica proteínas y enzimas involucradas en la respiración; también interfiere con la osmoregulación, proceso mediante el cual el organismo mantiene un balance óptimo de agua (Cox, 1991). Adicionalmente, se ha observado que algunas cepas de *Erwinia amylovora* pueden entrar en una fase de células viables pero no cultivables después de la exposición al Cobre, por lo tanto, las cepas de la bacteria adquieren mecanismos de resistencia al Cobre (Ordax *et al.*, 2006).

2.2.9. Bactericidas sistémicos (Antibióticos).

Los antibióticos se han utilizado desde la década de los 50's para el control de ciertas enfermedades bacterianas en frutales, hortalizas y plantas ornamentales (McMannus *et al.*, 2002).

La definición clásica de un antibiótico es una sustancia producida por un microorganismo que inhibe o mata a otro organismo; sin embargo, en años recientes la definición se ha expandido para incluir ciertos agentes antibacterianos sintéticos y semisintéticos (McManus *et al.*, 2002).

Los antibióticos utilizados en la agricultura incluyen lo siguiente:

1) Estreptomicina. Antibiótico aminoglicósido el cual es formulado como sulfato o nitrato de estreptomicina y desde su introducción en 1955 ha sido el principal

antibiótico utilizado en la agricultura. Entre los patógenos en los que se ha utilizado figuran: *Pectobacterium (Erwinia)*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium* (Virgen, 2010).

Antibiótico del grupo de los Aminoglicósidos:

Nombres comerciales; Agrimycin 100, Agrimycin 17, Agri strep, Cuprimicin 100, AgrimyCu 100, Bactrol 2X, Bacter stop

Modo de acción;

Enlaza aminoácidos específicos de la subunidad 30S ribosomal. Provoca cambios en la configuración de proteínas y evita el enlace de ellas (García, 2008).

2) Oxytetraciclina. Es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas, formulado comúnmente como un complejo de oxytetraciclina de calcio ó hidrocloreuro de oxytetraciclina, ha sido utilizado para el control de *Erwinia amylovora* como en *Xanthomonas* y *Pseudomonas* en varios países (McManus *et al.*, 2002).

Nombres comerciales:

Terramicina Agrícola 5%[®], Myco shield[®], Terra Q 5%[®], Cuprimicina agrícola[®].

Modo de acción.

Actúa a nivel ribosomal sobre la producción de aminoácidos, ligándose a una de las proteínas en la subunidad 30s ribosomal (García, 2010)

3) Gentamicina. Antibiótico aminoglicosido, formulado comúnmente como sulfato de gentamicina y algunas veces mezclado con oxytetraciclina, el cual se ha utilizado para el control de tizón de fuego de peral y manzano, así como en varios cultivos

hortícolas con enfermedades bacterianas causadas por diversos géneros, entre estos *Pectobacterium (Erwinia)*, *Pseudomonas* y *Ralstonia* (McManus *et al.*, 2002).

Nombres comerciales: Agrigent[®], Genoxi[®], Dosis 100 ppm cada 5-7 días. No mezclar con tetraciclinas.

4) Ácido Oxolinico. Es un antibiótico sintético del grupo de las quinolonas, el cual se ha utilizado especialmente en Israel para el control del tizón de fuego de peral y manzano a dosis de 300 ppm (Shteinberg, 2001), especialmente en áreas donde se ha detectado resistencia a la estreptomicina (McManus *et al.*, 2002).

5) Kasugamicina. Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos ciclitol obtenido de la fermentación de *Streptomyces kasugaensis*. Este antibiótico se ha utilizado en diversas áreas del mundo y en distintos cultivos. Este antibiótico se cree que actúa inhibiendo el inicio de la trasducción en el tRNA (Woodcock *et al.*, 1991). En melón se ha utilizado en Brasil para el control de *Acidovorax avenae subsp. citrulli* a dosis de 400 ml/100 lt de agua con eficacia de 86.66% (Da Costa *et al.*, 2006). Recientemente este antibiótico, ha sido registrado por la EPA para su uso en ocho hortalizas con tolerancias de 0.04 ppm (EPA, 2008).

Antibiótico del grupo de los Aminoglucósidos.

Fungicida bactericida.

Nombres comerciales Kasumin.

No mezclar con productos de reacción alcalina.

Definitivamente, para alcanzar el éxito de la aplicación de los compuestos químicos antes señalados (Cu, antibióticos e inductores de defensa), se debe considerar que la aplicación de estos se debe realizar de manera preventiva, o en el caso de los antibióticos en etapas muy tempranas, considerando las condiciones ambientales que puedan favorecer la presencia y desarrollo de las bacterias en las plantas; además, se debe tener en cuenta factores que favorecen a la aplicación misma y que influyen el éxito de control, estos incluyen:

- a) Momento oportuno de la aplicación.
- b) Producto adecuado de acuerdo al tipo de patógeno.
- c) Dosis adecuada del producto.
- d) Método y equipo de aplicación (cantidad de agua, tipo de boquilla, hora de aplicación, condiciones climáticas, etc.).

Finalmente, un antibiótico ideal de acuerdo a García (2008) debe tener características que le permitan un uso eficiente en el control de enfermedades, causadas por bacterias, estas incluyen:

- 1. Dosis correcta.
- 2. Utilización de penetrantes.
- 3. Número de aplicaciones.
- 4. Intervalo de aplicaciones.
- 6. Selección del mejor producto.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de muestreo

En el año 2011 se realizaron recorridos de campo en dos estados de la República Mexicana, Nuevo León y San Luis Potosí. En áreas sembradas con tomate del estado de San Luis Potosí, se muestrearon parcelas en los municipios de Matehuala, Villa de Guadalupe, Cedral y Vanegas, en plantas de tomate principalmente tipo saladette de hábito determinado e indeterminado, durante el ciclo agrícola Primavera-Verano 2011 (Cuadro 4). En Nuevo León se muestrearon parcelas de papa en los ejidos; “El Tokio”, “Pocitos”, “San Roberto” y “San Joaquín” pertenecientes al Municipio de Galeana, Nuevo León, el muestreo fue realizado durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2011 (Cuadro 5). En ambos estados las plantas presentaron síntomas similares a los asociados con el patógeno ‘*Ca. L. solanacearum*’.

3.2. Muestreo

Se realizaron recorridos de campo para identificar plantas de tomate que presentaran síntomas de atizonamientos, amarillamientos, deformaciones, enanismo, así como proliferación de hojas y senescencia temprana de las mismas. En papa, se identificaron plantas que expresaron síntomas de atizonamientos foliares, coloraciones púrpura en la parte foliar de la planta, entre nudos cortos, oscurecimiento del floema, así como la proliferación de tubérculos aéreos. Se

tomaron 20 muestras por cada parcela, la muestra fue tomada del tejido que expresaba los síntomas y estuvo compuesta por; folíolo, peciolo, tallo ó fruto. Al realizar la selección de las plantas sintomáticas, cada muestra se colocó en bolsas de plástico identificándolas individualmente, con número y fecha, así como las coordenadas y el municipio al que pertenecía, posteriormente se colocaron en una hielera con gel refrigerante para detener su proceso de descomposición durante su traslado al Laboratorio de Ciencias Naturales, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la UANL ubicada en el Municipio de General Escobedo, Nuevo León.

En los Cuadros 4 y 5 se muestran los lugares donde se obtuvo la muestra de tejido vegetal, en ellos se observa los cultivos hortícolas muestreados en diferentes ciclos agrícolas, así como también las coordenadas de las parcelas ubicadas en los diferentes Municipios de los estados de Nuevo León y San Luis Potosí.

Cuadro 4. Muestreos realizados en plantas de tomate durante el ciclo agrícola Primavera-Verano 2011 en San Luis Potosí.

Municipio	Coordenadas (Latitud y longitud) de la parcela	Cultivo	Genotipos	Número de muestras/Parcela
Matehuala	23° 15' 63'' N 100° 61' 80'' O	Tomate indeterminado	Toros	20
Villa de Guadalupe	23° 15' 63'' N 100° 60' 86'' O	Tomate determinado	Toros	20
Cedral	23° 49' 39'' N 100° 43' 53'' O	Tomate indeterminado	Cid	20
Vanegas	23° 91' 30'' N 100° 92' 86'' O	Tomate determinado	Toros	20

Cuadro 5. Muestreos realizados en el cultivo de papa durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2011 en Nuevo León.

