

## ETIOLOGÍA Y EFECTO EN GENOTIPOS DEL PARDEAMIENTO Y LA BROTAÇÃO ANORMAL ASOCIADO CON FITOPLASMAS EN TUBÉRCULOS DE PAPA\*

### ETIOLOGY AND EFFECT IN GENOTYPES OF BROWNING AND ABNORMAL SPROUT ASSOCIATED TO PHYTOPLASMAS IN POTATO TUBERS

Margarita Díaz-Valasis<sup>1</sup>, Mateo Armando Cadena-Hinojosa<sup>1§</sup>, Reyna Isabel Rojas-Martínez<sup>2</sup>, Emma Zavaleta-Mejía<sup>2</sup>, Daniel Ochoa-Martínez<sup>2</sup> y Rafael Bujanos-Muñiz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Valle de México. CIRCE-INIFAP. Carretera Los Reyes-Lechería, km 18.5. Texcoco, Estado de México. A. P. 307. C. P. 56230. Tel. 01 595 9212738. Ext. 130. (maggy-diaz@yahoo.com). <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 35.5. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 595 9520200. Ext. 1625. (rojas@colpos.mx), (zavaleta@colpos.mx), (ldaniel@colpos.mx). <sup>3</sup>Campo Experimental Bajío. CIRCE-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5. Celaya, Guanajuato, México. A. P. 112. C. P. 38000. Tel. 461 6115323. (bujanos@att.net.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: machgg2@yahoo.com.mx.

#### RESUMEN

La punta morada de la papa afecta el rendimiento y la calidad de los tubérculos por el pardeamiento y la brotación anormal asociados con ésta. Esta enfermedad es considerada de origen fitoplásmico, aunque los postulados de Koch no han sido debidamente probados. Esta investigación intenta determinar la etiología del pardeamiento y la brotación anormal en papa; para ello, se transmitieron mediante injerto, aislamientos procedentes de 19 genotipos de papa de campo con cuatro variedades: Sangema que tuvo 52.63% de transmisión, Michoacán que tuvo 42.1%, Norteña con 31.57% y NAU-6 que alcanzó 65.2%. Los esquejes de papas de invernadero con síntomas de punta morada transmitidos por semilla-tubérculo, indujeron síntomas de “popotillo” en jitomate; sin embargo, al volver a injertar en papa no se observaron síntomas en el follaje, tampoco pardeamiento en los tubérculos y no se detectó fitoplasma mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El porcentaje de transmisión para la punta morada de la papa en invernadero fue de 37%. El pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos fueron inducidos por un patógeno infeccioso, transmitido hasta por seis injertos sucesivos en invernadero. El porcentaje de detección de fitoplasma con polimerasa en follaje y tubérculo

#### ABSTRACT

Potato purple top affects yield and tubers quality by browning and the abnormal sprout associated with it. This disease is considered of phytoplasmic origin, although Koch postulates have not been properly proven. This investigation tries to determine etiology for browning and abnormal sprouting in potato; taking this into account isolations coming from 19 genotypes of field potato with four varieties were transmitted by means of graft: Sangema that had 52.63% transmission, Michoacán that had 42.1%, Norteña with 31.57% and NAU-6 that reached 65.2%. The greenhouse potatoes cuttings with symptoms of purple tip transmitted by seed-tuber, induced symptoms of “popotillo” in red tomato; however, when grafting again in potato symptoms were not observed in the foliage, neither browning in the tubers and phytoplasma was not detected by means of reaction technique in polymerase chain. The transmission percentage for potato purple tip in greenhouse was of 37%. The browning and the abnormal sprouting in tubers were induced by an infectious pathogen, transmitted until for six successive grafts in greenhouse. The percentage of phytoplasma detection with polymerase in foliage and tuber of used varieties NAU-6, Norteña, Michoacán and

\* Recibido: julio de 2010  
Aceptado: diciembre de 2010

de las variedades utilizadas NAU-6, Norteña, Michoacán y Alpha fue de 37.5, 10, 35.7 y 28.6 respectivamente. En Chile manzano y mixquic, éste fue de 70.83% y 66.6%, en tomate no se registraron fitoplasmas. Las plantas de Chile, puede actuar como hospedante intermediario en la transmisión del patógeno involucrado con esta enfermedad.

**Palabras clave:** enrollamiento apical, fitoplasmas, punta morada de la papa.

## INTRODUCCIÓN

La papa es afectada por una enfermedad, que induce pardeamiento y brotación anormal en el tubérculo; existen evidencias que un miembro del género fitoplasma está asociado con la punta morada de la papa (PMP) (Lee *et al.*, 2006). Los principales síntomas en el follaje son la disminución del crecimiento, crecimiento erecto de brotes terminales, enrollamiento de las hojas, clorosis, coloración roja o púrpura de nuevas hojas, proliferación de brotes axilares con hinchamientos en la base y formación de tubérculos aéreos.

Esta enfermedad induce un pardeamiento en los haces vasculares de los tubérculos, deteriorando su calidad industrial y los tubérculos afectados presentan brotación anormal. Cuando estos se siembran producen plantas débiles o no brotan (Cadena-Hinojosa, 1974; 1993), por lo tanto, la PMP es considerada un problema fitopatológico de importancia internacional (Maramorosch, 1998b; Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003). En los EE.UU., se tiene reporte de la presencia de PMP desde 1939 (Leach, 1939); recientemente se ha reportado la PMP como una enfermedad devastadora que se presenta en varias regiones de Estados Unidos de América y México.

En 2002 y 2003 se presentó una epidemia de PMP en papa (*Solanum tuberosum*), en la región de la cuenca de Columbia en Washington y Oregon, causando pérdidas económicas fuertes en la industria papera (Lee *et al.*, 2004). En México se presenta en las principales zonas productoras de papa, se ha reportado en los valles y sierras del eje neovolcánico en donde, en algunos lugares de ésta zona, se presentan altas incidencias y es una amenaza seria a la producción nacional de este cultivo (Cadena-Hinojosa, 1974, 1987, 1993, 1996, 1999; Zavala y Cadena, 1998).

Alpha were of 37.5, 10, 35.7 and 28.6 respectively. In Chile manzano and mixquic, this was of 70.83% and 66.6%, in tomato there were not recorded phytoplasmas. In Chile plants, it can act as intermediary host in transmission of pathogen involved with this disease.

**Key words:** apical roll, phytoplasmas, potato purple tip.

## INTRODUCTION

Potato is affected by a disease that induces browning and abnormal sprouting in the tuber; there are evidences that a member of phytoplasma genus is associated with potato purple tip (PMP) (Lee *et al.*, 2006). The main symptoms in the foliage are the decrease of the growth, erect growth of sprouts terminals, leafroll, chlorosis, red or purple coloration of new leaves, proliferation of axillary sweetening sprouts in the base and formation of air tubers.

This disease induces a browning in vascular sheaves of tubers, deteriorating its industrial quality and the affected tubers present abnormal sprouting. When these are sown produce weak plants or they don't sprout (Cadena-Hinojosa, 1974; 1993), therefore, PMP is considered a phytopathological problem of international importance (Maramorosch, 1998b; Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003). In the USA, there is a report of presence of PMP since 1939 (Leach, 1939); recently it has been reported the PMP as a devastating disease that is presented in several regions of United States of America and Mexico.

In 2002 and 2003 an epidemic of PMP was presented in potato (*Solanum tuberosum*), in the region of the basin of Columbia in Washington and Oregon, causing strong economic losses in the potato industry (Lee *et al.*, 2004). In Mexico it is presented in the main potato producing areas, it has been reported in the valleys and mountains of trans-mexican volcanic belt where, in some places of this area, high incidences are presented and it is a serious threat to the national production of this crop (Cadena-Hinojosa, 1974, 1987, 1993, 1996, 1999; Zavala and Cadena, 1998).

In the Experimental Station Valle de Mexico (CEVAMEX), every year high incidences of the PMP are presented, situation that has been used to set in this locality studies

En el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX), se presentan todos los años incidencias altas de la PMP, situación que se ha utilizado para establecer en esta localidad, estudios enfocados a su control (Cadena-Hinojosa, 1999). Inicialmente, varios investigadores consideraron que el agente causal de la PMP en los EE.UU., era el mismo que causaba los amarillamientos en plantas de áster (Kunkel, 1926; Leach y Bishop, 1944; Self y Darling, 1953), el cual es transmitido por la chicharrita *Macrosteles quadrilineatus* Forbes (Hirumi y Maramorosh, 1968; Maramorosh *et al.*, 1968).

