

Comportamiento espacial de Zebra chip y *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) en *Solanum tuberosum* L. en valles altos de México

Zebra chip spatial behavior and *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in *Solanum tuberosum* L. in valleys high of Mexico.

Alejandra Contreras-Rendón ¹, Ana Tarin Gutiérrez-Ibáñez ², Jesús Ricardo Sánchez-Pale ², Hilda Victoria Silva-Rojas ³, Antonio Laguna-Cerda ²

Originales: Recepción: 07/09/2015 - Aceptación: 07/04/2016

RESUMEN

En México la producción de papa es afectada por la enfermedad de Zebra chip causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* que es transmitida por el psílido *Bactericera cockerelli*. El objetivo de esta investigación fue determinar el comportamiento espacial de Zebra chip y *Bactericera cockerelli* mediante técnicas geoestadísticas y la detección de la bacteria aplicando técnicas moleculares. En el año 2013 se seleccionó dos parcelas comerciales de papa de la variedad Fianna; un total de 121 puntos fueron muestreados cada 10 m con el método de cuadrícula por parcela, georreferenciando cada planta. La incidencia de la enfermedad se determinó en campo sobre la base de los síntomas observados; la detección molecular de la bacteria se realizó con los iniciadores Lp Frag 1-25F/427R. La incidencia de la enfermedad en la parcela 1 fue de 30% y de 25% en la parcela 2; la bacteria se detectó en el 27% de las plantas sintomáticas y en el 14% de las asintomáticas. La distribución espacial de la enfermedad, el patógeno y el vector se presentó en forma agregada, ajustándose a los modelos gaussiano y esférico; en la parcela 2, los centros de agregación del estadio adulto y la bacteria presentaron la misma ubicación.

Palabras clave

Candidatus Liberibacter solanacearum • *Bactericera cockerelli* • agregación • krigado

-
- 1 Postgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Toluca, Estado de México, México. C. P. 50200.
 - 2 Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. atarini@uaemex.mx
 - 3 PREGEP-Producción de Semillas. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230.

ABSTRACT

In Mexico potato production is affected by the disease Zebra chip; which it caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter solanacearum* and is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli*. The objective of this research was to determine the spatial behavior of Zebra chip and *Bactericera cockerelli* with geostatistical techniques and bacterium detection using molecular techniques. In 2013 two commercial plots were selected cultivated with the variety Fianna; a total of 121 points were sampled every 10 m using the method of grid, in which each plant was georeferenced. The incidence of the disease was determined by the symptoms observed in the field; the molecular detection of bacterium was performed using Lp 1-25F Frag/427R primers. The disease incidence in plot 1 was 30% and 25% in plot 2; the bacterium was detected in 27% of plants where symptoms were presented and in 14% of asymptomatic ones. The spatial distribution of the disease, the pathogen and the vector was presented in an aggregated form, adjusting the gaussian and spherical model. In parcel 2, the aggregation centers of the adult stage and the bacterium showed the same location.

Keywords

Candidatus Liberibacter solanacearum • *Bactericera cockerelli* • aggregation • kriging

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en México representa una actividad importante dentro de la horticultura nacional. Los estados con mayor volumen de producción son Sonora, Sinaloa, Veracruz, Puebla, Nuevo León y el Estado de México (23).

La producción de papa en campos comerciales de México, Centroamérica, Estados Unidos y Nueva Zelanda, se ha visto severamente afectada debido a la presencia de la enfermedad de Zebra chip (Zc), que afecta el rendimiento y la calidad del tubérculo (13, 14, 16). Misma situación sucede con la enfermedad punta morada de papa asociada a fitoplasmas (9). Ambas enfermedades se equiparan al daño económico causado por Tizón tardío en el cultivo de papa (Andrade *et al.*, 2016).

Zc se ha asociado a la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*Ca. Liberibacter solanacearum*) (10, 13), transmitida por

el psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc) (4, 10, 17). Este psílido es una plaga primaria de la papa, chile (*Capsicum* spp.) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (16), determinando que su distribución es de forma agregada (5, 19) pero se desconoce actualmente el comportamiento espacial de *Ca. Liberibacter solanacearum*.

En este sentido, y considerando el comportamiento espacial, cobra particular importancia desarrollar estrategias de manejo eficientes para el control de la enfermedad y su vector.