Municipio	Ejidó	Coordenadas de la parcela	Cultivo	Genotipos	Número de muestras/parcela
Galeana	Ejido Positos	24° 76' 66" N 100° 31' 38" O	Papa	Vivaldi	20
	Ejido Tokio	24° 68' 08" N 100° 23' 97" O	Papa	Fianna	20
	San Roberto	24° 71' 27" N 100° 30' 41" O	Papa	Fianna	6
	San Joaquín	24° 98' 80" N 100° 50' 30" O	Papa	Atlántic	20

3.3. Extracción de ADN total utilizando el método del producto comercial

DNAzol ES®

Para llevar acabo este proceso, se utilizó el producto de extracción denominado DNAzol ES® recomendado por la casa comercial de MRC® (Molecular Reseach Center) utilizado para vegetales. La muestra empleada para la extracción de ADN, fue de 100 a 200 mg de tejido vegetal ya sea nervadura central, pecíolos, ápices ó tubérculos aéreos. En este protocolo se utilizó el procedimiento del fabricante MRC® con algunas modificaciones; a continuación se presenta el procedimiento para la extracción de ADN.

Se pesó 0.1 g de tejido fresco y se colocó en un tubo de centrifuga nuevo y estéril de 1.5 ml. Se trituró el tejido con el pistilo estéril y se le agregó 0.6 ml del reactivo Plant

DNAzol ES[®]. Se mezcló la solución en vortex y posteriormente se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se agregaron 0.6 ml de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 gravedades (g) durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrifuga nuevo de 1.5 ml.

Se precipitó el ADN mezclando la fase acuosa con 0.75 volúmenes de alcohol etílico absoluto, mezclando las muestras por inversión ocho veces, y se almacenaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se precipitó el ADN centrifugando a 5,000 gravedades (g) por 4 min.

Se preparó una solución de lavado con DNAzol-etanol mezclando un volumen de DNAzol con 0.75 volúmenes de etanol absoluto. Después de decantar se mezcló con 0.6 ml de la solución anterior con el ADN precipitado. Se almacenaron las muestras durante 5 min y se centrifugaron a 5,000 g por 4 min.

Posteriormente, se desechó la solución de lavado y se lavó la pastilla de ADN, mezclando vigorosamente con 0.5 ml de etanol al 80%, seguido por una centrifugación de 5,000 gravedades (g) durante 4 min.

Se removió en etanol por decantación y se colocaron los tubos invertidos en posición vertical por 1-2 min, para secar la pastilla de ADN. Se disolvió la pastilla de ADN en 25 µl de buffer TE (pH 8.0) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

3.4. Análisis de muestras

Con la finalidad de estimar la calidad y cantidad del ADN extraído en las muestras de tomate y papa, se preparó un gel de agarosa al 1.5% y se realizó una separación de moléculas por electroforesis. Se realizó una comparación de las bandas visualizadas en el gel con un perfil de ADN cuantitativo (DNA mass ladder, Promega®).

Posteriormente, se realizó una prueba de amplificación de ADN por PCR a partir de una mezcla con los siguientes reactivos; 5 µl de buffer de PCR 5X, 1.5 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl dNTP's 2.5 mM, 2 µl primer antisentido 10 mM, 2 µl primer sentido 10 mM, 0.2 µL de Go Taq DNA polimerasa 5u/µl (Promega®), 2 µL de ADN total de cada una de las muestras sintomáticas y asintomáticas. Los primers utilizados (16S antisentido/16S sentido) como control interno tuvieron como blanco el gen 16S del ADN del cloroplasto.

Para cada amplificación de la PCR se utilizaron dos cebadores específicos a 'Ca. L. solanacearum', al término de la amplificación los productos de PCR fueron transferidos al gel de agarosa al 1.5%, teñido con 2 µl de Syber Green®, posteriormente, se observó en el transluminador para visualizar la existencia de amplificaciones en muestras positivas al tamaño esperado, según la talla del marcador utilizado.

3.5. Selección de los iniciadores

Para la amplificación de algún segmento del genoma de 'Ca. L. solanacearum', se utilizaron los oligonucleótidos específicos que son compatibles con la región del gen 16s, cuyas características se observan en Cuadro 6.

Cuadro 6. Oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de 'Ca. L. solanacearum'.

Iniciadores	Talla esperada del fragmento amplificado (pb)	Referencia
OA2/Oi2c	1,160	Liefting <i>et al.</i> (2008) Jagoueix y Cols (1996)
CL514F/R	669	Crosslin y Bester (2009)
CLi.po. F/Oi2c	1,070	Secor <i>et al.</i> (2009)
LpFrac 4-1611/ LPFrac 4-480	1,168	Hansen <i>et al.</i> (2008)
16S F/16SR	315	Liefting <i>et al.</i> (2008)

pb= pares de bases.

3.6. Condiciones de reacción de la PCR y programas térmicos

Oligonucleótidos OA2/Oi2c para amplificar un fragmento a 1,160 pb.

En las reacciones de PCR se utilizaron el par de oligonucleótidos OA2/Oi2c (5'-GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA - 3') (5' -GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT - 3') los cuales se colocaron en el termociclador con el siguiente programa de temperaturas: primer paso: 94 °C por 5 min, segundo: paso 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C, por 1 min, por 36 ciclos. Tercer paso : Una extensión final de 6 min a 72 °C.

Oligonucleótidos CL514F/R para amplificar un fragmento a 669 pb

Los primers CL514F/R (5'-CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT-3' y 5'-TATATCTATCGTTGCACCAG-3') se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la reacción de PCR, con el siguiente programa de temperaturas; primer paso: 94 °C por cinco min, segundo paso: 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s y 72 °C por un minuto durante 36 ciclos, y una extensión final de 6 min a 72 °C. Este par de iniciadores amplifican al gen 16S ARN, a la talla de 669 pb.

Oligonucleótidos CLi.po. F/Oi2c que amplifican un fragmento a 1,070 pb

En esta reacción se utilizaron los iniciadores CLi.po. (5'TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT-3') y Oi2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCAT-3'). Se colocaron los tubos con las muestras respectivas en el termociclador con el siguiente programa de temperaturas: primer paso: 94 °C por un minuto. Segundo paso: 95 °C por cinco s, 68 °C por 30 s, 72 °C por un minuto, durante 30 ciclos y tercer paso una extensión final de 72 °C por 5 min. Estos iniciadores amplifican un fragmento al tamaño de 1,070 pb y fueron diseñados para el gen 16S rARN.

Iniciador Lp Frag 4-(1611F)/ LP Frag 4-480R para amplificar una talla de 918 pb

Las condiciones del termociclador para los iniciadores Lp Frag 4-(1611F)/ LP Frag 4-480R (5-GGTTGATGGGGTCATTTGAG-3 y 5- CACGGTACTGGTTCACTATCGGTC-3) fueron las sig; primer paso: 94 °C por tres min, segundo paso: 94 °C por 20 s, 60 °C por 20 s, 72 °C por un min, durante 39 ciclos, tercer paso: una extensión final de 72 °C por 5 min. Este par de primers amplifican el espacio intergénico del gen 16S-23S ARN, para la detección de 'Ca. L. solanacearum'.

Oligonucleótidos 16SF/16SR

Este par de primers es dirigido al ADN de cloroplasto, una vez realizada cada una de las reacciones se sometieron al siguiente programa de temperaturas del termociclador; primer paso: 92 °C por un min, segundo paso: 92 °C un minuto, 60 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, durante 30 ciclos, y tercer paso con una extensión final de 72 °C por 4 min, este par de iniciadores amplifican un segmento del ADN de cloroplasto a la talla de 315 pb.

3.7. Secuenciación de ADN

Los productos amplificados de las muestras positivas a 'Ca. L. solanacearum' fueron enviados en la compañía MacroGen (EE.UU.) para su secuenciación. Los iniciadores utilizados en las reacciones de secuenciación fueron, CL514F y CLi.poF, los productos secuenciados, fueron representativos de las localidades de Cedral y Vanegas S.L.P. Así mismo, aquellos provenientes de las muestras de la localidad "El Tokio", Nuevo León.

3.8. Análisis de Secuencias

Las secuencias obtenidas se observaron en el programa Fintsh TV, posteriormente se transfirieron los datos al Software BLAST del GenBank. La secuencia editada se comparó con las secuencias de mayor homología disponible del GenBank, posteriormente se realizó un alineamiento de secuencias a través del programa

Standard Nucleotide BLAST, para obtener el porcentaje de la similitud de las secuencias obtenidas.

IV. RESULTADOS

4.1. Detección de '*Ca. L. solanacearum*' por PCR

De acuerdo con la Figura 9, las plantas muestreadas de tomate mostraron síntomas de amarillamiento, deformación de hojas, clorosis y senescencia foliar prematura, así como atizonamiento de folíolos. Estos síntomas estuvieron presentes en aquellas plantas cuyos productos amplificados, mostraron la presencia de la bacteria. La sintomatología observada en la parcela de Vanegas, San Luis Potosí, está correlacionada con la presencia de la bacteria *Ca. L. solanacearum*, a través de los productos amplificados por PCR.

En la localidad denominada "El Carril", ubicada en Cedral, San Luis Potosí (Figura 10) se realizaron muestreos en plantas de tomate de hábito indeterminado bajo condiciones de malla sombra y se encontraron plantas que mostraron síntomas de atizonamientos en ápices y bordes de folíolos, destacando los síntomas de necrosis foliar, clorosis intervenal, así como deformaciones de folíolos. Una vez analizadas las muestras por PCR, se confirmó la presencia de la bacteria '*Ca. L. solanacearum*' en estas plantas.