En un estudio conjunto entre el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de México y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (Cadena-Hinojosa, 1974; Maramorosh, 1998a), se observaron fitoplasmas al microscopio electrónico en ultra cortes de tejido enfermo de plantas con síntomas de punta morada, procedentes de transmisión seriada por injerto, por lo cual se propuso que este patógeno pudiera ser el agente causal de esta enfermedad. Posteriormente se presentó evidencia adicional de la asociación de fitoplasmas con la PMP (Cárdenas *et al.*, 1992; Almeyda *et al.*, 1999).

Almeyda *et al.* (1999) encontraron que es posible la detección de fitoplasmas asociados con la PMP, en etapas tempranas de la enfermedad, aún en plantas asintomáticas. En investigaciones subsecuentes, se han determinado por lo menos dos grupos de fitoplasmas asociados con la PMP (Almeyda *et al.*, 1999; Leyva López, 2002). A la fecha, esta enfermedad es considerada de origen fitoplásmico, a pesar que los postulados de Koch no han sido debidamente probados. No obstante, los esfuerzos que se han realizado para tratar de esclarecer al agente causal de la PMP, aún quedan muchas interrogantes sobre la etiología de esta enfermedad, por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la etiología del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa en la región central de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el año 2004 a 2006 se colectaron en el campo muestras de papa con síntomas de PMP, las cuales se mantuvieron en invernadero mediante el injerto de tejido enfermo en chile manzano. Para estudiar la transmisión de PMP bajo condiciones de invernadero, se colectó material de tres localidades del Estado de México: faldas del Nevado de

focused to their control (Cadena-Hinojosa, 1999). Initially, several researchers considered that the causal agent of the PMP in the USA was the same one that caused to turn yellowish in aster plants (Kunkel, 1926; Leach and Bishop, 1944; Self and Darling, 1953), which is transmitted by cicada *Macrosteles quadrilineatus* Forbes (Hirumi and Maramorosh, 1968; Maramorosh *et al.*, 1968).

In a combined study between National Research Forestry, Agriculture and Livestock Institute (INIFAP) of Mexico and the Department of Agriculture of United States of America (Cadena-Hinojosa, 1974; Maramorosh, 1998a), phytoplasmas was observed to electronic microscope in ultra cuts of sick tissue of plants with symptoms of purple tip, coming from series transmission per grafting, reason why it is intended that this pathogen could be causal agent of this disease. Later additional evidence of phytoplasmas association was showed with the PMP (Cárdenas *et al.*, 1992; Almeyda *et al.*, 1999).

Almeyda *et al.* (1999) found that it is possible that phytoplasmas detection associated with PMP, in early stages of the disease, still in asymptomatic plants. In subsequent investigations, it has been determined at least two phytoplasmas groups associated with PMP (Almeyda *et al.*, 1999; Leyva López, 2002). To the date, this disease is considered of phytoplasmic origin; despite that Koch postulates have not been properly proven. Nevertheless, the efforts that have been carried out to try to clarify the causal agent of PMP, are still many queries on etiology of this disease, therefore, the aim of this investigation was to determine etiology of browning and the abnormal sprouting in potato's tubers in the central region of Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

In year 2004 to 2006 potato samples with symptoms of PMP were collected in the field, which stayed in greenhouse by means of graft of sick tissue in chili manzano. To study the transmission of PMP under greenhouse conditions, material of three localities of State of Mexico was collected: from base of Nevado de Toluca, Calimaya and Chapingo. Three plants of 19 potato genotypes were marked with symptoms of PMP in the CEVAMEX. Three cuttings of each genotype were

Toluca, Calimaya y Chapingo. Se marcaron tres plantas de 19 genotipos de papa con síntomas de PMP en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX). Se tomaron tres esquejes de cada genotipo y se injertaron en papa de invernadero de un mes de edad, libre de los principales virus (PLRV, PVX, PVY, PVS y PVA). Los genotipos injertados fueron: Michoacán, Norteña, NAU-6 y Sangema.

Se realizaron pruebas de PCR en follaje de los genotipos muestreados en campo e injertados en invernadero, para corroborar que se trataba de un agente patogénico infeccioso después que se observaron síntomas en el follaje; se hicieron injertos sucesivos (desde dos hasta seis), transfiriendo el patógeno de una planta a otra. Para esto, se injertaron 83, 72, 9 y 6 plantas de las variedades Norteña, Michoacán, Zafiro y Lupita susceptibles al pardeamiento y en la cuales se inducen síntomas evidentes tanto en el follaje como en tubérculo; también se consideraron 34 y 10 plantas de los genotipos tolerantes NAU-6 y Lady Rosetta que expresan síntomas de pardeamiento leves o nulos en campo.

Otros genotipos que se injertaron serialmente fueron: Alpha (72 plantas), Bintje (4), Gigant (6), Granola (8), Marciana (2), Mondial (3), Montserrat (9), Mosca B (12), Sancal (9), Sangema (45), San José (4), clon 4-11(5) y 676008 Roja (5). Cada planta proveniente de campo con síntomas de PMP injertada en invernadero con material de ambos ciclos, representó inicialmente un aislamiento y algunas fueron analizadas en laboratorio con la técnica de PCR, para determinar la presencia o ausencia del fitoplasma.

Cuando los síntomas eran evidentes en el follaje o en los tubérculos, se procedió a realizar PCR utilizando iniciadores específicos para fitoplasmas. En el primer ciclo de amplificaciones se usó el par de iniciadores P1/Tint y en el segundo los pares de iniciadores universales R16mF2/R16mR1 y R16F2/R16R2 (Gundersen and Lee, 1996).

El número de muestras procesadas varió de 1 a 16 en los genotipos : Alpha (7), Gigant (4), Lady Rosetta (10), Michoacán (14), Mondial (1), NAU-6 (8), Norteña (10), Sangema (3) y Zafiro (16); sin embargo, el síntoma de pardeamiento en el tubérculo fue el criterio que se consideró para determinar si hubo o no transmisión del patógeno y con esta información se estimó el porcentaje de transmisión del total de injertos realizados. En 2006, los tubérculos procedentes de campo de clones con síntomas de PMP, fueron sembrados en el invernadero y se seleccionaron tres plantas (clones) con síntomas de la enfermedad.

taken and they were implanted in potato of greenhouse of a month of age, free of the main virus (PLRV, PVX, PVY, PVS and PVA). The implanted genotypes were: Michoacán, Norteña, NAU-6 and Sangema.

PCR tests were carried out in foliage of all samples genotypes in field and implanted in greenhouse, to corroborate that it was an pathogen infectious agent after symptoms were observed in foliage; successive implants were made (from two up to six), transferring the pathogen from a plant to another. For this, were implanted 83, 72, 9 and 6 plants of the Norteña, Michoacán, Zafiro and Lupita varieties susceptible to the browning and in which evident symptoms are induced as much in the foliage as in tuber; there were also considered 34 and 10 plants of the tolerant genotypes NAU-6 and Lady Rosetta that express symptoms of light or null browning in field.

Other genotypes that were serially implanted were: Alpha (72 plants), Bintje (4), Gigant (6), Granola (8), Marciana (2), Mondial (3), Montserrat (9), Mosca B (12), Sancal (9), Sangema (45), San José (4), clone 4-11(5) and 676008 Roja (5). Each plant coming from field with symptoms of PMP implanted in greenhouse with material of both cycles, it represented isolation initially and some were analyzed in laboratory with the PCR technique, to determine the presence or absence of phytoplasma.

When the symptoms were evident in the foliage or in the tubers, it was carried out PCR using specific initiators for phytoplasmas. In the first cycle of amplifications the couple of initiators P1/Tint was used and in the second the couples of universal initiators R16mF2/R16mR1 and R16F2/R16R2 (Gundersen and Lee, 1996).