Objetivo

Determinar el comportamiento espacial de Zc y *B. cockerelli* aplicando técnicas geoestadísticas, así como la detección *Ca. Liberibacter solanacearum* mediante el empleo de técnicas moleculares en valles altos de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon dos parcelas comerciales de 1 hectárea cada una cultivadas con la variedad de papa Fianna, ubicadas en el municipio de San José del Rincón, Estado de México.

El muestreo se llevó a cabo durante el ciclo primavera verano 2013, a los 100 días posteriores a la siembra, cuando la papa se encontraba en la etapa fenológica de tuberización.

Se realizó una cuadrícula de 100 m por cada lado, tomando un punto de muestreo cada 10 m, totalizando 121 puntos; cada punto correspondió a una planta que fue georreferenciada mediante un sistema de posicionamiento global (GPS) (Modelo MAP 78s, GARMIN®, Olathe, KS).

En los estratos medio y bajo de la planta se contabilizó la presencia del psílido *B. cockerelli* en sus estadios de huevo, ninfa y adulto.

Los adultos se capturaron con una red entomológica. Se colectó foliolos de la planta para la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas en el laboratorio.

La severidad de la enfermedad se evaluó mediante una escala diagramática conformada por 6 niveles, sobre la base de los síntomas observados, a saber: 1 (planta sana, sin síntomas visibles), 2 (planta con enchinamiento o enrulamiento en las hojas), 3 (planta con síntoma de enchinamiento y amarillamiento en las hojas superiores), 4 (planta con síntomas de enchinamiento, amarillamiento y tallo aplanado), 5 (planta con síntomas de enchinamiento, amarillamiento, tallo aplanado y tubérculo aéreo), 6 (planta con síntomas de coloración púrpura en las hojas apicales).

La incidencia de la enfermedad se determinó con base en los síntomas observados en campo.

La incidencia del patógeno se realizó considerando los resultados positivos a *Ca. Liberibacter solanacearum* en el laboratorio. La concentración de la bacteria de cada una de las muestras se determinó por espectrofotometría (NanoDrop 2000 Thermo Scientific®, Waltham, MA) y se estableció una escala de cuatro niveles: 0 (ausencia de bacteria), 1 (50 a 150 ng μ l), 2 (150 a 250 ng μ l) y 3 (mayor a 250 ng μ l).

La extracción de ADN se realizó en las nervaduras principales de hojas sintomáticas y asintomáticas, por el método de CTAB al 2% (7).

La concentración y calidad de DNA se midió con el espectrofotómetro. Para la detección por PCR de *Ca. Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas, las muestras fueron diluidas a 20 ng μ l.

La mezcla para PCR consistió en: 100 ng de DNA, 0,8 mM of dNTPs, 2 unidades de Platinum *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1x Platinum *Taq* DNA polimerasa buffer y 20 pmol en un volumen final de 20 μ l. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador C100 Touch (BIO-RAD, USA), los productos obtenidos se verificaron en un gel de agarosa al 1,5% teñido con GelRed™ (Biotium, Alameda, CA) y las bandas se visualizaron en un transluminador (Infinity-3026 WL/LC/26MX Vilber Lourmat®, Eberhardzell, Germany).

Para la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* se utilizaron los iniciadores Lp Frag 1-(25F) y Lp Frag 1-(427R); las condiciones de amplificación consistieron en: 1 ciclo a 98°C por 30 s, seguido de 35 ciclos a 98°C por 10 s, a 60°C por 30 s, a 72°C por 1,5 min y un ciclo adicional de extensión a 72°C por 10 min (10).

La PCR para fitoplasmas se realizó con los iniciadores P1/P7 (6, 24), seguido de un PCR anidado con los iniciadores R16F2n/R16R2 (8).

Las condiciones de amplificación se realizaron como lo describen Gutiérrez-Ibáñez *et al.* (2012).

El análisis geoestadístico se realizó con la estimación del semivariograma de los datos obtenidos en los puntos de muestreo para los estadios huevo, ninfa y adulto de *B. cockerelli*, así como de los valores de severidad de la enfermedad y de presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum*. El valor experimental del semivariograma se calculó siguiendo el método de Isaaks y Srivastava (1989):

$$\gamma^*(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} \left[\left[z(x_i) + h \right] - z(x_i) \right]$$

donde:

$\gamma^*(h)$ = valor experimental del semivariograma para el intervalo de distancia h .