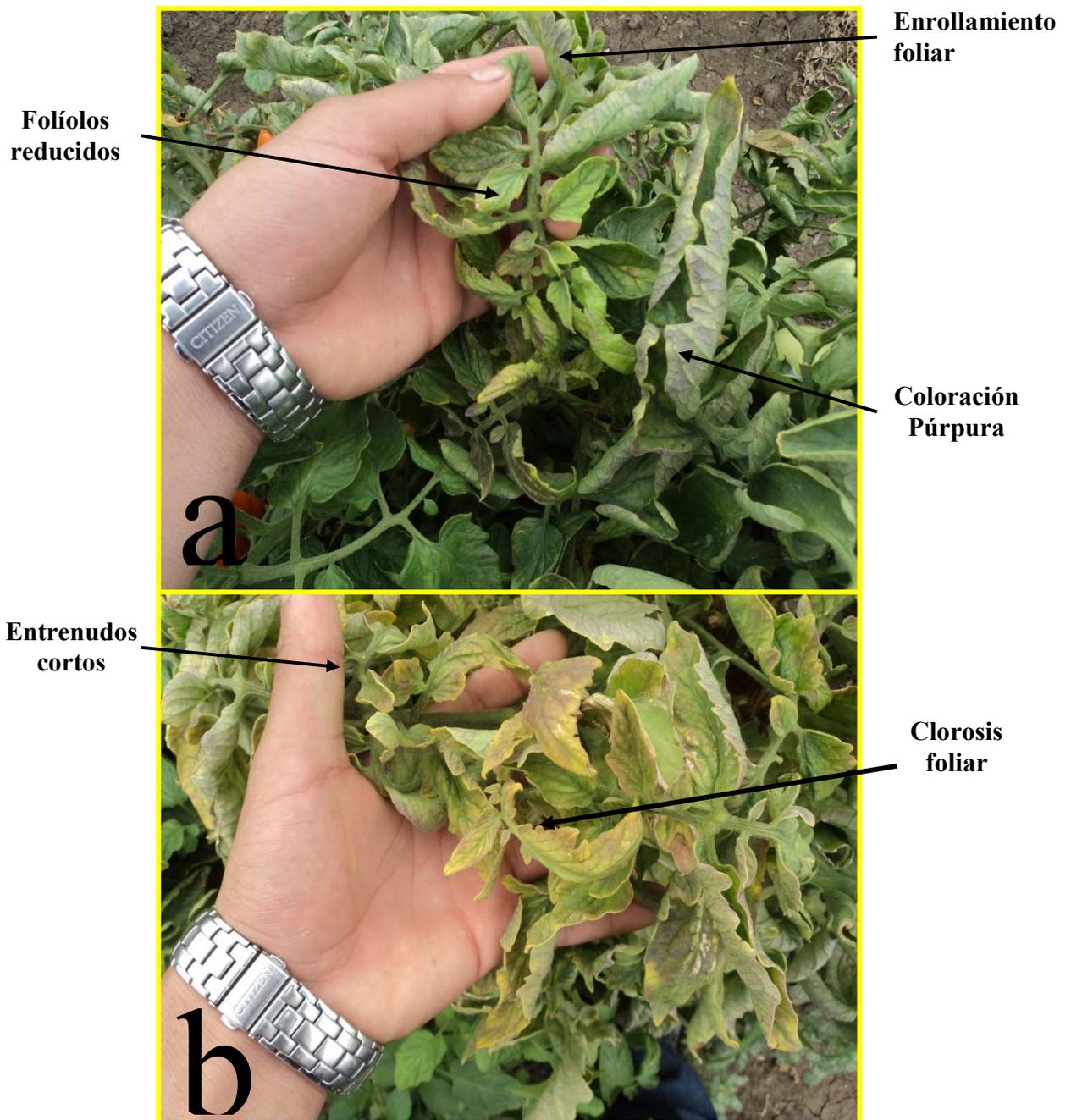


Figura 9. Plantas de tomate con presencia de 'Ca. L. solanacearum', en el estado de San Luis Potosí; a) Planta de tomate en Vanegas, S.L.P. en etapa de cosecha b) Planta de tomate en etapa vegetativa.

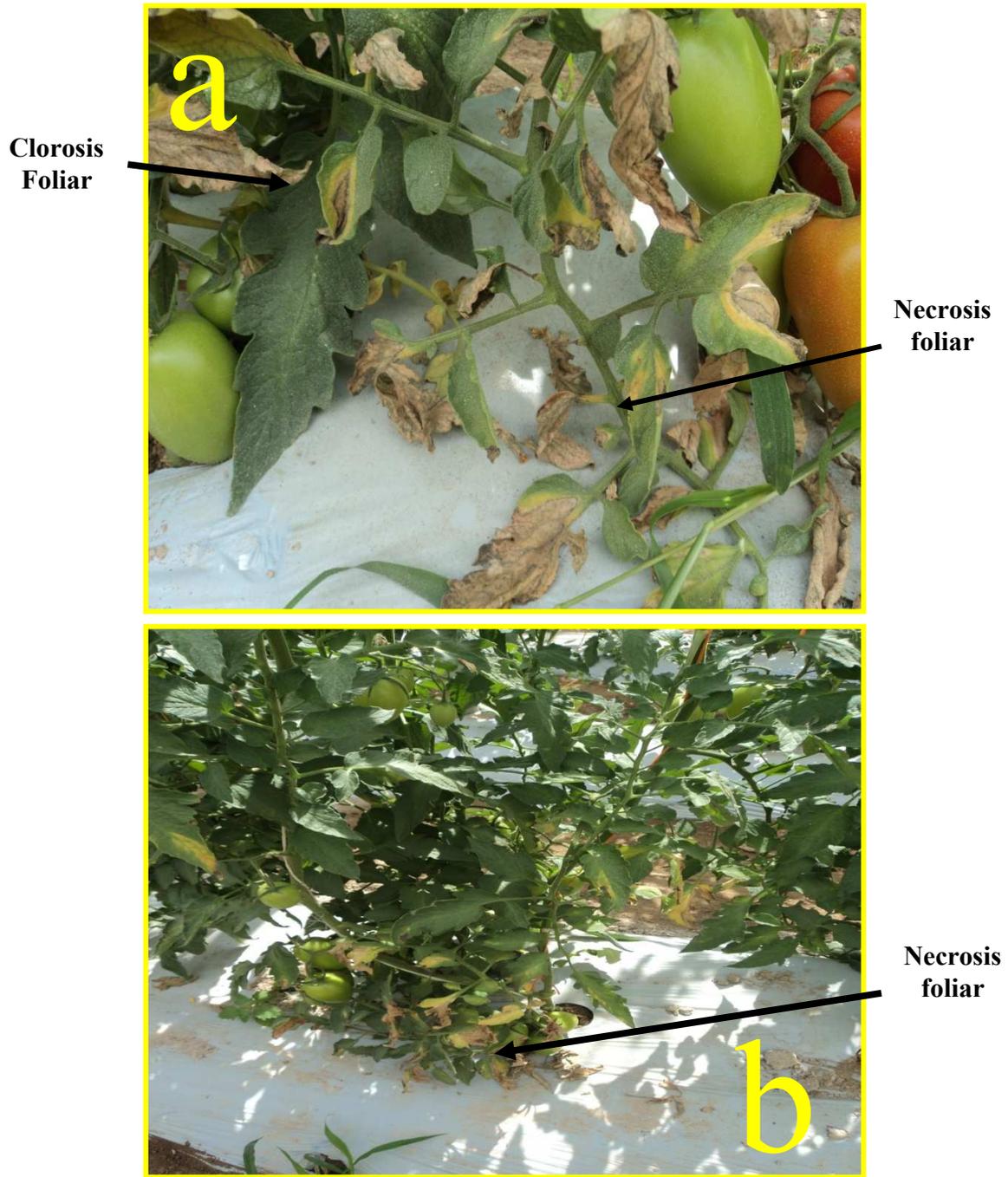


Figura 10. Plantas de tomate con presencia de '*Ca. L. solanacearum*', en la localidad el "Carril", Cedral, S.L.P. a) plantas de tomate indeterminadas con síntomas severos de la enfermedad, b) Plantas de tomate de hábito indeterminado cultivadas bajo malla sombra, con presencia de '*Ca. L. solanacearum*' en Cedral, S.L.P.

Las muestras de plantas de papa procedentes de las localidades de Nuevo León, mostraron síntomas de atizonamientos foliares, secamiento apical, así como el necrosamiento del tejido vegetal. De acuerdo con las pruebas realizadas de PCR, se obtuvieron como resultado, dos amplificaciones del ADN de la bacteria obtenido de las muestras de la parcela de “El Tokio”, Municipio de Galeana, Nuevo León (Figura 11).