The number of processed samples varied from 1 to 16 in the genotypes: Alpha (7), Gigant (4), Lady Rosetta (10), Michoacán (14), Mondial (1), NAU-6 (8), Norteña (10), Sangema (3) and Zafiro (16); however, the browning symptom in the tuber was considered as criteria to determine if there was or no transmission of the pathogen and with this information it was considered the percentage of transmission of the total of carried out implants. In 2006, the tubers coming from field of clones with symptoms of PMP were sowed in the greenhouse and three plants were selected (clones) with symptoms of the disease.

Starting from the branches with reduction of buds, leaflets reduction, yellowish and purple coloration, cuttings of genotypes Zafiro, Norteña, Michoacán and Lupita were

A partir de las ramas con acortamiento de entrenudos, reducción de foliolos, amarillamientos y coloración purpúrea, se seccionaron esquejes de genotipos Zafiro, Norteña, Michoacán y Lupita, susceptibles al pardeamiento, estos fueron injertados en chile manzano y criollo mixquic, y en jitomate Río Grande. Se tuvieron un total de 43 aislamientos, considerando cada injerto procedente de una planta con síntomas típicos de PMP, de campo o invernadero, como un aislamiento independiente.

### **Monitoreo de fitoplasmas en plantas de papa, chile y jitomate, mediante prueba de PCR**

Las muestras de tejido de plantas de papa con síntomas en el follaje, tubérculos con pardeamiento y chile manzano donde se mantuvo cada aislamiento, fueron sometidos a la prueba de PCR para detectar fitoplasmas. Las extracciones de ADN se realizaron por el método de Lee *et al.* (1993) y se hicieron PCR's secuenciales o anidadas con los iniciadores universales R16F2n (5'-GAA ACG ACT AAG ACT GG-3') y R16R2 (5'-TGA CGG GTG TGT ACA CCC G-3'), con los cuales se obtiene un fragmento de 1 200 pares de bases (pb) de longitud (Lee *et al.*, 1993; Gundersen y Lee, 1996).

### **Análisis por RFLP y secuenciación**

El producto amplificado procedente de tubérculo fue digerido con endonucleasas de restricción AluI, HhaI, HpaII, MseI, Tsp 5091 y KpnI (Gibco BRL, Beverly, MA). Se agregaron 2 µl de buffer, 0.2 µl de cada enzima, 5 µl de producto de PCR y se aforó a un volumen final de 20 µl. Para las enzimas Alu I, HhaI, HpaII, MseI se consideró una temperatura de digestión a 37 °C y para Tsp 5091 a 65 °C. Con la idea de asegurar una completa digestión de los productos se utilizó más tiempo del recomendado por el fabricante (24 h).

Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg ml<sup>-1</sup>) y se observaron en fotodocumentador (Gel-Doc 2000, BIO-RAD). Para conocer los pesos moleculares de los patrones de bandeado obtenidos con la digestión, se colocó en gel de agarosa un marcador de peso molecular ØX174ADN (promega symbios). La longitud de los fragmentos de ADN<sub>r</sub> se comparó con patrones electroforéticos propuestos por Davis *et al.* (1997); Lee *et al.* (1998).

Para corroborar los resultados obtenidos, el ADN<sub>r</sub> del fitoplasma (aproximadamente 1.2 pb) producto de la amplificación por PCR con los iniciadores R16F2n y R16R2,

cut, susceptible to the browning, these were implanted in chili manzano and creole mixquic, and in jitomate Río Grande. There were a total of 43 isolations, considering each implant coming from a plant with typical symptoms of PMP, of field or greenhouse, as an independent isolation.

### **Phytoplasmas supervision in potato, chili and jitomate plants, by means of PCR test**

The samples of tissue of potato plants with symptoms in the foliage, tubers with browning and chili manzano where each isolation was kept, were subjected to PCR test in order to detect phytoplasmas. For the extractions of DNA the method used was proposed by Lee *et al.* (1993) and sequential or nested PCR's was made with the universal initiators R16F2n (5'-GAAACG ACTAAGACTGG-3') y R16R2 (5'-TGACGGGTGTGTACACCCG-3'), with which a fragment of 1 200 couples of bases is obtained (pb) of longitude (Lee *et al.*, 1993; Gundersen and Lee, 1996).

### **Analysis by RFLP and sequence**

The amplified product coming from tuber was digested with restriction endonucleases AluI, HhaI, HpaII, MseI, Tsp 5091 and KpnI (Gibco BRL, Beverly, MA). 2 µl of buffer were added, 0.2 µl of each enzyme, 5 µl of PCR product and it was gauged to a final volume of 20 µl. For the enzymes Alu I, HhaI, HpaII, MseI it was considered a digestion temperature at 37 °C and for Tsp 5091 at 65 °C. With the idea of assuring a complete digestion of the products more time was used than the recommended by maker (24 h).

The restriction fragments were separated by electrophoresis in polyacrylamide gel at 8%, they were tinted with ethidium bromide (0.5 µg ml<sup>-1</sup>) and they were observed in photodocumentator (Gel-Doc 2000, BIO-RAD). To know the molecular weights of band patterns obtained, with the digestion it was placed in the agarose gel a marker of molecular weight ØX174 DNA (promega symbios). The longitude of the fragments of DNAr was compared with the electrophoresic pattern proposed by Davis *et al.* (1997); Lee *et al.* (1998).

To corroborate the obtained results, the DNAr of the phytoplasma (approximately 1.2 pb) product of amplification per PCR with initiators R16F2n and R16R2, cleaned with



se limpió con el sistema de purificación en columnas (Qiagen Co., Hilden Alemania). Los productos purificados se enviaron a secuenciar al laboratorio de bioquímica molecular, Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-Iztacala), de la UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank y con el paquete BLAST.

the purification system in columns (Qiagen Co., Hilden Germany). The purified products were sent to sequence to laboratory of molecular biochemistry, Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-Iztacala), of the UNAM. The obtained sequences were compared with the database GenBank and with the software BLAST.

## RESULTADOS

### Colección de aislamientos y transmisión seriada por injerto de punta morada de la papa

En el año 2005 y 2006, no hubo transmisión de síntomas con los brotes (tejido de injerto) obtenidos de Sancal y Sangema, pero el resto de los aislamientos se obtuvieron altos porcentajes de transmisión, lográndose ésta desde 2 a 6 generaciones. De cuatro genotipos utilizados como portainjertos, Sangema mostró mayor porcentaje de transmisión (52.63%), Michoacán (42.10%), Norteña (31.57%) y NAU-6 (5.2%) (Cuadro 1).

## RESULTS

### Collection of isolations and series transmission for implant of potato purple tip

In year 2005 and 2006, there was not transmission of symptoms with the sprout (implant tissue) obtained of Sancal and Sangema, but with the rest of the isolations high percentages of the transmission were obtained, being achieved this from 2 to 6 generations. Of the four genotypes used as rootstocks, Sangema showed bigger transmission percentage (52.63%), Michoacán (42.10%), Norteña (31.57%) and NAU-6 (5.2%) (Table 1).

### Cuadro 1. Severidad en el follaje y porcentaje de transmisión de punta morada de la papa en cuatro genotipos de papa, colectados en campo durante 2005 y 2006.

Table 1. Severity in foliage and percentage of transmission of potato purple tip in four potato genotypes, collected in field during 2005 and 2006.

Genotipo de procedencia	Michoacán	Norteña	NAU-6	Sangema
Alpha	0	0	0	F
Bintje	0	0	0	L
Gigant	0	0	0	F
Granola	0	0	0	L
Lady Rosetta	0	0	M	L
Lupita	0	0	0	M
Marciana	0	0	0	M
Michoacán	M	M	0	M
Mundial	0	0	0	M
Montserrat	M	0	0	F
Mosca B	L	M	0	0
NAU-6	M	L	0	0
Norteña	M	0	0	0
Sancal	0	0	0	0
Sangema	0	0	0	0
San José	M	0	0	0
Zafiro	M	M	0	0
4-11	L	L	0	0
676008 Roja	0	M	0	0
Transmisión (%)	42.10	31.57	5.2	52.63

0= negativo; L= leve; M= moderado; F= fuerte.