$N(h)$ = número de pares de puntos muestrales separados por el intervalo de distancia h .

$z(x_i)$ = valor de la variable de interés en el punto muestral.

$z(x_i+h)$ = valor de la variable de interés en el punto muestral x_i+h .

A este semivariograma se le denomina experimental y se ajustó a un semivariograma teórico preestablecido. El semivariograma experimental se obtuvo a través del programa VarioWin 2.2 (Software for Spatial Data Analysis in 2D. Spring, NY).

Para determinar la relación entre los datos obtenidos en los muestreos se calculó el nivel de dependencia espacial que se obtuvo al dividir el efecto pepita y la meseta, expresando el resultado en porcentaje, a saber: menor a 25% es alto; entre 26 y 75% moderado y mayor a 76% bajo (15).

Para la elaboración de los mapas de densidad se utilizó el krigeado que permite estimar los valores insesgados a puntos que no fueron muestreados, para visualizar el comportamiento espacial de *B. cockerelli* en sus tres estadios, la severidad de la enfermedad y la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* en las parcelas analizadas.

Las estimaciones de las densidades por parcela se realizaron con el programa Surfer 8.0. (Surface Mapping System, Golden Software Inc. 809, 14th Street Golden, CO).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de la enfermedad en campo para la parcela 1 fue de 30%, mientras que en la parcela 2 fue de 25%, la severidad media de la enfermedad fue similar en ambas parcelas, sin embargo la mayor población del insecto en sus tres estadios se presentó en la parcela 2.

De las 121 muestras analizadas se detectó *Ca. Liberibacter solanacearum* en 36 plantas sintomáticas y 18 plantas asintomáticas en la parcela 1, y en la parcela 2 se detectó la bacteria en 30 plantas sintomáticas y 15 asintomáticas. Estos resultados concuerdan con Pitman *et al.* (2012), quienes reportaron el 13% de plantas asintomáticas con presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* y que el tubérculo-semilla de plantas aparentemente sanas pueden portar la bacteria. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de fitoplasmas en la hoja, contrario a lo reportado por Rubio-Covarrubias *et al.* (2011), quienes reportan 29% de plantas de papa positivas a fitoplasmas asociado con el manchado del tubérculo en el Estado de México, (figura 1, pág. 179).

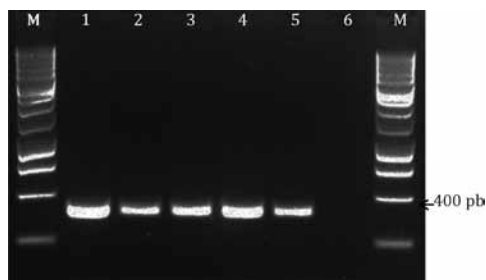


Figura 1. Electroferesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con los iniciadores LpFrag1-25F/427R. Marcador (M) 1kb DNA ladder (PROMEGA Madison, Wi, USA). Línea 1 a 3 plantas sintomáticas, línea 4 y 5 plantas asintomáticas, línea 6 agua, control negativo.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained with primer pair pFrag1-25F/427R primer. Marker (M) 1 kb DNA ladder (Promega Madison, WI, USA). Lanes 1-3 symptomatic plants, lanes 4 and 5 asymptomatic plants, lane 6 water, negative control.

El análisis geoestadístico indicó que las poblaciones del psílido, la severidad de la enfermedad y la bacteria presentaron una distribución espacial de tipo agregada en las dos parcelas evaluadas, así como un alto nivel de dependencia espacial y un efecto pepita igual a cero, lo que indica que el error de muestreo fue mínimo y que la escala de muestreo utilizada fue la adecuada (21).

Los rangos del semivariograma en la parcela 1 fueron de 9,35 m para huevo y severidad de la enfermedad, para ninfa y adulto de 9,73 m y 5,33 m para *Ca. Liberibacter solanacearum*.

En la parcela 2 el rango para huevo fue 7,20 m, para ninfa 19,44 m, adulto 8,64 m, severidad de la enfermedad 3,90 m y *Ca. Liberibacter solanacearum* 4,89 m.