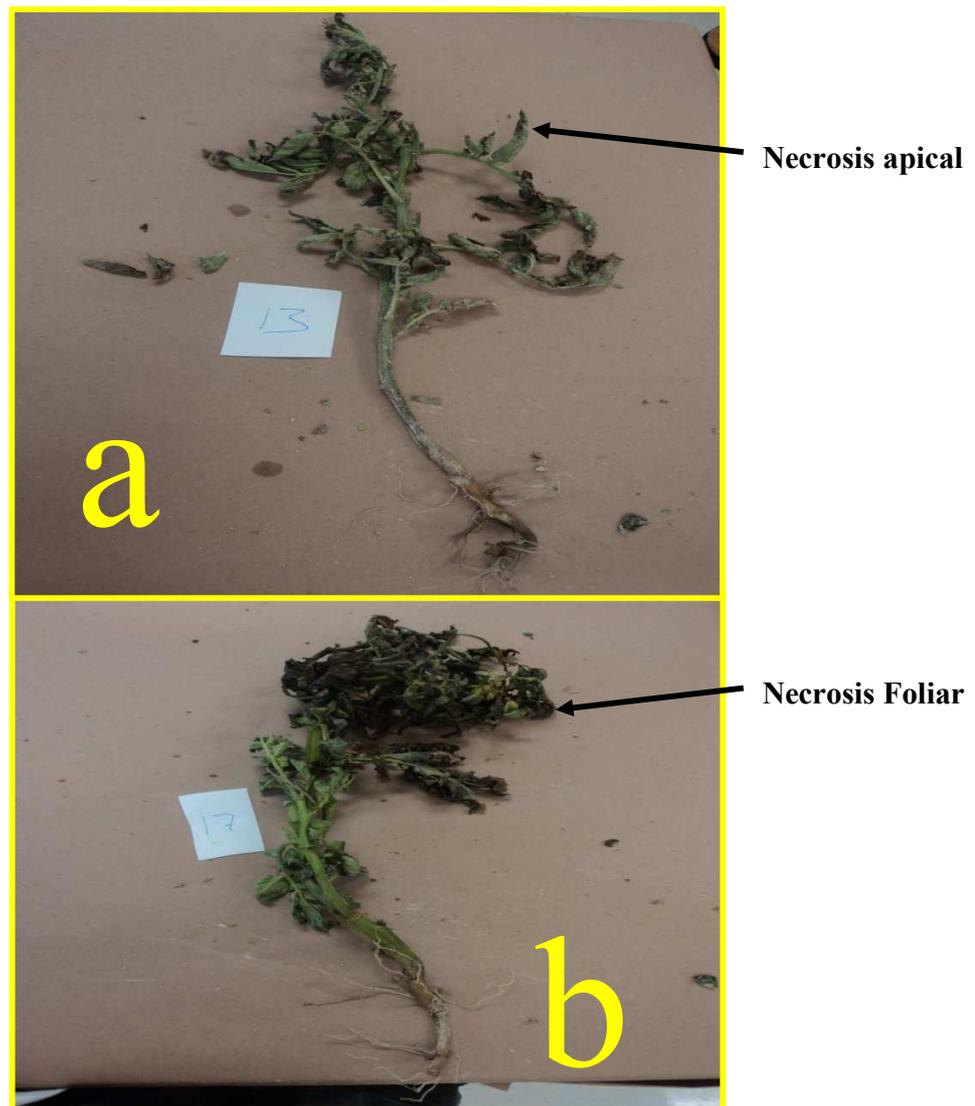


Figura 11. Plantas de papa con presencia de la bacteria '*Ca. L. solanacearum*' en muestras procedentes de la localidad de “El Tokio”, Galeana, Nuevo León. a) Planta de papa mostrando síntomas de entrenudos cortos además de atizonamiento foliar. b) Planta de papa con síntomas de amarillamiento foliar y quemaduras de ápices y bordes de folíolos.

En las Figuras 12 y 13, se observan los resultados obtenidos de las amplificaciones por PCR de los productos de las muestras vegetales pertenecientes al predio “El Carril”, Cedral, S.L.P. En ellas se observan seis fragmentos amplificados a 1,160 pb, en los carriles 5 y 7 de la Figura 12 y los carriles 5, 7, 9 y 10 de la Figura 13, de esta manera se demuestra la presencia de la bacteria en esta parcela hortícola. En la Figura 14 se observan los resultados de las amplificaciones de las muestras procedentes de la parcela de Vanegas, S.L.P. Solo se detectó la presencia de la bacteria *Ca. L. solanacearum* en tres muestras de tomate de crecimiento determinado como se observa en los carriles 4, 5 y 7 de la Figura 14. El resultado de este análisis, fue a través del empleo del par de oligonucleótidos OA2/Oi2c específicos al gen 16S rRNA, correspondientes a la bacteria ‘*Ca. L. solanacearum*’.

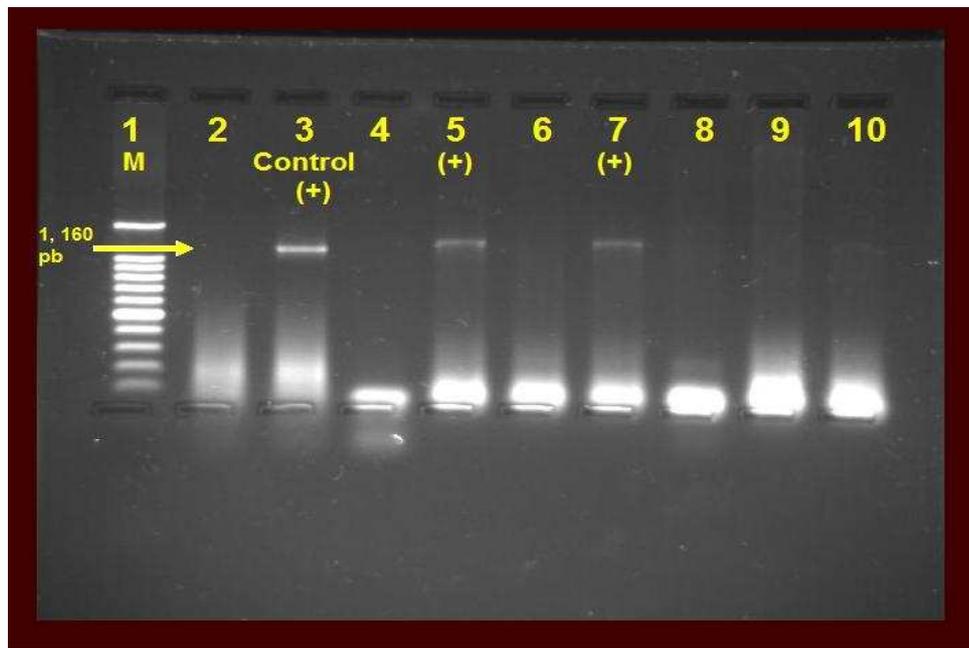


Figura 12. Gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos en muestras de tomate procedentes de la parcela denominada “El Carril” Municipio de Cedral, San Luis Potosí, utilizando los iniciadores OA2 y Oi2c. Carril 1, marcador molecular 100 bp (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 5, nervaduras de folíolos con clorosis intervenal; Carriles 7, pecíolos de folíolos expresando síntomas de amarillamiento; Carriles 4, 6, 8, 9 y 10, muestras negativas.

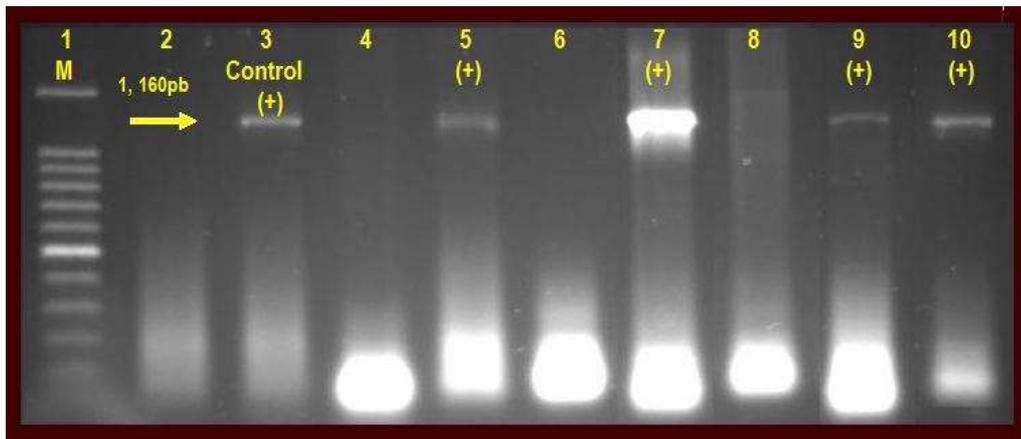


Figura 13. Gel de agarosa mostrando los resultados de las reacciones de PCR utilizando los iniciadores OA2 y Oi2c en muestras procedentes de la parcela denominada “El Carril” Municipio de Cedral S.L.P. Carril 1, marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 5, nervaduras central folíolo; Carril 7, pecíolos de folíolos con amarillamiento; Carril 9, pecíolos de hojas asintomáticas; Carril 10, nervadura central de folíolo asintomático; Carriles 4, 6 y 8 muestras negativas.