En la transmisión seriada de las muestras procedentes de follaje, 1 de 7 fueron positivas para fitoplasma y de tubérculo 8 de 9. Esto indica que dicho patógeno fue transferido secuencialmente hasta la tercera transferencia y los síntomas inducidos y observados tanto en follaje como en tubérculo estuvieron asociados a este agente infeccioso (Cuadro 2). De 448 plantas injertadas con esquejes sintomáticos procedentes originalmente de campo y después de invernadero, 164 presentaron síntomas de pardeamiento y brotación anormal en el tubérculo y 284 sin síntomas; por lo tanto, se obtuvo un porcentaje de transmisión de 37. De las pruebas de PCR realizadas en follaje y tubérculo de algunas plantas del último genotipo injertado en las pruebas de transmisión seriada, la mayor detección se presentó en los tubérculos de NAU-6, Norteña, Michoacán y Alpha (Cuadro 2).

In the serial transmission of samples coming from foliage, 1 of 7 was positive for phytoplasma and from tuber 8 out of 9. This indicates that such pathogen was transferred sequentially until the third transfer and the induced and observed symptoms as much in foliage as in tuber were associated to this infectious agent (Table 2). Out of 448 plants implanted originally with reasonable symptomatic cuttings of field and after greenhouse, 164 showed browning symptoms and abnormal sprouting in the tuber and 284 without symptoms; therefore, was obtained a percentage of transmission of 37. Of PCR tests carried out in foliage and tuber of some plants coming from the last genotype implanted in the tests of series transmission, the biggest detection was presented in the tubers of NAU-6, Norteña, Michoacán and Alpha (Table 2).

**Cuadro 2. Detección de fitoplasmas mediante PCR en tubérculos con pardeamiento y follaje con síntomas de PMP, en el genotipo final de la transmisión seriada.**

**Table 2. Phytoplasmas detection by means of PCR in tubers with browning and foliage with symptoms of PMP, in the final genotype of series transmission.**

Genotipo final	Injerto seriado	Número de transferencias	PCR en follaje	PCR en tubérculo
NAU-6	Lupita/NAU-6	1	*	+
NAU-6	Granola/NAU-6	1	*	0
NAU-6	NAU-6/Alpha/Mich/NAU-6	3	+	0
Sangema	Gigant/Sangema	1	*	0
Sangema	Binje/Sangema	1	*	0
Sangema	L. Rosetta/Sangema	1	*	0
Norteña	Montserrat/Sangema/Norteña	2	*	+
Norteña	NAU-6/Michoacán/Norteña	2	0	+
Norteña	Sancal/Alpha/Norteña	2	0	+
Norteña	NAU-6/Michoacán/Norteña	2	0	+
Norteña	NAU-6/Michoacán/Michoacán/Norteña	3	0	*
Michoacán	Montserrat/Sangema/Michoacán	2	0	+
Michoacán	Norteña/Michoacán/Alpha/Michoacán	3	0	+
Alpha	08-R/Sancal/Norteña/Alpha	3	0	+

\*= PCR negativo; += PCR positivo; 0= no se realizó PCR.

**Detección y monitoreo de fitoplasmas mediante PCR**

En tubérculos de Norteña y Michoacán, se tuvieron con mayor frecuencia detecciones positivas mediante PCR y también en muestras de follaje de la variedad Lady Rosetta,

**phytoplasmas detection and supervision by means of PCR**

In tubers of Norteña and Michoacán, were obtained with more frequency positive detections by means of PCR and also in samples of foliage of variety Lady Rosetta, NAU-6

NAU-6 y Norteña; Michoacán en la segunda transferencia y en la quinta transferencia Michoacán y Zafiro, después de haber sido injertados en chile manzano; sin embargo, no se observó el pardeamiento típico en los tubérculos para el caso de Norteña y Michoacán (Cuadro 3).

and Norteña; Michoacán in the second transfer and in the fifth transfer Michoacán and Zafiro, after having been implanted in chili manzano; however, the typical browning was not observed in the tubers for the case of Norteña and Michoacán (Table 3).

**Cuadro 3. Detección de fitoplasmas mediante PCR en follaje con síntomas de PMP y sin síntomas de pardeamiento en el tubérculo, en el genotipo final de la transmisión seriada.**

**Table 3. Phytoplasmas detection by means of PCR in foliage with symptoms of PMP and without browning symptoms in the tuber, in the final genotype of series transmission.**

Genotipo final	Injerto seriado	Núm. de transferencias	PCR en follaje
Michoacán	P6/chile manzano/Michoacán	2	+
Michoacán	NAU-6/Clonα/α/Norteña/chile manzano/Michoacán	5	+
Lady Rosetta	αFN/chile manzano/Lady Rosetta	2	+
Lady Rosetta	P6/chile manzano/Lady Rosetta	2	+
Lady Rosetta	P6/chile manzano/Lady Rosetta	2	+
Lady Rosetta	αFN/chile manzano/Lady Rosetta	2	+
Lady Rosetta	αFN/ chile manzano/Lady Rosetta	2	+
Norteña	Lady Rosetta/Sangema/Norteña	2	+
NAU-6	αFN/chile mixquic/NAU-6	2	+
Zafiro	NAU-6/Clonα/α/Norteña/Chile manzano/Zafiro	5	+

P6= planta 6 de campo; αFN= alpha faldas Nevado de Toluca.

De 116 plantas de papa con síntomas de PMP analizadas mediante PCR en follaje o tubérculo 19 fueron positivas, lo cual equivale a una detección de 16.37%. Para el caso de chile manzano y criollo mixquic la detección fue de 70.83% y 66.6% respectivamente (Cuadro 4). En jitomate no se detectó al fitoplasma (Cuadro 4 y Cuadro 5).

Of 116 potato plants with symptoms of PMP analyzed by means of PCR in foliage or tuber 19 were positive, which is equal to a detection of 16.37%. For the case of chili manzano and creole mixquic the detection was respectively of 70.83% and 66.6% (Table 4). In red tomato it was not detected to phytoplasma (Table 4 and Table 5).

**Cuadro 4. Detección de fitoplasmas mediante PCR en papa, chile y jitomate.**

**Table 4. Phytoplasmas detection by means of PCR in potato, chili and red tomato.**

Plantas	Plantas con síntomas/plantas injertadas	Detección de plantas con síntomas (%)	Total de negativos
Papa	19/116	16.38	8/8
Chile manzano	17/24	70.83	5/5
Chile mixquic	2/3	66.6	2/2
Jitomate	0/19	0	1/1
Vinca testigo	3/3	-	-
Cocotero testigo	1/1	-	-
Total muestras	166		



Se detectaron fitoplasmas en las tres localidades muestreadas del Estado de México: faldas del Nevado de Toluca, Calimaya y Chapingo, Texcoco; de donde se tomaron los aislamientos para injertar dentro del invernadero, donde también se detectaron casos positivos (Cuadro 5). Para los genotipos NAU-6 y Michoacán, sembrados en campo durante 2004 y 2005 la detección de fitoplasmas fue positiva (Figura 1).

Phytoplasmas were detected in the three samples localities State of Mexico: base of Nevado de Toluca, Calimaya and Chapingo, Texcoco; of where there were taken isolations to implant in greenhouse, where positive cases were also detected (Table 5). For the genotypes NAU-6 and Michoacán, fields in field during 2004 and 2005 the phytoplasmas detection were positive (Figure 1).

**Cuadro 5. Transmisión de la punta morada de la papa y detección de fitoplasmas mediante PCR.**  
**Table 5. Transmission of purple tip of potato and phytoplasmas detection by means of PCR.**