En la parcela 1 se determinó un ajuste al modelo gaussiano en los tres estadios del vector y *Ca. Liberibacter solanacearum*, lo cual es indicativo de que el comportamiento espacial se expresó en forma continua dentro de la parcela y avanza a plantas vecinas, concordando con lo reportado por Ramirez- Dávila y Figueroa- Figueroa (2013).

Por otro lado, el modelo esférico explicó el comportamiento espacial de la severidad de la enfermedad, expresándose en puntos específicos dentro de la parcela.

En la parcela 2, el modelo esférico describió la distribución espacial del adulto y la bacteria, indicativo que se expresan en centros de agregación, pero en ciertos puntos específicos dentro de la parcela.

El modelo Gaussiano describió el comportamiento de los estadios huevo, ninfa de *B. cockerelli*, así como la severidad de la enfermedad, que indica que presentaron una agregación de forma continua dentro de la parcela (tabla 1, pág. 180).

Los mapas de krigeado indicaron que los centros de agregación del adulto presentaron puntos similares de agregación a los observados en *Ca. Liberibacter solanacearum* en las parcelas 1 y 2.

Se observó que las plantas asintomáticas se agregan en el mismo punto donde se ubicaron los centros de agregación del adulto; lo anterior concuerda con lo indicado por Bové (2006), quien menciona que el psílido es el principal vector de este patógeno.

Paralelamente también se observó una similitud en la ubicación de los puntos de agregación del estadio adulto del insecto con los centros de agregación de plantas con la bacteria, sin expresar síntomas, mientras que la presencia de la bacteria en ubicaciones con ausencia del adulto mostró infecciones previas al muestreo.

Tabla 1. Parámetros (efecto pepita, meseta y rango) de los modelos ajustados a los semivariogramas obtenidos para huevos, ninfas y adultos de *Bactericera cockerelli* (Sulc), severidad de la enfermedad y presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en papa.

Table 1. Parameters (nugget, sill and range) of the models fitted to the semivariograms obtained in eggs, nymphs and adults of *Bactericera cockerelli* (Sulc), severity of disease and the presence of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in potato.

Variable	μ	Modelo	Efecto Pepita	Meseta	Rango (m)	Pepita/Meseta (%)	Nivel de dependencia
Parcela 1							
Huevo	1,04	Gaussiano	0	0,08	9,35	0	Alta
Ninfa	1,15	Gaussiano	0	0,11	9,73	0	Alta
Adulto	0,75	Gaussiano	0	0,07	9,73	0	Alta
Severidad	1,54	Esférico	0	0,02	9,35	0	Alta
Ca. L. so		Gaussiano	0	0,58	5,33	0	Alta
Parcela 2							
Huevo	3,70	Gaussiano	0	0,20	7,20	0	Alta
Ninfa	4,20	Gaussiano	0	25,20	19,44	0	Alta
Adulto	0,64	Esférico	0	0,05	8,64	0	Alta
Severidad	1,93	Gaussiano	0	0,03	3,90	0	Alta
Ca L so		Esférico	0	0,36	4,89	0	Alta

Las plantas asintomáticas pueden ser indicativas del período de incubación de la enfermedad que concuerda con lo expresado por Levy *et al.* (2011), quienes señalan que detectaron *Ca. Liberibacter solanacearum* en plantas de papa dos a tres semanas después de que las plantas fueron expuestas al psílido infectados con la bacteria.

En los mapas de severidad de la enfermedad se observó que los centros de agregación se ubicaron en la región suroeste de la parcela 1, mientras *Ca. Liberibacter solanacearum* se agregó en la región este de la parcela, con puntos específicos hacia la región suroeste. La ninfa y el adulto se agregaron en la región noreste y sur de la parcela mientras que el huevo se agregó en la región oeste de la misma, (figura 2, pág. 181).

En la parcela 2 los centros de agregación de huevo, ninfa y severidad presentaron un comportamiento espacial similar, ubicándose en el suroeste y noreste de la parcela, pero no se determinó su presencia en la parte central.

Mientras que para el adulto y la bacteria sus centros de agregación se distribuyeron en la parte noroeste con tendencia hacia el centro de la parcela.