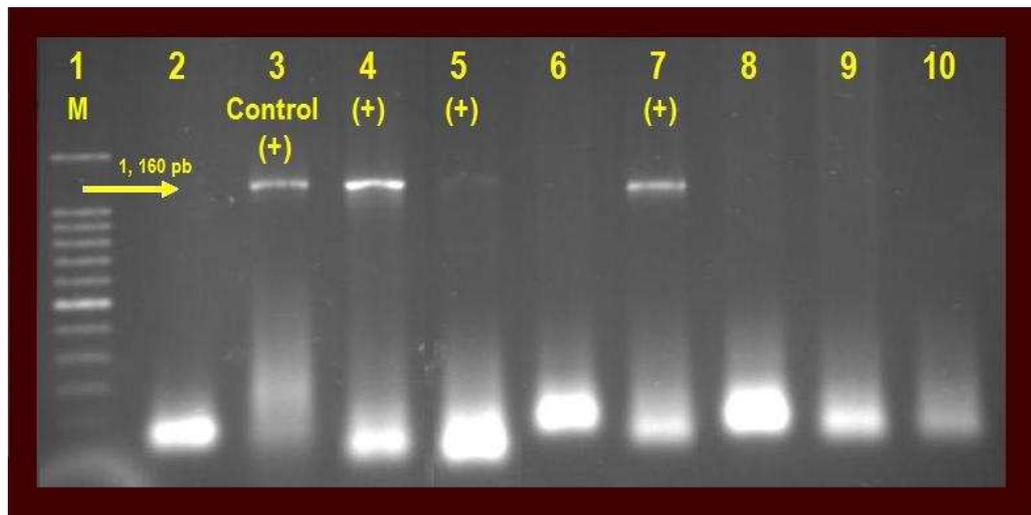


Figura 14. Gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos de las reacciones utilizando los iniciadores OA2 y Oi2c, en muestras de tomate, procedentes de la parcela ubicada en el Municipio de Cedral S.L.P. presentando diferentes síntomas. Carril 1, marcador molecular 100 bp (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 4, nervaduras central folíolo; Carril 5, pecíolos de folíolos con amarillamiento; Carril 7, pecíolos de hojas sintomáticas, muestras procedentes del Municipio de Vanegas S.L.P; Carriles 6, 8, 9 y 10 muestras negativas.

De acuerdo con las Figuras 15 y 16, se observan los fragmentos amplificados obtenidos en muestras de plantas de papa procedentes de la parcela ubicada en el ejido "El Tokio", Municipio de Galeana, Nuevo León. Obteniéndose dos amplificaciones del fragmento esperado a 1,070 pb, utilizando el par de iniciadores CLi.po/Oi2c específicos al gen 16S rRNA, correspondientes a la bacteria 'Ca. L. solanacearum'.

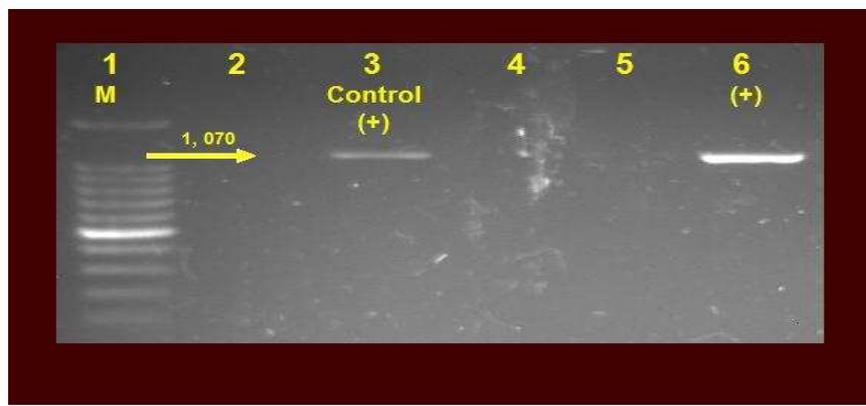


Figura 15. Gel de agarosa al 1.5% mostrando los resultados de las reacciones. Carril 1, Marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 2, blanco; Carril 3, control positivo; Carril 6; muestra positiva a 'Ca. L. solanacearum' extraída del floema; Carriles 4 y 5 muestras negativas.

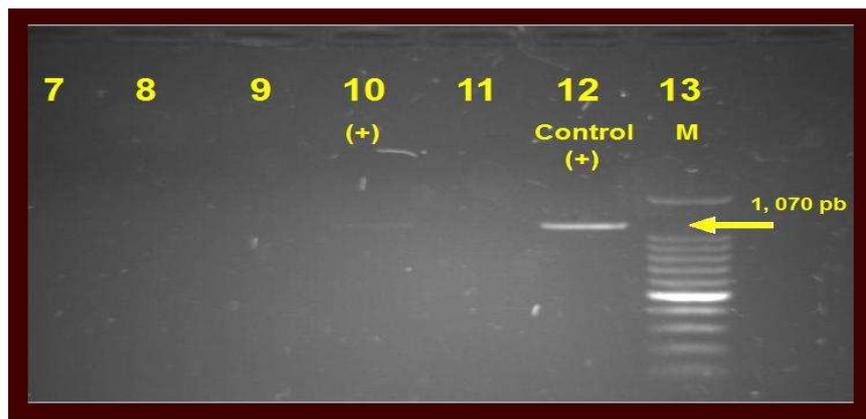


Figura 16. Gel de agarosa al 1.5% mostrando los resultados de las amplificaciones realizadas con los primers CLi.po/Oi2c Carril 13, Marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 12, control positivo; Carril 10, muestra positiva a la bacteria 'Ca. L. solanacearum', fragmento obteniendo a 1,070 pb; Carriles 7, 8, 9 y 11 muestras negativas.

En la Figura 17 se observa el gel de agarosa mostrando los resultados de los productos amplificados en muestras de tomate, obtenidas en parcelas de los Municipios de Cedral y Vanegas S.L.P. En este gel se observan cuatro productos obtenidos a la talla de 669 pb: Carril 1, marcador molecular 100 pb (Invitrogen®); Carril 2, Blanco; Carril 3, control positivo; Carril 4 y 6 muestras de tomate obtenidas en la parcela de Cedral; Carril 5, muestra de tomate obtenida en la localidad de Vanegas, S.L.P. Cabe considerar que en este análisis se utilizaron los primers CL514F/R, específicos a '*Ca. L. solanacearum*', que amplifican un segmento a 669 pb del gen 16S rRNA.

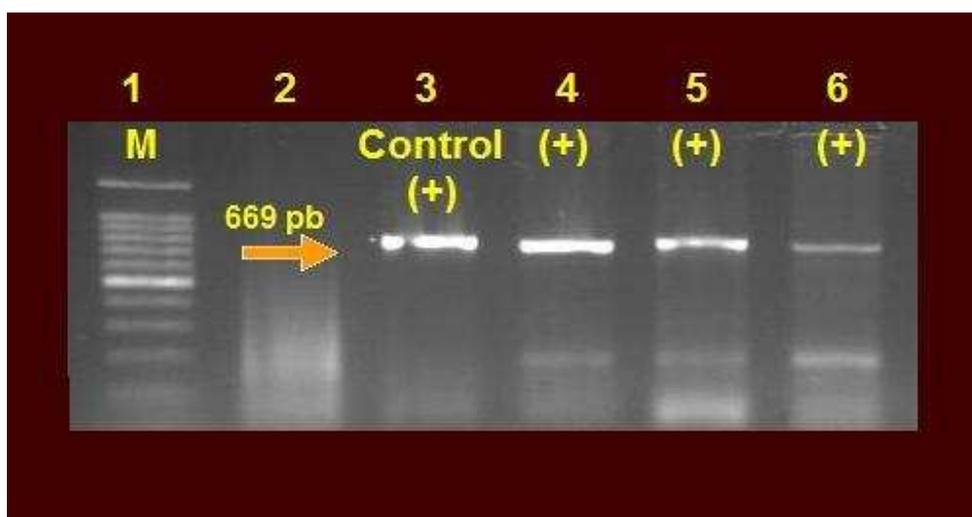


Figura 17. Gel de agarosa mostrando los resultados de las amplificaciones en muestras procedentes de las localidades de Cedral y Vanegas S.L.P. en plantas de tomate cultivadas en campo abierto y malla sombra.