Genotipo muestreado y seriación	Lugar de procedencia	Parte de la planta extraída	PCR+ /total de muestras
Mondial	Calimaya, Edo. Méx.	Brote fino	1/1
<i>Catharantus roseus</i>	Chapingo, Edo. Méx.	Testigo positivo (frijol)	1/1
Tapetes	Biología Molecular C. P.	Testigo positivo	1/1
Alpha	Chapingo, Edo. Méx.	Brote fino	1/1
Gigant	Chapingo, Edo. Méx.	Brote fino	1/1
Zafiro	Invernadero	Testigo positivo	1/1
$\alpha$ campo/chile manzano	Faldas Nevado, Toluca	Follaje	1/1
Chile manzano	Invernadero	Testigo negativo	-
P-6/chile manzano	Invernadero	Follaje	-
P-5/chile manzano	Invernadero	Follaje	+
P5/chile criollo mixquic	Invernadero	Follaje	+
chile manzano/L. Rosetta	Invernadero	Follaje	5/5
Alpha/chile criollo mixquic	Faldas Nevado, Toluca	Follaje	+
P-6/Michoacán	Invernadero	Follaje	+
Chile manzano	Invernadero	Testigo negativo	0/2
Chile criollo mixquic	Invernadero	Testigo negativo	0/2
NAU-6/chile manzano	Invernadero	Follaje	++
Alpha	Invernadero	Testigo negativo	-
Gigant/Michoacán	Invernadero	Follaje	2/2
NAU-6/manzano/ $\alpha$	Invernadero	Follaje	+
Michoacán	Invernadero	Testigo negativo	-
Norteña	Invernadero	Testigo negativo	-
Papa	Invernadero	Follaje	$\infty$ +
Norteña	Invernadero	Testigo negativo	-
NAU-6	Chapingo, Edo. de Méx.	Tub.c/s ML	+
Michoacán	Chapingo, Edo. de Méx.	Tub.c/s F	++
Chile manzano mixta	Invernadero	Testigo negativo	-
Norteña	Invernadero	Testigo negativo	-
No8/Norteña/ $\alpha$ /Norteña	Invernadero	Tub.c/s F	+
No10/Michoacán/Michoacán	Invernadero	Tub.c/s F	+
No15/NAU-6	Invernadero	Tub.c/s ML	$\infty$ +
Papa/Chile manzano	Invernadero	Follaje	4/4
Papa/Chile manzano <sup>a</sup>	Invernadero	Follaje	10/10
M23/Zafiro	Invernadero	Tallo	+
Papa/Chile manzano <sup>a</sup>	Invernadero	Testigo negativo	0/2

SP= sin pardeamiento; ML= muy leve; L= leve; LM= leve moderado; M= moderado; MF= moderado fuerte; F= fuerte; <sup>a</sup>= Chile manzano injertado con papa con PMP.

En la Figura 1 se observa lo siguientes carriles: a) carril M, marcador de peso molecular  $\lambda$  Sty I; b) carril 1, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectado con el fitoplasma del amarillamiento del áster; c) carril 2, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Zafiro; d) carril 3, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo NAU-6; e) carril 4, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Lady Rosetta; f) carril 5, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Norteña; g) carril 6, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectado con el fitoplasma del amarillamiento del áster; h) carril 7, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Zafiro; i) carril 8, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo NAU-6; j) carril 9, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Lady Rosetta; k) carril 10, muestra de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo Norteña; estos fragmentos fueron amplificados 1.2 pb.

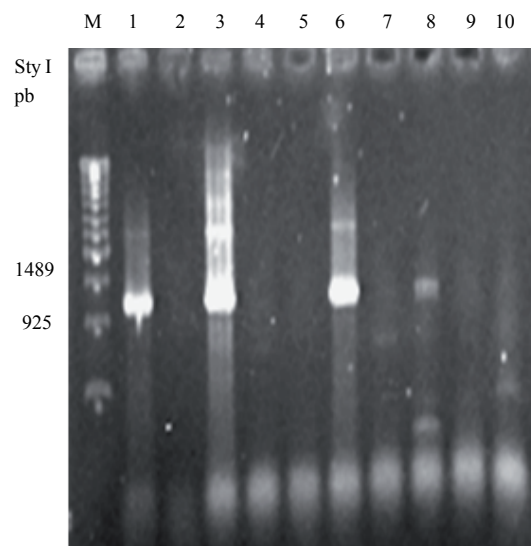
Los síntomas observados fueron la disminución en el crecimiento, enrollamiento de las hojas, clorosis, coloración roja o púrpura de nuevas hojas y proliferación de brotes axilares con hinchamientos en la base; en los tubérculos de NAU-6 el pardeamiento fue leve y en Michoacán moderado.

### Pardeamiento y brotación anormal en genotipos de papa

Se pueden distinguir patrones de comportamiento de la severidad del pardeamiento de tubérculos; a) los genotipos Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant y Alpha tuvieron lecturas que fluctuaron de nulo a leve (N-L) hasta muy leve a leve moderado (ML-LM) y generalmente presentaron brotes finos; b) los genotipos Bintje, Atlantic, 08 Roja, 4-11, Zafiro, San José, Sangema, Sancal, Malinche, Marciana, Lupita y Granola presentaron lecturas desde moderado hasta moderado fuerte (M-MF) y generalmente no presentaron brotes; y c) Mondial, Michoacán, Montserrat y Norteña variaron de moderado a moderado fuerte (M-MF) a moderado fuerte a fuerte (MF-F) y la mayoría de las veces no presentaron brotes.

Los tubérculos de los 19 genotipos evaluados en campo, de los cuales se tomaron esquejes para injertar en invernadero, dieron positivo para fitoplasma mediante PCR. Por otra parte, no todos los tubérculos con pardeamiento obtenidos en el invernadero por injerto seriado, fueron positivos para fitoplasma con prueba de PCR-anidada (Figura 2). En este gel la banda observada para NAU-6, cuyo grado

In Figure 1 are observed the following rails: a) carril M, marker of molecular weight  $\lambda$  Sty I; b) rail 1, positive witness of vinca (*Catharanthus roseus*) infected with the phytoplasma of the yellowish of aster; c) rail 2, sample of field foliage with symptoms of PMP in the genotype Zafiro; d) rail 3, sample of field foliage with symptoms of PMP in the genotype NAU-6; e) rail 4, sample of field foliage with symptoms of PMP in the genotype Lady Rosetta; f) rail 5, sample of field foliage with symptoms of PMP in the Norteña genotype; g) rail 6, positive control of vinca (*Catharanthus roseus*) infected with the phytoplasma of the yellowish of aster; h) rail 7, sample of field foliage with symptoms of PMP in genotype Zafiro; i) rail 8, sample of field foliage with symptoms of PMP in the genotype NAU-6; j) rail 9, sample of field foliage with symptoms of PMP in the genotype Lady Rosetta; k) rail 10, sample of field foliage with symptoms of PMP in the Northern Norteña; these fragments were amplified 1.2 pb approximately.



**Figura 1. PCR-anidada con los iniciadores R16F2n/R2.**  
**Figure 1. PCR-nested with initiators R16F2n/R2.**

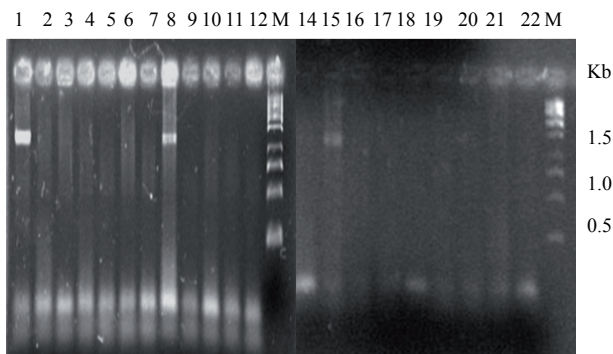
The observed symptoms were decrease in the growth, leafroll, chlorosis, red or purple coloration of new leaves and proliferation of auxillary swelling sprouts in the base; in the tubers NAU-6 the browning was light and in Michoacán was moderate.

### Browning and abnormal sprouting in potato genotypes

Patterns of behavior of the severity of the browning of tubers can be distinguished; a) the genotypes Mosca B, NAU-6, Lady Rosetta, Gigant and Alpha had readings that fluctuated

de pardeamiento va de OL a L, fue más gruesa y definida comparada con las obtenidas a partir de los tubérculos de Norteña y Michoacán con pardeamiento.

En este caso los carriles de la Figura 2 muestran lo siguiente: a) carril M, marcador de peso molecular 1pb ADN; b) carril 1, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con un aislamiento de fitoplasma que induce amarillamiento del áster; c) carril 2-7, muestras de follaje de papa de invernadero (41, 42 y 43) con síntomas de PMP; d) carril 8, testigo positivo de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con un aislamiento de fitoplasma que induce amarillamiento del áster; e) carril 9-10, muestras de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP (44); f) carril 11-12, muestras de tubérculos de invernadero con síntomas de pardeamiento (31 y 1); g) carril 14, muestra de tubérculo de invernadero con síntomas de pardeamiento; i) carril 15, muestra de tubérculo de invernadero con síntomas de pardeamiento (32); j) carril 16-19, muestras de tubérculo de invernadero con pardeamiento; k) carril 20-21, muestras de follaje de campo con síntomas de PMP en el genotipo San José; l) carril 22, testigo negativo de follaje de invernadero sin síntomas.