En términos espaciales se observó una similitud en la ubicación dentro de la parcela 2 entre adulto y la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum*. Lo que coincide con Buchman *et al.* (2011), quienes demostraron que el adulto de *B. cockerelli* fue un vector altamente eficiente de *Ca. Liberibacter solanacearum*, (figura 3, pág. 182).

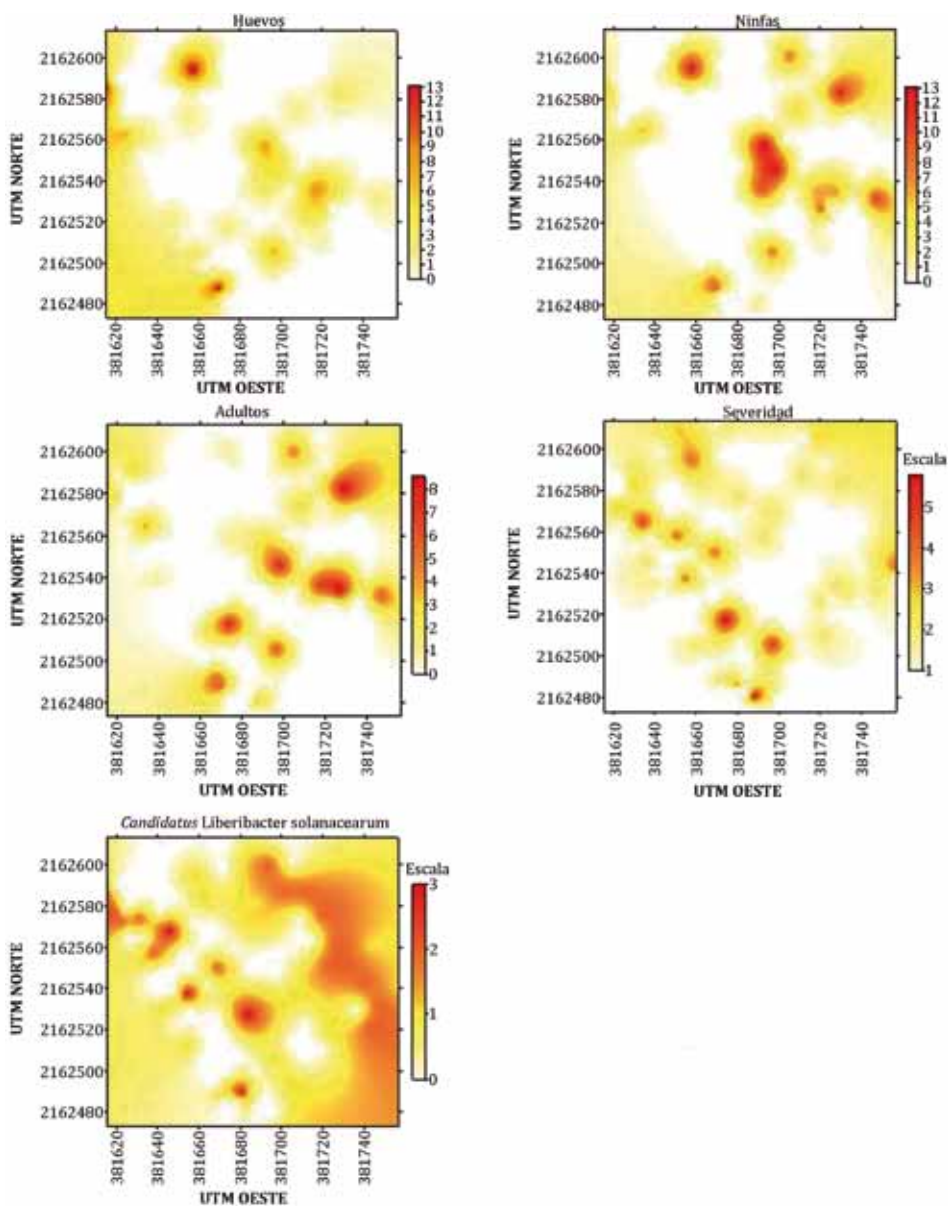


Figura 2. Mapas de densidad de huevos, ninfas y adultos de *Bactericera cockerelli*, severidad de la enfermedad y *Candidatus Liberibacter solanacearum*, en la parcela 1 de papa.

Figure 2. Density maps of eggs, nymphs and adults of *Bactericera cockerelli*, severity of disease and *Candidatus Liberibacter solanacearum* in potato plot 1.