En el Cuadro 7 se observan los resultados obtenidos a través de las amplificaciones en muestras procedentes de los estados de Nuevo León y San Luis Potosí, donde se obtuvieron muestras de tomate para el caso de San Luis Potosí; se muestrearon parcelas en los Municipios de Matehuala, Villa de Guadalupe, Vanegas y Cedral, mientras que en Nuevo León se realizaron recorridos de campo para obtener las

muestras de plantas de papa en los ejidos de “El Tokio”, “Pocitos”, “San Roberto” y “San Joaquín”, Municipios de Galeana, Nuevo León.

Cuadro 7. Resultados obtenidos a través de las amplificaciones realizadas con diferentes oligonucleótidos, en muestras de tomate y papa obtenidas en diferentes localidades, en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí.

Estado	Municipio	Tejido de la planta	Cultivo	Nº de Muestras	Muestra (+)
San Luis Potosí	Matehuala	Pecíolo, Nervaduras	Tomate	20	0
	Villa de Gpe	Pecíolo, Nervaduras	Tomate	20	0
	Cedral	Pecíolos	Tomate	20	6
Nuevo León	Vanegas	Pecíolos, Floema	Tomate	20	3
	Pocitos	Pecíolos,	Papa	20	0
	El Tokio	Tallo floema	Papa	20	2
	San Roberto	Pecíolos, Floema, Nervaduras,	Papa	10	0
	San Joaquín	Tubérculo Pecíolos, Nervadura	Papa	20	0

(+)= Pocitivos. S.L.P= San Luis Potosí; N.L.= Nuevo León. Gpe= Guadalupe. Loc= Localidad

4.2. Secuenciación y comparación de secuencias

Las secuencias de los fragmentos originales obtenidas con el iniciador delantero, fueron observadas en el programa, FinchTV, transfiriendo los datos al portal electrónico del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), obteniendo como primer resultado la comparación de la secuencias con las de mayor homología registradas en Banco de Genes (GenBank). De acuerdo con el Cuadro 8 se expresa el número de bases obtenidas de cada una de las muestras secuenciadas, así como la procedencia de donde se obtuvo la muestra.

Cuadro 8. Fragmentos moleculares obtenidos con los iniciadores CL514F y CLi.poF de cada una de las secuencias obtenidas.

Procedencia de la muestra	Iniciador	Tamaño del fragmento pb
Cedral (Tomate indeterminado)	CL514F	641
Vanegas Tomate (Tomate determinado)	CL514F	601
“El Tokio” (Papa)	CLi.poF.	921

De acuerdo con los fragmentos de las secuencias nucleotídicas de ‘*Ca. L. solanacearum*’, obtenidas de los productos amplificados de las muestras de Nuevo León y San Luis Potosí, se realizaron las comparaciones correspondientes para conocer la homología entre ellas; en el Cuadro 9, se expresa el alineamiento y la comparación de las dos secuencias obtenidas de los productos amplificados procedentes de las muestras de las localidades de Cedral y Vanegas del estado de San Luis Potosí. Para esto, se utilizó el iniciador CL514F y se obtuvo para las muestras de la localidad de Cedral, un fragmento de 630 pb correspondiente a ‘*Ca. L. solanacearum*’, mientras que en las muestras de la localidad de Vanegas, se obtuvo un fragmento de 627 pb; obteniéndose una similitud entre los dos fragmentos de 99% según el GenBank.

Los fragmentos obtenidos en muestras procedentes de la parcela de “El Tokio”, Municipio de Galeana, Nuevo León, se secuenciaron utilizando el iniciador CLipoF obteniéndose un fragmento de 921 pb (Cuadro 10); posteriormente, se realizó el alineamiento y la comparación con el (NCBI), mostrándose un 95% de similitud con la secuencia reportada en el Banco de Genes (GenBank), correspondiente al

fragmento de 'Ca. L. solanacearum' registrado en Washington, D.C. EE.UU. (JN848751.1).

Cuadro 9. Alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas a partir de plantas procedentes de Cedral y Vanegas, S.L.P.

Cedral 51	TTACCCAAGATTCAATCCAGACAATTGCTTCCTTGCCAAATATTGAGGAAATTCGCTCTG	110
Vanegas 49	TTACCC-AGATTCAATCAAGACAATTGCTTCCTTGCAAAAATTGAGGAAATTCGCTCTG	107
Cedral 111	GTATTTTAAGTGCTATTCAGTCAACTGCAACTAGATTGGTTATGCTTCTTGAAACACCTC	170
Vanegas108	GTATTTTAAGTGCTATTCAGTCCACTGCAACTAGATTGGTTATGCTTCTTGAAACACCTC	167
Cedral 171	AGAATCATATTGTTTCGTGTTCTTTCTGCTTTTGAGGAGAAGAATCGGCAAGATTAGTTCT	230
Vanegas168	AGAATCATATTGTTTCGTGTTCTTTCTGCTTTTGAGGAGAAGAATCGGCAAGATTAGTTCT	227
Cedral 231	GTTAATTGTAAAAAACTAAAAATAAAAAAGGAAATGTGTAATATGTCCAATATTGAATC	290
Vanegas228	GTTAATTGTAAAAAACTAAAAATAAAAAAGGAAATGTGTAATATGTCCAATATTGAATC	287
Cedral 291	AATTGTTGAACAATTGTCGTCTCTTACTCTTATTCAAGCTGCAGAGCTTTCGAAGAAATT	350
Vanegas288	AATTGTTGAACAATTGTCGTCTCTTACTCTTATTCAAGCTGCAGAGCTTTCGAAGAAATT	347
Cedral 351	AGAAGAAAAATGGGGTGTTCCTGCCTCTGCTCCTGCTGCTGTATCGGCTTCCGCAGCAAC	410
Vanegas348	AGAAGAAAAATGGGGTGTTCCTGCCTCTGCTCCTGCTGCTGTATCGGCTTCCGCAGCAAC	407
Cedral 411	AGAAAGTGTGCTGTTGCTGAAAAGACTGAATTTGATGTTGTGTTAACAGGTTTTAATGC	470
Vanegas408	AGAAAGTGTGCTGTTGCTGAAAAGACTGAATTTGATGTTGTGTTAACAGGTTTTAATGC	467
Cedral 471	TACGAGCAAAATCAATGTTATTAAGGAAGTACGTGCAATCACTAGTTTAGGTCTCAAAGA	530
Vanegas468	TACGAGCAAAATCAATGTTATTAAGGAAGTACGTGCAATCACTAGTTTAGGTCTCAAAGA	527
Cedral 531	AGCCAAAGAGCTTGTGAAAAGTTCTCCAAAGAGCTTAAAAGGAGGCGTTTCTAAGGGAGA	590
Vanegas528	AGCCAAAGAGCTTGTGAAAAGTTCTCCAAAGAGCTTAAAAGGAGGCGTTTCTAAGGGAGA	587
Cedral 591	TGCTGAAGAAATAAAGAAAAAGCTTGAAGCTGCTGGTGCN	630
Vanegas588	TGCTGAAGAAATAAAGAAAAAGCTTGAAGCTGCTGGTGCN	627

V. DISCUSIÓN

El uso de las técnicas moleculares para el diagnóstico de patógenos en la agricultura ha adquirido un gran impulso por la efectividad que éstas representan. En esta investigación se utilizó la técnica de PCR punto final, ya que permitió detectar a la bacteria 'Ca. L. solanacearum', en muestras de tomate procedentes de parcelas de los Municipios de Cedral y Vanegas S.L.P. siendo el primer reporte de la bacteria en esta zona agrícola, la cual está adquiriendo una gran importancia en la agricultura bajo ambiente controlado, de igual forma, se detectó la presencia de este patógeno en la parcela ubicada en el ejido "El Tokio", Municipio de Galeana, Nuevo León, en el cultivo de papa.

Los síntomas expresados por 'Ca. L. solanacearum' en el cultivo de tomate en Cedral y Vanegas, San Luis Potosí, son diferentes de aquellos reportados por Liefting *et al.* (2008) en Nueva Zelanda, en la misma hortaliza, esto posiblemente se deba a que se trata de diferentes genotipos, ya que la sintomatología puede variar dependiendo del hospedante. Sin embargo, los síntomas observados en plantas de tomate procedentes de Vanegas S.L.P. fueron similares a los reportados por French *et al.* (2010) en tomate en Lubbock, Texas, expresando los siguientes síntomas entrenudos cortos, clorosis intervenal de folíolos, deformaciones de hojas, atizonamiento de ápices y bordes. Mientras que los síntomas expresados en plantas indeterminadas de tomate cultivado bajo malla sombra, fueron similares a los reportados en Sinaloa, por Munyaneza *et al.* (2009) en plantas de hábito determinado, descartando los brotes axilares. De acuerdo con los análisis por PCR

utilizando los iniciadores OA2/Oi2c y CL514F/CL514R, los cuales están dirigidos al gen 16S rADN, demuestran la presencia del patógeno 'Ca. L. solanacearum', en plantas de tomate. Estos iniciadores utilizados en las muestras procedentes de las localidades de San Luis Potosí, se utilizaron por Munyaneza *et al.* (2009), obteniendo amplificaciones de ADN proveniente de muestras de plantas sintomáticas; de esta manera se demuestra que la bacteria puede estar presente en las plantas, sin expresar síntomas. De acuerdo con lo reportado por Levy *et al.* (2010), los síntomas causados por el patógeno 'Ca. L. solanacearum', en plantas de tomate, se expresan a partir de la séptima semana en brotes nuevos, sin embargo la bacteria se detectó a partir de la quinta semana después de la infestación por *B. cockerelli* [Sulc].