**Figura 2. PCR-anidada con par de iniciadores R16F2n/R2 de muestras de follaje y tubérculos de papa con síntomas de PMP en invernadero y campo.**

**Figure 2. PCR-nested with couple of initiators R16F2n/R2 of folige samples and potato tubers with symptoms of PMP in greenhouse and field.**

#### **Análisis por RFLP de productos amplificados por PCR y secuenciación**

El patrón de restricción obtenido mediante las enzimas AluI, HhaI, HpaI, MseI, Tsp 5091 y KpnI (Gibco BRL, Beverly, MA) en tubérculo con pardeamiento del genotipo

from null to light (N-L) until very light to light moderate (ML-LM) and they generally presented fine sprouts; b) the genotypes Bintje, Atlantic, 08 Roja, 4-11, Zafiro, San José, Sangema, Sancal, Malinche, Marciana, Lupita and Granola showed readings from moderate until moderate strong (M-MF) and they didn't generally present sprouts; and c) Mondial, Michoacán, Montserrat and Norteña varied of moderate to moderate strong (M-MF) to moderate strong to strong (MF-F) and most of the times didn't present sprouts.

The tubers of the 19 genotypes evaluated in field, of which took cuttings to implant in greenhouse, were positive for phytoplasma by means of PCR. On the other hand, all the tubers with browning obtained in the greenhouse by series implant, were not positive for phytoplasma with PCR-nested test (Figure 2). In this gel the observed band for NAU-6 whose browning grade goes from OL to L, was thicker and defined compared with those obtained starting from the tubers of Norteña and Michoacán with browning.

In this case the rails of Figure 2 show the following: a) rail M, marker of molecular weight 1pb DNA; b) rail 1, positive control of vinca (*Catharanthus roseus*) infected with a phytoplasma isolation that induces yellowish of aster; c) rail 2-7, samples of foliage of greenhouse potato (41, 42 and 43) with symptoms of PMP; d) rail 8, positive control of vinca (*Catharanthus roseus*) infected with a phytoplasma isolation that induces yellowish of aster; e) rail 9-10, samples of foliage of greenhouse potato with symptoms of PMP (44); f) rail 11-12, samples of greenhouse tubers with browning symptoms (31 and 1); g) rail 14, sample of greenhouse tuber with browning symptoms; i) rail 15, sample of greenhouse tuber with browning symptoms (32); j) rail 16-19, samples of greenhouse tuber with browning; k) rail 20-21, samples of field foliage with symptoms of PMP in the genotype San José; l) rail 22, negative witness of greenhouse foliage without symptoms.

#### **Analysis for RFLP of products amplified by PCR and sequence**

The restriction pattern obtained by means of enzymes AluI, HhaI, HpaI, MseI, Tsp 5091 and KpnI (Gibco BRL, Beverly, MA) in tuber with browning of the genotype NAU-6 (sample 41) corresponds to group aster yellows (Lee *et al.*, 1998). In Figure 3, the analysis of polymorphisms of the longitude of the fragments of restriction of the sequence 16S DNAR is shown amplified by PCR, with the initiators R16F2n/R2, of potato's clone tuber NAU-6 with light symptoms

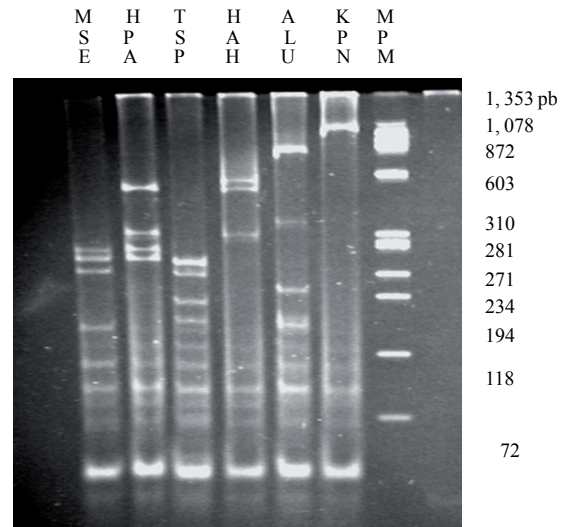
NAU-6 (muestra 41) corresponde al grupo áster yellows (Lee *et al.*, 1998). En la Figura 3, se muestra el análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia 16S ADNr amplificado por PCR, con los iniciadores R16F2n/R2, del tubérculo de papa clon NAU-6 con síntomas leves de pardeamiento. El ADN fue digerido con las enzimas de restricción MseI, HpaII, Tsp5091, HhaI, AluI, KpnI, separado por electroforesis en gel de poliacrilamida 8%; el carril MPM es el marcador del fago ΦX174 HaeII.

Al comparar la secuencia parcial de nucleótidos, obtenida de tubérculo con pardeamiento leve del genotipo NAU-6 (M41), con las secuencias depositadas en el GenBank, se encontró homología 98% con el fitoplasma *Cirsium white leaf phytoplasma*, *Spiraea stunt phytoplasma* y *Walnut witches' broom phytoplasma*, pertenecientes al grupo 16SIII, números de acceso AF373 1060, AF190228 y AF190227, respectivamente. Se obtuvo otra secuencia de nucleótidos proveniente de una muestra de follaje de papa de invernadero con síntomas de PMP, la cual indicó una homología 97% con el fitoplasma del grupo 16S I amarillamiento del áster y números de accesos DQ164213, AY37754, AY081817, AY737547, y AY733745.

## DISCUSIÓN

La transmisión seriada por injerto que oscilo de dos a seis generaciones, por lo general fue baja. Hay varias explicaciones por la deficiente transmisión por injerto: 1) la misma naturaleza infectiva del fitoplasma que ocasiona necrosis en el floema (McCoy *et al.*, 1989; Siddique *et al.*, 2001), lo cual puede bloquear el intercambio de la savia infectada del injerto al portainjerto, que impide la diseminación del patógeno y el consecuente desarrollo de síntomas; 2) que la distribución y concentración de los fitoplasmas en los distintos tejidos de la planta no es uniforme (Siddique *et al.*, 2001); de tal manera que el tejido usado como injerto puede o no tener al patógeno o tenerlo en muy baja concentración; esto también explicaría la variación en el periodo de incubación y manifestación de los síntomas en las plantas; 3) la variabilidad genética de cada una de las plantas que sirvieron de hospedante; 4) las condiciones ambientales que prevalecieron en las distintas fechas que se realizaron las pruebas de transmisión (Ploaie, 1981); y 5) que injertos realizados entre plantas de la misma especie no desarrollan tejidos de unión debido a la producción de sustancias inhibitoras (Dabek, 1983).

of browning. The DNA was digested with the restriction enzymes MseI, HpaII, Tsp5091, HhaI, AluI, KpnI, separated by electrophoresis in gel of polyacrilamide 8%; the rail MPM is the marker of the ΦX174 HaeII bacteriophage.



**Figura 3. Análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia 16S ADNr amplificado por PCR.**

**Figure 3. Polymorphisms analysis of longitude of the fragments of restriction of sequence 16S DNAr amplified by PCR.**

When comparing the partial sequence of nucleotides, obtained of tuber with light browning of the genotype NAU-6 (M41), with the sequences deposited in GenBank, it was found 98% homology with the phytoplasma *Cirsium white leaf phytoplasma*, *Spiraea stunt phytoplasma* and *Walnut witches' broom phytoplasma*, belonging to group 16SIII, access numbers AF373 1060, AF190228 and AF190227, respectively. Another nucleotides sequence coming from a sample of foliage of greenhouse potato was obtained with symptoms of PMP, which indicated a 97% homology with the phytoplasma of group 16S I of aster yellowish and numbers of accesses DQ164213, AY37754, AY081817, AY737547 and AY733745.

## DISCUSSION

The series transmission for implant that oscillated from two to six generations, in general was low. There are several explanations for the faulty transmission for implant: 1) the



Sin embargo, en la presente investigación el injerto y portainjerto de papa llegaron a permanecer vivos durante un mes, incluso el injerto siguió desarrollándose y generando nuevos tejidos y brotes sintomáticos; lo mismo se observó en injertos de papa a Chile y viceversa.

