



VII CONGRESO ECUATORIANO DE **LA PAPA**

ADAPTACIÓN AL CAMBIO CLIMÁTICO

LIBRO DE MEMORIAS

ORGANIZADO POR





**VII CONGRESO
ECUATORIANO DE
LA PAPA**
ADAPTACIÓN AL CAMBIO CLIMÁTICO

MEMORIAS DEL EVENTO

Carchi - Ecuador
Junio 29 y 30

MEMORIAS DEL VII CONGRESO ECUATORIANO DE LA PAPA

29 y 30 de Junio de 2017.

Tulcán, Carchi, Ecuador.

500 ejemplares

Compilación y diseño:

José L. Pantoja, Ph.D., y Patricio Cuasapaz, Ing.

AGNLATAM S.A.

Editores:

Peter Kromann, Ph.D., Xavier Cuesta, Ph.D., Byron R. Montero, Ing. Agr.,

Patricio Cuasapaz, Ing., Antonio León-Reyes, Ph.D., Andrés Chulde, Ing. Agr.

Coordinador:

Peter Kromann, Ph.D.

Centro Internacional de la Papa – CIP.

Prólogo:

Mario Caviedes, Ph.D.

Director del Depto. de Ingeniería en Agroempresas.

Colegio de Ciencias e Ingenierías.

Universidad San Francisco de Quito.

Impreso en Ibarra.

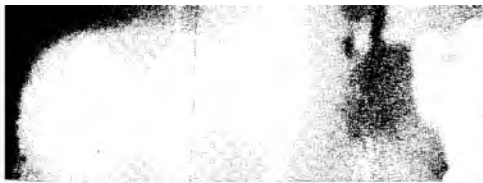
Junio de 2017.



ISBN- 978-9942-28-795-3

Fecha de catalogación: Junio de 2017

“Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales”.



Avances en el diagnóstico del agente causal del problema de punta morada en papa en Ecuador

Carmen Castillo¹, Johanna Buitrón¹, María Insuasti¹, Néstor Castillo¹, Jorge Rivadeneira¹ y Xavier Cuesta¹

¹ Inst. Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. Quito, Ecuador. E-mail: carmen.castillo@iniap.gob.ec

Palabras clave: Fitoplasma, Liberibacter.

Área temática: Protección vegetal. Póster.

INTRODUCCIÓN

Los síntomas de enrollamiento de las hojas, coloración púrpura o amarillamiento de las hojas, formación de tubérculos aéreos y senescencia temprana, se han observado en zonas paperas de la provincia ecuatoriana del Carchi desde el 2013 (INIAP 2014). Los agricultores estiman que este problema produjo pérdidas en rendimiento de más del 50% en la var. Superchola (INIAP 2014). De acuerdo a la literatura, estos síntomas podrían corresponder a punta morada de la papa (PMP) causada por fitoplasma (Caicedo et al., 2015) y reportada en varios países como Estados Unidos (Munyanza et al., 2006), México (Santos Cervantes et al., 2010), Colombia, Perú y Bolivia (Salazar, 2006; Hodgetts et al., 2009).

Estos síntomas también pueden corresponder a otra enfermedad llamada 'papa manchada' causada por *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso) que ha causado pérdidas millonarias en Estados Unidos y otros países (Munyanza et al., 2007). Hacia el sur de Centro América, no se han reportado la presencia de Lso, sin embargo, la difusión del patógeno ha llegado a Nueva Zelanda (Liefing et al., 2008).

La falta de información sobre este problema fitosanitario ha dificultado su manejo, incremento el uso de pesticidas y generado pérdidas económicas. En el 2015, el INIAP envió muestras para su análisis en Estados Unidos, México, Nueva Zelanda y Perú, los resultados del primer laboratorio fueron negativos para Lso y fitoplasma; del segundo, positivo para Lso y negativo para fitoplasma; del tercero negativo para Lso; y del cuarto laboratorio, negativo para fitoplasma. Ante estos resultados variados, INIAP probó algunas variantes en el manejo de las muestras desde el campo, nuevos primers y secuenciaciones más avanzadas de mayor nitidez.

MATERIALES Y MÉTODOS

La toma de muestras se hizo en Carchi (Feb. y Mar. 2016) y Pichincha (May. y Jun. 2016). Se procesaron muestras testigo de plantas de papa *in vitro*. Muestras de suelo se recolectaron en Cumbaltar.

Laboratorio convencional. Pruebas de ELISA y aislamientos en medios específicos *in vitro* para hongos y bacterias fueron efectuadas de tejidos vegetales de las plantas de papa con síntomas de punta morada. Muestras de suelo fueron estudiadas para la detección de nematodos fitófagos.

Laboratorio molecular. Las extracciones de ADN de las plantas se realizaron según Morillo y Miño (2011) utilizando como buffer de extracción CTAB. Se emplearon varias partes de la planta como peciolo, brotes de semilla, tubérculos aéreos y estolones, principalmente enfocados a los tejidos vasculares del floema. Se midió la cantidad de ADN en un espectrofotómetro y se corrieron PCRs para 16S (27F/1525R). Para corridas de PCR anidados, se utilizaron los juegos de primers reportados por varios autores para fitoplasma (Tabla 20)

Además se probaron diferentes concentraciones de ADN para primera y segunda PCR y gradientes de temperatura de los ciclos del secuenciador. Se utilizaron ADNs positivos de fitoplasma de papaya, palma y de testigo positivo para el “beet leafhopper-transmitted virescence agent” BLTVA donado por el USDA ARS del estado de Washington. También se evaluó, mediante PCR convencionales con primers OA1/OI2 específicos la detección de Lso (Liefting et al., 2008). Se utilizaron secuenciaciones tipo Sanger y GS-FLX para muestras seleccionadas.