Con relación a los síntomas expresados en plantas de papa en la región productora de Galeana, Nuevo León, los más comunes fueron: enrollamiento foliar, entrenudos cortos, tonalidades púrpura, folíolos pequeños, elongación de yemas axilares, así como también se observó precocidad en la floración. Algunos de estos síntomas se reportaron por Crosslin y Hamm (2012), en la región productora de tubérculo en Washington, EE.UU. Donde además se reportó la detección de 'Ca. L. solanacearum', expresando síntomas con tonalidades púrpura, enrollamiento de folíolos, clorosis foliar, quemaduras foliares, así como flacidez del tejido foliar.

De acuerdo con los análisis de PCR en ambas localidades, se utilizó el mismo par de iniciadores CLi.poF/OI2cR, obteniendo fragmentos amplificados a 1,071 pb; de acuerdo con estos resultados, los síntomas ocasionados por la bacteria pueden variar según los genotipos, esto es determinante en la expresión de los síntomas de

la enfermedad de acuerdo con lo reportado por López (2009). Los síntomas en plantas de papa inoculadas artificialmente con adultos del insecto *B. cockerelli* (Sulc), se expresaron a los 21 días después de ser inoculadas; mientras que en el caso de ninfas, los síntomas se expresaron después transcurrir los 30 días; estos resultados difieren con los reportados por Levy (2011) quien reporta que la planta expresa los síntomas trascurridas las 14 semanas de ser infestadas por *B. cockerelli* (Sulc). Estos hallazgos sugieren que los niveles de movimiento del patógeno son similares en el tomate y en la papa, el patrón de movimiento se puede definir por la etapa de desarrollo de la planta. Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se sugiere que el muestreo se realice en plantas sintomáticas obteniendo tejido vegetal de los brotes tiernos.

Una vez realizada la secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó una comparación y alineamiento utilizando el portal electrónico del (NCBI), obteniendo como primer resultado la comparación de las secuencias con las de mayor homología registradas en el GenBank. La secuencia obtenida a partir de muestras sintomáticas en plantas de tomate procedentes de Cedral S.L.P. obtuvo un 99 % de similitud con la secuencia de 'Ca. L. solanacearum', GenBank FJ914618.1 reportada por Secor *et al.* (2009), quien reporta a la bacteria en plantas de papa. Por lo tanto las secuencias obtenidas a partir de plantas de tomate sintomáticas pertenecientes a la localidad de Vanegas, S.L.P. mostraron un 99% de homología con la secuencia con clave del GenBank CP002371.1 reportada por Lie *et al.* (2009). Con esto se confirma la presencia de éste patógeno en esta zona agrícola.

Los fragmentos amplificados de las muestras de plantas procedentes de la localidad de "El Tokio", fueron secuenciados, con el iniciador CLi.poF obteniendo una similitud del 95% con la secuencia (JN848751.1), fragmento reportado en el Banco de Genes (GenBank), Washington, D. C. EE.UU. en muestras de tubérculo. De esta manera se confirma la presencia de '*Ca. L. solanacearum*' en el cultivo de papa en esta parcela hortícola.

VI. CONCLUSIONES

En la región productora de tomate del altiplano potosino, los resultados demostraron la presencia de la bacteria '*Ca. L. solanacearum*' en nueve muestras de tomate determinado e indeterminado en dos localidades.

La secuencia nucleotídica de '*Ca. L. solanacearum*', detectada en muestras de Cedral, es diferente a la detectada en Vanegas S.L.P. sin embargo las secuencias presentaron un 99% de homología entre ambos fragmentos.

Se demostró la presencia de la bacteria '*Ca. L. solanacearum*' en la localidad de "El Tokio", Municipio de Galeana, Nuevo León, en el cultivo de papa.

Es posible detectar la presencia de la bacteria '*Ca. L. solanacearum*', tanto en plantas de tomate sintomáticas como en las asintomáticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, N. M. M. 2008. Life history of the potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in controlled environment agriculture in Arizona. *African Journal of Agricultural Research* 3: 60-67.
- Alfaro, F. M. A., Cebrián, M. C., Villaescusa, J. F., Hermoso, M. A., San, J. M. S., Font, M. I. 2012. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrot in Mainland Spain. *Plant Disease* 11: 11-0918.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- Brown, J. K., Rehman, M., Rogan, D., Martin, R. R., Corvallis, O.R., Idris, A. M., 2010. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" (synonym "*Ca. L. solanacearum*") associated with 'tomato vein-greening' and 'tomato psyllid yellows' diseases in commercial greenhouses in Arizona. *Plant Disease* 94: 376.
- Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu.Rev.Phytopathol* 28:201-19.
- Cox, C. 1991. Chromated copper arsenate. *Journal Pesticide Reform* 11: 2-6.
- Crosslin, J. M. and Bester, G. 2009. First report of *Candidatus Liberibacter psyllauros* in zebra chip symptomatic potatoes from California. *Plant Disease* 93: 5-551.
- Crosslin, J. M., Munyaneza, J. E. 2009. Evidence that the zebra chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and in vitro. *American Journal Potato of Research*.
- Crosslin, J. M., Hamm, P. B., Eggers, J. E., Rondon, S. I., Sengoda V. G., Munyaneza, J. E. 2012. First report of zebra chip disease and "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" on potatoes in Oregon and Washington State. *Plant Disease* 96: 3-452.
- Crosslin, J. M., Munyaneza, J. E., 2009. Evidence that the zebra chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and in vitro. *American Journal Potato Research* 86: 183-187.
- Da Costa, M. F., Junior, R. S., de Almeida A.F., and Lopez V.M. 2006. Eficiencia de kasugamicina e hidróxido de cobre no control de la bacteria *Acidovorax avenae subs. citrulli* agente causal da mancha acuosa no meloeiro. *Rev, Biol. Ciencias da Terra* 6: 132-138.
- Douglas, B. C. 2011. Management strategies for the potato psyllid in California. Tesis Ph.D. Dissertation. University of California Riverside. 184p.
- Epa, (United states Environmental Protection Agency) Disponible en línea <http://www.epa.gov/> Consultada 02 mayo 2011.
- Eyer, J. 1937. Observation on the feeding habits of the potato "psyllid yellows" wich it produces. *Journal of Economic Entomology* 26: 846-850.
- FAOSTAT, (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2008. Disponible en línea <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefaul.aspx?PageID=567#anchor> Consultada 03 Diciembre 2011.

- Fletcher, J. and A. Wayadande. 2002. Bacterias fastidiosas colonizadoras vasculares. Trans. José Carlos Ureta R. 2009. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0323-01.
- French, M. R. D., Patton, III. A. F., Douglas, J. M., Abad, J. A., Schuster, G., Wallace, R. W., Wheeler, T. A. (2010). First Report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on field tomatoes in the United States. *The American Phytopathological Society* 94: 4 481.1 - 481.1.
- Galaviz, R., Hernandez, V., Barrera, M., Sanchez, A., Frías, G., Durazo, F., 2010 Highlights on zc mexican experiences. PepsiCo Americas Foods & Narro University. 16p.
- Gao, L. F., Yang, X.B., Jifon, J. 2009. Potato psyllid-zc Research 2008 and 2009. Vegetable Laboratory, Texas AgriLIFE Research. 58p.
- Gharalari, A. H., Nansen, C., Lawson, D. S., Gilley, J., Munyaneza, J. E., Vaughn, K. 2009. Knockdown mortality, repellency, and residual effects of insecticides for control of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal Economic Entomology* 102: 1032-1038.
- Goolsby, A. J., Anciso, J., Troxclair, N., Schuster, G. 2008. Potato psyllid monitoring and evaluation of IPM program to minimize zebra chip in potatoes. USDA-ARS, Texas Agrilife Extension. 29p.
- Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R., Paine, T. D. 2008. A new huanglongbing species, “*Candidatus Liberibacter psyllauros*”, found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied Environmental Microbiology* 74: 5862–5865.
- Henne, D. C., Workneh, F., Wen, A., Price, J. A., Pasche, J. S., Gudmestad, N. C., Rush, C. M. 2010. Characterization and epidemiological significance of potato plants grown from seed tubers affected by zebra chip disease. *Plant Disease* 94: 659-665.
- Hernández, D. M. G. 2009. Asociación de “*Candidatus Liberibacter* con el variegado del chile (*Capsicum annum* L.) en Yurecuaro, Michoacán. Tesis Licenciatura. Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 62p.
- INEGI, (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática) 2007. Disponible en línea <http://www.inegi.gob.mx> Consultada 02 Diciembre 2010.
- INEGI, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) Disponible en línea <http://www.inegi.org.mx/> Consultada 23 mayo 2011.
- Jagoueix, S., Bové, J.M., and Garnier, M. 1994. The phoeman-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. *Internacional Journal Systematic Bacteriology* 44: 379-386.
- Levy, J., Pierson, E., Aravind, R., Gross, D. C., Tamborindeguy, C. 2010. Translocation of *Candidatus Liberibacter solanacearum*, the zebra chip pathogen, in potato and tomato. Proceedings of the 10th annual 2010 zebra chip reporting session. Dallas, Texas, November 7-10. 213p.
- Li, W., Abad, J. A., French, M. R. D., Rascoe, J., Wen, A., Gudmestad, N. C., Secor, G. A., Lee, I. M., Duan, Y. P., and Levy, L. 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in potato plants with zebra chip. *Journal of Microbiological. Methods* 78: 59-65.