Estos resultados contradictorios pudieran deberse a las condiciones de campo, que permitieron un mejor desarrollo del follaje de las plantas de papa y de tubérculos producidos y por ende a condiciones fisiológicas de la planta más favorables para el establecimiento y multiplicación del fitoplasma. Una explicación posible para detección errática del patógeno, pudiera ser que esté distribuido irregular o heterogéneamente en la planta, lo cual dificulta su detección mediante esta prueba o bien que las concentraciones son tan bajas que no se detectan.

Es importante mencionar, que los positivos para fitoplasma con PCR en este trabajo siempre se obtuvieron mediante PCR anidada (Figura 1); indicando esto bajas concentraciones del mismo. Se han reportado resultados similares en cuanto a fallas en la detección por concentración de fitoplasmas pertenecientes al grupo amarillamiento del áster en plantas ornamentales del género *Tagetes* (Kaminska y Dziekanowska, 2001; Rojas *et al.*, 2003).

Por otra parte, además de la concentración e infectividad del fitoplasma, las condiciones ambientales prevalecientes en diferentes épocas del año y susceptibilidad del hospedante (estado fisiológico y fenológico de la planta, época del año en que se colecta la muestra), son factores que intervienen en la expresión y severidad de los síntomas (Guthrie *et al.*, 1998) dificultando en este caso, la detección del mismo.

En cuanto a severidad de los síntomas en el tubérculo, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en campo para las mismas variedades (Cadena *et al.*, 2003). Síntomas similares fueron inducidos bajo condiciones de invernadero, por *Bactericera cockerelli*. (Diaz-Valasis *et al.*, 2008). Hubo genotipos que presentaron pardeamiento de muy leve a leve y ocasionalmente no lo presentan pero alcanzaron a producir brotes finos como fueron los cultivares Alpha, Gigant, Lady Rosetta y NAU-6. Estos últimos también mostraron una respuesta similar en los tubérculos, cuando fueron expuestos a *B. cockerelli* en invernadero (Diaz-Valasis *et al.*, 2008).

Sin embargo, esta última posibilidad podría descartarse dado que en las reacciones se consideró la detección del gen endógeno de cloroplasto, que siempre resultó positivo

same infectious nature of the phytoplasma that causes phloem necrosis (McCoy *et al.*, 1989; Siddique *et al.*, 2001), which can block the exchange of the infected sap from the implant to the rootstock that avoids the dissemination of the pathogen and the consequent development of symptoms; 2) that the distribution and concentration of the phytoplasmas in the different tissues of the plant are not uniform (Siddique *et al.*, 2001); in such a way that the tissue used as implant can or not to have the pathogen or to have it in very low concentration; this would also explain the variation in the period of incubation and manifestation of the symptoms in the plants; 3) the genetic variability of each one of the plants that served as host; 4) the environmental conditions that prevailed in the different dates that were carried out the transmission tests (Ploaie, 1981); and 5) that implants carried out between plants of the same species don't develop bond tissues due to the production of inhibitory substances (Dabek, 1983).

However, in the present investigation the implant and potato rootstock ended up remaining alive during one month, the implant even continued being developed and generating new tissues and symptomatic sprouts; the same effect was observed in potato implants to Chile and vice versa.

These contradictory results could be due to field conditions that allowed a better development of foliage of potato's plants and of produced tubers and then to physiologic conditions of the most favorable plant for the establishment and multiplication of phytoplasma. A possible explanation for erratic detection of this pathogen, it could be that is distributed irregular or heterogeneously in the plant, which difficult their detection by means of this test or that the concentrations are so low that they are not detected.

It is important to mention that the positive to phytoplasma with PCR in this work were always obtained by means of nested PCR (Figure 1); indicating this low concentrations. Similar results have been reported as for failures in detection for phytoplasmas concentration belonging to the group aster yellows in ornamental plants of the genus *Tagetes* (Kaminska and Dziekanowska, 2001; Rojas *et al.*, 2003).

On the other hand, besides concentration and infectionability of phytoplasma, the prevalent environmental conditions in different times of the year and susceptibility of the host (physiologic and phenological state of the plant, time of the year in which sample is collected), are factors that intervene in the expression and severity of the symptoms (Guthrie *et al.*, 1998) affecting in this case its detection.



obteniéndose una banda de 315 pb. En cambio en NAU-6, que presenta pardeamiento leve, tanto en campo como en invernadero, la detección en follaje y en tubérculo fue más frecuente. Por los resultados obtenidos bajo condiciones de invernadero en diferentes genotipos, se considera que el pardeamiento en los tubérculos fue inducido por un patógeno infeccioso transmitido mediante injertos sucesivos (hasta 6 injertos seriados). La frecuencia de detección del fitoplasma mediante PCR tanto en tubérculo como en follaje fue baja; sin embargo, comparada con ésta última, la detección en tubérculo y brote fino fue ligeramente mayor.

En el caso de resultados positivos en follaje de la variedad Lady Rosetta y Michoacán en la segunda transferencia, Michoacán y Zafiro en la sexta después de haber sido injertados en chile manzano, no se observó el pardeamiento típico en los tubérculos, esto se debió a la presencia de una variante asintomática de fitoplasma. Lo anterior coincide con lo reportado en infecciones mixtas por fitoplasmas en una misma planta o a variantes presentes en follaje y tubérculo (Leyva-López y Martínez-Soriano, 2002), que pudieran estar expresando diferente sintomatología en la misma.

El patrón de RFLP's (Figura 3), procedente de un tubérculo de papa de invernadero (muestra 41) del clon NAU-6 con síntomas leves de pardeamiento, sugiere que este patógeno presumiblemente pudiera ser un fitoplasma asociado al grupo amarillamiento del áster. La evidencia experimental en este trabajo, indica que la sintomatología típica de PMP en el follaje y el pardeamiento en el tubérculo es inducida por un agente infeccioso, posiblemente un fitoplasma ya que logró ser transmitido hasta por seis generaciones mediante injertos seriales a través de diferentes genotipos de papa y chile.

## CONCLUSIONES

El pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos fueron inducidos por un patógeno infeccioso, que logró ser transmitido mediante injertos sucesivos bajo condiciones de invernadero hasta seis veces en diferentes genotipos de papa.

La detección de fitoplasmas asociados con el pardeamiento y la brotación anormal de la papa, en follaje, tallo y tubérculo mediante PCR, fue errática e inconsistente en plantas mantenidas en invernadero. Sin embargo, en el campo fue consistente.

As for severity of the symptoms in the tuber, the results obtained in this work coincide with that reported in field for the same varieties (Cadena *et al.*, 2003). Similar symptoms were induced under greenhouse conditions, by *Bactericera cockerelli*. (Díaz-Valasis *et al.*, 2008). There were genotypes that showed browning of very light to light and occasionally they don't present it but they reached to produce fine sprouts as were the cultivares Alpha, Gigant, Lady Rosetta and NAU-6. These last ones also showed a similar response in tubers, when they were exposed to *B. cockerelli* in greenhouse (Díaz-Valasis *et al.*, 2008).

However, this last possibility could be discarded since in the reactions it was considered the detection of endogenous gene of chloroplast that was always positive being obtained a band of 315 pb. On the other hand in NAU-6 that shows light browning, as much in field as in greenhouse, the detection in foliage and in tuber it was more frequent. By results obtained under greenhouse conditions in different genotypes, it is considered that the browning in the tubers was induced by an infectious pathogen transmitted by means of successive implants (up to 6 series implants). The frequency of detection of the phytoplasma by means of PCR as much in tuber as in foliage was low; however, compared with this last, the detection in tuber and fine sprout was lightly bigger.

In case of positive results in foliage of variety Lady Rosetta and Michoacán in the second transfer, Michoacán and Zafiro in the sixth after having been implanted in chili manzano, the typical browning was not observed in the tubers, this was due to the presence of an asymptomatic variant of phytoplasma. This coincides with reported in mixed infections by phytoplasmas in a same plant or to variants present in foliage and tuber (Leyva-López and Martínez-Soriano, 2002) that could be expressing different symptoms in the same one.

The pattern of RFLP's (Figure 3), coming from greenhouse potato's tuber (sample 41) of the clone NAU-6 with light symptoms of browning, suggests that this pathogen presumably could be a phytoplasma associated to the group of aster yellows. The experimental evidence in this work, indicates that the typical symptoms of PMP in the foliage and the browning in the tuber is induced by an infectious agent, possibly a phytoplasma since achieved to be transmitted until up to six generations by means of serial implants through different potato genotypes and chili.