Tabla 20. Lista de primers utilizados para la detección de fitoplasmas mediante PCR anidados.

Primer 1a PCR	Primer 2a PCR	Bases de pares esperadas
P1/P7	R16F2n/R16R2	1239
P1/P7	R16mF2/R16mR1	1450
P1/P7	P3/P7	350
P1/P7	T16end/Tint	200
R16mF2/R16mR1	R16F2n/R16R2	1239
P1/P7	fU5/rU3	800
P1/16S-SR	P1A/16S-SR	1650

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis convencionales. Pruebas ELISA mostraron la presencia de los virus PVY, PVX y PRLV en muestras con síntomas de punta morada en el campo. También se aislaron: *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Pectobacterium* sp. y *Pseudomonas viridiflava*. Todo este complejo de fitopatógenos puede estar causando algunos de los síntomas de punta morada en plantas de papa en el campo. Los análisis de suelo, determinaron la presencia de 1.2 larvas de *Globodera* sp. g⁻¹ de suelo, valor que sobrepasa el umbral de 1 larva g⁻¹ de suelo de un lote destinado para producción de semilla. En el campo también se observó el ataque de minadores de hoja (*Liriomyza* spp. y polillas) e infecciones de *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*.

Análisis moleculares. De 20 plantas muestreadas en campo se extrajeron más de 120 muestras de ADN. Se analizó el 17% del total de las muestras con primers orientados a la amplificación de ADN de fitoplasmas. Las pruebas de PCR realizadas resultaron con amplificaciones en regiones no esperadas o con la presencia de varias bandas de amplificación a diferentes pesos. Los ADNs testigos positivos amplificaron con ciertos primers, por ejemplo, el fitoplasma BLTVA no amplificó para los primers R16mR2/R16mR1 y R16F2n/R16R2 pero si amplificó para los primers P1/S6SSR en PCR convencional. Con estos últimos primers ninguna de las muestras reaccionó de forma positiva por lo que no presentaron bandas. Las variaciones de concentraciones de ADN para primera y segunda PCR y las gradientes de temperatura de los ciclos del secuenciador no demostraron mejora en la obtención de amplificaciones. Se analizó el 83% de las muestras para determinar la presencia o ausencia de Lso. Las 100 muestras de ADN corridas con los primers OA1/OI2 resultaron libres de Lso, bajo el tipo de metodología utilizada. De las 10 muestras seleccionadas y enviadas para secuenciación tipo Sanger, una resultó 100% idéntica a *Pseudomonas viridiflava* y otra muestra similar a *Candidatus Liberibacter* sp., en un 95%, las demás no presentaron fitoplasmas ni otros resultados claros. Los resultados de las secuenciaciones GS-FLX no determinaron fitopatógenos.

CONCLUSIONES

Estos nuevos patógenos emergentes no se diagnostican con facilidad porque no pueden cultivarse en medios artificiales *in vitro* y solo pueden detectarse mediante ciertas técnicas



moleculares. Las muestras analizadas no mostraron amplificaciones definidas para determinar fitoplasmas, pero si demostraron que Lso no está presente. Se recomienda seguir realizando análisis moleculares y secuenciaciones, y observaciones con microscopio electrónico para determinar el o los patógenos causantes de estos síntomas.

BIBLIOGRAFÍA

- Caicedo, J., M. Crizón, A. Pozo, A. Cevallos, L. Simbaña, L. Rivera, and V. Arahana. 2015. First report of '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' (16SrII) associated with potato purple top in San Gabriel, Carchi, Ecuador. *New Dis. Reports*. 32 p.
- Hodgetts J., C. Chuquillangui, G. Muller, Y. Arocha, D. Gamarra, O. Pinillos, E. Velit, P. Lozada, E. Boa, N. Boonham, R. Mumford, I. Barker, and M. Dickinson. 2009. Surveys reveal the occurrence of phytoplasmas in plants at different geographical locations in Perú. *Annals of Appl. Biol.* 155:15–27.
- Inst. Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. 2014. Informe Técnico Anual 2014. Fitoplasmas asociados a la punta morada de la papa en Ecuador. Programa Nacional de Raíces y Tubérculos, Rubro Papa. Quito, Ecuador. 81 p.
- Liefting, L., Z. Pérez-Egusquiza, G. Clover, and J. Anderson. 2008. A new '*Candidatus* Liberibacter' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92:1474–1474.
- Morillo, E., y G. Miño. 2011. Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de procedimientos y técnicas. Manual No. 91. Inst. Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. Quito, Ecuador. 121 p.
- Munyanza, J., J. Crosslin, and J. Upton. 2006. Beet leafhopper (Hemiptera: *Cicadellidae*) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. *J. of Ec. Entomol.* 99:268–272.
- Munyanza, J.E., Crosslin, J.M., and Upton, J.E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip,” a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *J. of Ec. Entomol.* 100:656–663.
- Salazar, L. F. 2006. Emerging and re-emerging potato diseases in the Andes. *Potato Res.* 49:43–47.
- Santos, C.M.E., Chávez, M.J.A., Acosta, P.J., Flores, Z.G.L., Mendez, L.J., and Leyva, L.N.E. 2010. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant Dis.* 94:388–395.