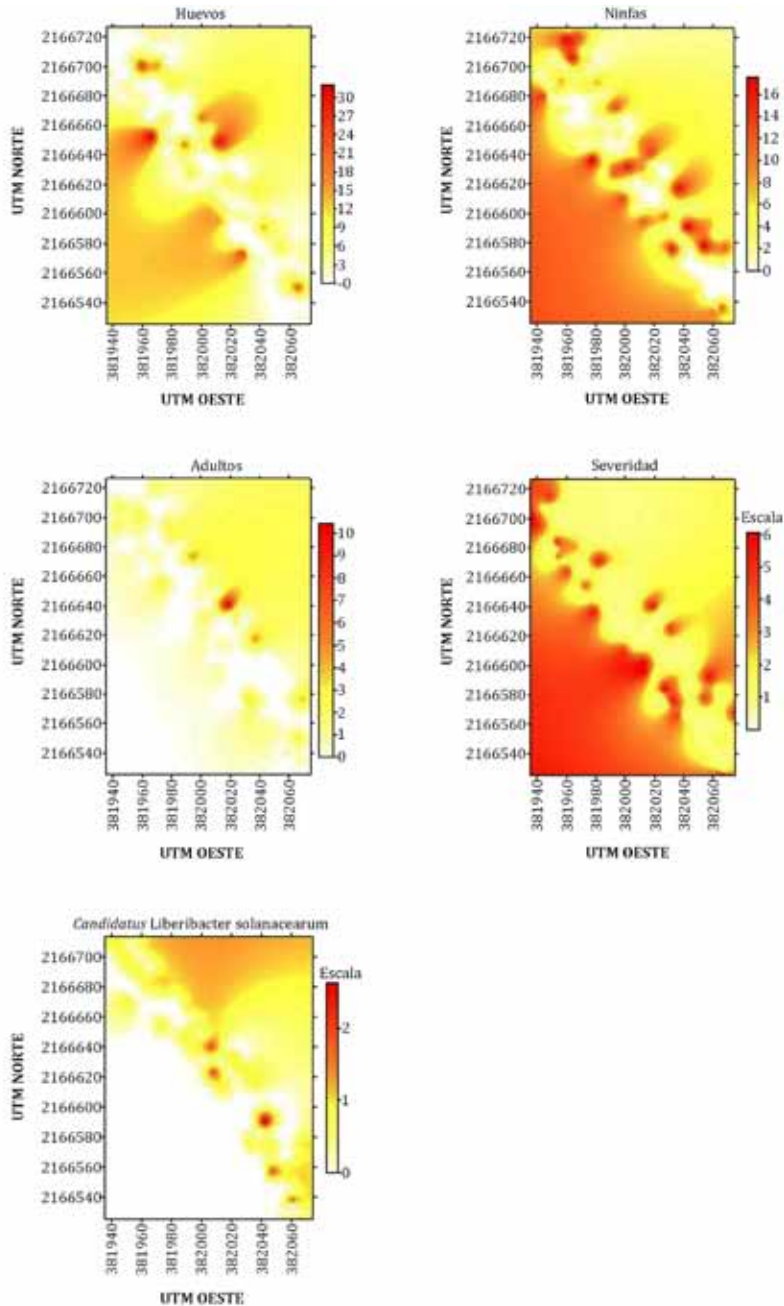


Figura 3. Mapas de densidad de huevos, ninfas y adultos de *Bactericera cockerelli*, severidad de la enfermedad y *Candidatus Liberibacter solanacearum*, en la parcela 2 de papa.

Figure 3. Density maps of eggs, nymphs and adults of *Bactericera cockerelli*, severity of disease and *Candidatus Liberibacter solanacearum* in potato plot 2.

CONCLUSIONES

La distribución espacial de la enfermedad, el patógeno y el vector se presentó en forma agregada.

En la parcela 2 los centros de agregación del estadio adulto y la bacteria presentaron la misma ubicación.