Las plantas de chile manzano pueden ser hospedantes intermediarias o alternas en la transmisión del patógeno involucrado en el pardeamiento y la brotación anormal del tubérculo.

Los genotipos Alpha, Gigant, Lady Rosetta y NAU-6, presentaron un pardeamiento de muy leve a leve; por lo tanto, pudieran ser utilizados para obtener variedades tolerantes a PMP, en los programas de mejoramiento genético.

## LITERATURA CITADA

- Almeyda-León, I. H.; Rubio, C. O.; Cadena-Hinojosa, M. A.; Díaz-Valasis, M.; Zavala, T. E. y Rocha, M. A. 1999. Implementación de técnicas moleculares para la detección del agente causal de la punta morada de la papa en plantas e insectos vectores. Laboratorio de patología molecular. INIFAP. Avances. 19 p.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1974. Estudios sobre la punta morada de la papa. Tesis de Maestría. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Estado de México. 70 p.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1987. Efecto de genotipos de plantas, aplicaciones de antibióticos e insecticidas en el control de la punta morada de la papa. *Agric. Téc. Méx.* 13:3-13.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1993. La punta morada de la papa en México: incidencia y búsqueda de resistencia. *Agrociencia.* 4:247-256.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1996. La punta morada de la papa en México: II efecto de cubiertas flotantes, cultivares y productos químicos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14:20-24.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1999. Potato purple top in Mexico: effects of plant spacing and insecticide application. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17:91-95.
- Cadena-Hinojosa, M. A. y Galindo, A. J. 1986. Reducción de la incidencia de la punta morada de la papa por medio de fechas de siembra, genotipo de planta y aplicación de insecticidas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 3:100-104.
- Cadena-Hinojosa, M. A.; Guzmán-Plazola, R.; Díaz-Valasis, M.; Zavala Quintana, T. E.; Magaña-Torres, O. S.; Almeyda-León, I. H. y Rubio-Covarrubias, O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en valles altos y sierras del Estado de México, Tlaxcala y Distrito Federal. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:248-259.

## CONCLUSIONS

The browning and the abnormal sprouting in the tubers were induced by an infectious pathogen that achieved to be transmitted by means of successive implants under greenhouse conditions up to six times in different potato genotypes.

The phytoplasmas detection associated with the browning and the abnormal sprouting of the potato, in foliage, stem and tuber by means of PCR, were erratic and inconsistent in plants kept in greenhouse. However, in the field it was consistent.

The plants of chili manzano can be intermediary hosts or alternate in the transmission of the pathogen involved in the browning and the abnormal sprouting of the tuber.

The genotypes Alpha, Gigant, Lady Rosetta and NAU-6, presented a browning of very light to light; therefore, they could be used to obtain tolerant varieties to PMP, in the programs of genetic improvement.

*End of the English version*



- Cárdenas, S. E.; Valdovinos, P. G.; Cadena-Hinojosa, H. M. y Estañol, B. E. 1992. Detección de organismos tipo micoplasmas en plantas de papa con los síntomas de "punta morada". XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México. Memorias. 62 p.
- Dabek, A. J. 1983. Leafhopper transmission of Rhynchosia little leaf, a disease associated with mycoplasma-like organisms in Jamaica. *Ann. Appl. Biol.* 103:431-438.
- Davis, R. I.; Schneider, B. and Gibb, K. S. 1997. Detection and differentiation of phytoplasmas in Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 48:535-544.
- Díaz-Valasis, M.; Cadena-Hinojosa, M. A.; Rojas-Martínez, I.; Zavaleta-Mejía, E.; Ochoa-Martínez, D. and Bujanos, M. R. 2008. Responses of potato cultivars to the psyllid (*Bactericera cockerelli*) under greenhouse conditions. *Agric. Téc. Méx.* 34:471-479.

- Gundersen, D. E. and Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterranea*. 35:144-151.
- Guthrie, J. N.; White, D. T.; Walsh, K. B. and Scott, P. T. 1998. Epidemiology of phytoplasma-associated to papaya diseases in Queensland, Australia. *Plant Dis.* 82:1107-1111.
- Hirumi, H. and Maramorosh, K. 1968. Mycoplasma like bodies in the salivary glands of insect vectors carrying the Aster Yellow Agent. *J. Virol.* 3:82-84.
- Kaminska, M. and Dziekanowska, D. 2001. Detection of aster yellows phytoplasma in *Tagetes patula* plants with two types of symptoms. *Phytopathol. Polonica*. 21:81-92.
- Kunkel, L. O. 1926. Studies on Aster Yellows. *Am. J. Bot.* 13:646-705.
- Leach, J. G. and Bishop, C. F. 1944. Further studies on the nature and cause of purple top wilt of potatoes. *Phytopathol.* 34:1006-1007.
- Lee, I. M.; Hammond, R.; Davis, R. E. and Gunderson, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathol.* 83:834-842.
- Lee, I. M.; Gundersen-Rindal, D. E.; Davis, R. E. and Bartoszyk, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. System. Bacteriol.* 48:1153-1169.
- Lee, I. M.; Bottner, K. D.; Munyaneza, J. E.; Secor, G. A. and Gudmestad, N. C. 2004. Clover proliferation group (16srvi), subgroup a (16srvi-a) phytoplasma is probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Dis.* 88:429.
- Lee, I.; Bottner, K. D.; Secor, G. and Rivera-Varas, V. 2006. "Candidatus phytoplasma americanum", a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 56:1593-1597.
- Leyva-López, N. E. y Martínez-Soriano, J. 2002. Diagnóstico diferencial de fitoplasmas en papa y su aplicación en la búsqueda de vectores. Taller internacional sobre punta morada de papa y *Paratrioza cockerelli*. INIFAP. México. Memoria. 34-51 pp.
- McCoy, R. E.; Caudwell, A.; Chang, C. J.; Chen, T. A.; Chikowski, L. N.; Cousin, M. T.; Dale, J. L.; Leeuw de G., T. N.; Golino, D. A.; Hackett, K. J.; Kirkpatrick, B. C.; Marwitz, R.; Petzol, H.; Sinha, R. C.; Sugiura, M.; Whitcomb, R. F.; Yang, I. L.; Zhu, B. M. and Seemuller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. 545-640. pp. *In: the mycoplasmas*. Whitcomb, R. F. and Tully, J. G. (eds). Vol. 5. Academic Press. Unites States of America. 780 p.
- Maramorosch, K. 1998a. Potato purple top wilt. Segundo Simposio Internacional sobre el cultivo de la Papa. Toluca, Estado de México, México. Memorias. 21-31 pp.
- Maramorosch, K. 1998b. Current status of potato purple top wilt. *Int. J. Trop. Plant. Dis.* 16:61-72.
- Maramorosch, K.; Shikata, E. and Granados, R. 1968. Structures resembling mycoplasma in diseased plants vectors. *Transactions of the New York Academy of Sciences.* 30:841-855.
- Ploaie, P. G. 1981. Mycoplasma like organisms and plant diseases in Europe. *In: Maramorosh, K. and Harris, K. F. (eds). Plant diseases and vectors: ecology and epidemiology*. Academic Press. New York, USA. 368 p.
- Rojas-Martínez, R. I.; Zavaleta-Mejía, E.; Lee, I. M.; Martín, M. and Aspiroz, H. S. 2003. Detection and characterization of the phytoplasma associated with marigold phyllody in Mexico. *J. Plant Pathol.* 85:81-86.
- Self, R. L. and Darling, H. M. 1953. Purple top disease of the potato in Wisconsin. *Research Bulletin* 184. University of Wisconsin. Madison, Unites States of America. 24 p.
- Siddique, A. B. M.; Agrawa, G. K.; Alam, L. N. and Krishna-Reddy, M. 2001. Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with little leaf disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Bangladesh. *J. Phytopathol.* 149: 237-244.
- Zavala Quintana, T. E. y Cadena-Hinojosa, M. A. 1998. Punta morada de la papa. Tecnología de cultivo de papa. CONPAPA. INIFAP. Toluca, Estado de México. Resúmenes. 17-19 pp.