- Liefting, L. W., Perez, Z. C., Clover, G. R. G., Anderson, J. A. D. 2008. A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92: 1474.
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., and Clover, G. R. G., 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93: 3-0208.
- Lin, H., Lou, B., Glynn, J. M., Doddapaneni H., Civerolo, E. L., Chen, C., Duan, Y., Zhou, L., Vahling, C. M. 2011. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *PLoS ONE* 6: e19135.
- Ling, K. S., Lin, H., Lewis, I. M. L., Zhang, W., Miller, S. A. 2011. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' naturally infecting tomatoes in the state of Mexico, Mexico. *Plant Disease* 95: 8-1026.
- Liu, D., Trumble, J. T. 2006. Ovipositional preferences, damage thresholds, and detection of the tomato-potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) on selected tomato accessions. *Bull. Entomological Research* 96: 197-204.
- López, D. M. F. 2009. Efectividad biológica de insecticidas contra el psilido de la papa (*Bactericera cockerelli* Sulc.) en Mecatepec, Edo. De México y transmisión de bacterias no cultivadas asociadas a enfermedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis. Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos Edo. De México. 64p.
- MAFBNZ, (Biosecurity New Zealand) 2008. Disponible en línea <http://www.biosecurity.govt.nz/pests/survmgmt/resp/tom-cap-bacterium> Consultada 17- Octubre-2010.
- McKenzie, C. L., Shatters, Jr. R. G. 2009. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" associated with psyllid yellows of tomato in Colorado. *Plant Disease* 10: 1074A.
- McManus, P.S., Stockwell, O. V., Sundin, W.G. and Jones, L. A. 2002. Antibiotics use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol* (40): 443-465.
- Miles, G. P., Buchman, J. L., Munyaneza J. E. 2009. Impact of zebra chip disease on the mineral content of potato tubers. *American Journal Potato of Research* 86: 481-489.
- Miles, G. P., Samuel, M. A., Chen, J., Civerolo, E. L., Munyaneza, J. E. 2010. Evidence that cell death is associated with zebra chip disease in potato tubers. *American Journal Potato of Research* 87: 337-349.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Upton, J. E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip," a new potato disease in southwestern United States and México. *Journal of Economic Entomology* 100: 656-663.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Buchman, J.L. 2009a. Seasonal occurrence and abundance of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, in south central Washington. *American Journal Potato of Research* 86: 513-518.
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzón, T. J. A., Cardenas, V. O. G. 2009b. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in México. *Plant Disease* 93: 1076.
- Munyaneza J. E., Sengoda V. G, Crosslin J. M, Lozano, D. G, Sanchez. A, 2009c. First report of *Candidatus Liberibacter psyllauros* in potato tubers with zebra chip disease in México. *Plant Disease* 93: 552.

- Munyaneya, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzón, T. J. A., Cárdenas, V. O. G. 2009. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in pepper plants in México. *Plant Disease* 93: 1076.
- Munyaneya, E. J., Tonja, W.F., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., and Lemmetty, A. 2010. Association of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" with the psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal Economic Entomology* 103: 1060-1070.
- Munyaneya, J. E., Buchman, J. L., Sengoda, V. G., Fisher, T. W., Pearson, C. C. 2011. Susceptibility of selected potato varieties to zebra chip potato disease. *American Journal Potato of Research* 88: 435-440.
- Munyaneya, J. E., Sengoda, V. G., Sundheim, L., and Meadow, R. 2012. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" associated with psyllid-affected carrots in Norway. *Plant Disease* 96: 3-454.
- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., Tamborindeguy, C. 2011. Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Microbiology* 62: 1510-1520.
- Navarrete, D. A., Shakya, R., Holden, J., Crosslin, J. M. 2009. LC-MS analysis of phenolic compounds in tubers showing zebra chip symptoms. *American Journal Potato of Research* 86: 88-95.
- NCBI, (National Center Biotechnology Information) 2011. Disponible en línea <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> Consultada 02 Febrero 2011.
- Nielsen, M.C. 2008. Main characteristics to distinguish *Bactericera cockerelli* from other psyllids in New Zealand. *Plant & Food Research*.
- Ordax, M., Marco, N. E., López, M. M., Biosca, E. G. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol* 72: 3482-3488.
- Paulin, J.P. 1992. Chemical and biological control of bacterial diseases: a need?. in: plant pathogenic bacteria. Lemaitre, M., Freigoun, S., Rudolph, K., Swings, J. G. (Editors), Pag 853-866.
- Richards B. L. y Blold, H. L., 1933. Psylla yellows of the potato. *Journal of Agricultural Research* 46: 189-216.
- Rubio, C. O. A., Almeyda, I. H., Cadena, H. M. A., Lobato, S. R., 2011 Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaerosus* en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 17-18.
- Salas, M. M. A. 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de fitoplasma de la punta morada de la papa. Tesis de Maestría. UAAAN. Saltillo, Coahuila. México. 49p.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Tercera edición, editorial cold spring harbor laboratory. Press.
- Sánchez, R. S., López, D. H. A., Mora, H. M. E., Almeyda, L. H. I., Zavaleta, M. H. A. Espinosa, V. D. 2010. Salicylic acid protects potato plants from phytoplasma-associated stress and improves tuber photosynthate assimilation. *American Journal Potato of Research*. DOI 10.1007/s12230-010-9175-y

- Secor, G. A., Rivera, V.V., Abad, J. A., Lee, I.M., Clover, G. R. G., Liefiting, L. W., Li, X., and De Boer, S. H. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93: 574-583.
- Sengoda, V. G., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Buchman, J. L., Pappu, H. R. 2009. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip diseases of potato. *American Journal Potato of Research* 87: 41-49.
- Shteinberg, D., Zilberstaine, M. Oppenheim D., Herzog, Z., Manulis, S., Shwartz H. and Kritzman G. 2001. Efficacy of oxolinic acid and others bactericides in suppression of *Erwinia amylovora* in Pear orchards in Israel. *Phytoparasitica* 29: 143-154.
- SIAP, (Servicio de información agrícola y pesquera) 2010. Disponible en línea <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option> Consultada 03 Junio 2011.
- SIAP, (Servicio de información agrícola y pesquera) 2011. Disponible en línea <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option> Consultada 04 Mayo 2011.
- Venkatesan, G. S., Munyaneza, J.L., Crosslin J.M., Buchman, J.L., Pappu, H.R. 2009. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip diseases of potato. *Potato Association of America* 87: 41-49.
- Virgen, G. C. 2010. Control químico de bacterias fitopatógenas. III Simposio Nacional y II Internacional de Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara, Jalisco, México 28 y 29 de septiembre de 2010.
- Woodcock, J., Moazed, D., Cannon, M., Davies, J., and Noller, H.F. 1991. Interaction of antibiotics with A- and P- sites specific bases in 16S ribosomal RNA. *The EMBO Journal* 10: 3099-3103.
- Workneh, F., Charles, D. H., Casey, A. C., Li, M. P., Rush, C. M. 2012. Assessments of the edge effect in intensity of potato zebra chip disease. *Plant Disease* 6: 11-0480.

III. APENDICE

Cuadro 1A. Preparación de soluciones químicas

Bromuro de etidio

Solución stock 10 mg/ml

EDTA 0.5 M (500 ml)

93.06 g EDTA

10 g NaOH

Tris-Base 50 mM (1000 ml)

6.057 g Tris-base

TBE 5X 1000 ml (ácido bórico 445 mM, Tris-Base 445 mM. EDTA 10 mM)

54 g Tris HCL pH 7.4

27.5 g Ácido bórico

20 ml EDTA 0.5 M

TBE 0.5X

Se prepara a partir de la solución TBE 5X