La bacteria se detectó en el 27% de plantas sintomáticas y 14% de asintomáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade, A. J.; Capezio, S. B.; Huarte, M. A. 2016. Caracterización de progenitores de papa en base a aptitud combinatoria y heterosis para la búsqueda de resistencia a *Phytophthora infestans*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 48(1): 9-20.
2. Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology. 88: 7-37.
3. Buchman, J. L.; Heilman, B. E.; Munyaneza, J. E. 2011. Effects of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) density on zebra chip potato disease incidence, potato yield, and tuber processing quality. Journal of Economic Entomology. 104: 1783-1792.
4. Buchman, J. L.; Sengoda, V. G.; Munyaneza, J. E. 2011. Vector transmission efficiency of *Liberibacter* by *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in zebra chip potato disease: effects of phyllid life stage and inoculation access period. Journal Economic Entomology. 104: 148-1495.
5. Butler, C. D.; Trumble, J. T. 2012. Spatial dispersion and binomial sequential sampling for the potato psyllid (Hemiptera: Triozidae) on potato. Pest Management Science. 68: 865-869.
6. Deng, S.; Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiological Methods. 14: 53-61.
7. Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
8. Gundersen, D. E.; Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assay using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea. 35: 144-151.
9. Gutiérrez-Ibañez, A. T.; Laguna-Cerda, A.; Rojas-Martínez, R.; González-Garza, R.; Salgado-Siclán, M. L. 2012. Molecular detection and classification of the phytoplasma that causes purple top in potatoes (*Solanum tuberosum*) in the State of México. Ciencia e Investigación Agraria. 39: 339-346.
10. Hansen, A. K.; Trumble, J. T.; Stouthame, R.; Paine, T. D. 2008. A new huanglongbing species, '*Candidatus Liberibacter phyllaurous*,' found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Applied Environmental Microbiology. 74: 5862-5865.
11. Isaaks E. H.; Srivastava, R. M. 1989. An Introduction to Applied Geostatistics. Oxford University Press. New York. 561 p.
12. Levy, J.; Ravindran, A.; Gross, D.; Tamborindeguy, C.; Pierson, E. 2011. Translocation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the Zebra Chip pathogen, in potato and tomato. Phytopathology. 101: 1285-1291.
13. Liefting, L. W.; Rez-Egusquiza, 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.
14. Liefting, L. W.; Sutherland, P. W.; Ward, L. I.; Paice, K. L.; Weir, B. S.; Clover, G. R. G. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of Solanaceous crops. Plant Disease. 93: 208-214.

15. López-Granados, F.; Jurado-Expósito, M.; Atenciano, S.; García-Ferrer, A.; Sánchez, M.; García-Torres, L. 2002. Spatial variability of agricultural soil parameters in southern Spain. *Plant and Soil*. 246: 97-105.
16. Munyaneza, J. E. 2012. Zebra chip disease of potato: Biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research*. 89: 329-350.
17. 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 Mexico. *Journal Economic Entomology*. 100: 656-663.
18. Pitman, A. R.; Drayton, G. M.; Kraberger, S. J.; Genet, R. A.; Scott, I. A. W. 2011. Tuber transmission of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" and its association with zebra chip on potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*. 129: 389-398.
19. Prager, S. M.; Butler, C. D.; Trumble, J. T. 2013. A sequential binomial sampling plan for potato psyllid (Hemiptera: Trioziidae) on bell pepper (*Capsicum annuum*). *Pest Management Science*. 69: 1131-1135.
20. Ramírez-Dávila, J. F.; Figueroa-Figueroa, D. K. 2013. Modelización y mapeo de la distribución espacial de *Bactericera cockerelli* Sulc (Hemiptera: Trioziidae) en papa en el Estado de México. *Centro Agrícola*. 40: 57-70.
21. Rossi, R.; Mulla, J.; Journel, G.; Franz, E. 1992. Geostatistical tools for modeling and interpreting ecological spatial dependence. *Ecological Monographs*. 62: 277-314.
22. Rubio-Covarrubias, O. A., Almeyda-León, I. H.; Cadena-Hinojosa, M. A.; Lobato-Sánchez, R. 2011. Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter phyllaurous* en lotes comerciales de papa. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*. 2: 17-28.
23. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Anuario estadístico de la producción agrícola en México. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx> (fecha de consulta: 22/04/2015).
24. Smart, C. D.; Schneider, B.; Blomquist, C. L.; Guerra, L. J.; Harrison, N. A.; Ahrens, U. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2988-2993.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo a través de la beca de doctorado.