

Epidemiología de la enfermedad Zebra Chip de la patata en Castilla y León (España)

Yolanda Santiago Calvo

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia*

Orientado por

Doutora Maria del Carmen Sánchez-Manzanera

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Bragança

2021



Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto:
“Epidemiología de la enfermedad “zebra chip” de la patata en España, situación en las principales zonas productoras y riesgos vinculados a otras solanáceas” financiado con cargo al Plan Estatal de I+D+I 2013-2016 en el *Reto de la Seguridad y Calidad Alimentaria, Actividad Agraria Productiva y Sostenible, Sostenibilidad de los Recursos Naturales e Investigación Marina y Marítima*, del Ministerio de Economía y Competitividad.

Agradecimientos

Llegar al final, en cualquier trabajo, siempre es una labor colectiva, con un gran equipo detrás y un apoyo constante. Por ello, no quiero olvidarme de ninguna de las personas que han contribuido en este estudio.

En primer lugar, quería dar las gracias a Mari Carmen Asensio Sánchez-Manzanera, amiga y compañera de luchas laborales diarias, por dirigirme en la elaboración de este documento, realizado en equipo y que forma parte de nuestro trabajo de estos últimos años.

A José Alberto Pereira, por su ayuda para embarcarme en esta tarea de estudiar el Máster de Agroecología, y por su ánimo y por su disposición incondicional prestados en todo momento.

A todos mis compañeros del ITACyL que han trabajado en este proyecto: Rubén, David, Elena, y principalmente a Diego Flores Pérez, por ser tan profesional en todo lo que hace y porque este trabajo no habría sido posible sin su trabajo constante.

A todos los participantes y colaboradores del proyecto: José Luis Palomo, del Centro de Diagnóstico Regional de la Junta de Castilla y León, personal del ICA-CSIC de Madrid y al personal del ICIA de Canarias.

A Felipe Siverio y Estrella Hernández, por su gran profesionalidad y por ser mejores personas. Desde aquí mi deseo en poder colaborar en futuras ocasiones, fue un placer aprender de ellos.

A Baudilio Herrero, por su disponibilidad e incondicionalidad absoluta. Es un placer contar siempre con él, por su profesionalidad y por hacer de los viajes toda una experiencia.

Y, por último, a mi familia, por confiar en mí y apoyarme, especialmente a Diego, a César y a Inés. Solo espero sabérselo agradecer lo suficiente.

Resumen

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) es una bacteria gram-negativa, vascular, limitada al floema de la planta, ampliamente distribuida en diferentes cultivos de las familias *Apiaceae* spp. y *Solanaceae* spp, transmitida por psílidos (Hemiptera: Triozidae) y de la que se han descrito hasta 10 haplotipos. En patata es responsable de la enfermedad conocida como Zebra Chip (ZC), problema de gran importancia en este cultivo en aquellas zonas donde el psílido *Bactericera cockerelli* (Sulc) está ampliamente distribuido. En el año 2013 se detectó la presencia de Lso en tubérculos de patata en Castilla y León, sin embargo, aún no se ha detectado la enfermedad en condiciones de cultivo, desconociéndose distintos aspectos de la etiología y epidemiología.

Con el objetivo principal de conocer qué importancia tiene ZC en el cultivo de patata de Castilla y León, a través de la identificación de los psílidos vectores, estudiando su abundancia, momentos de aparición en el cultivo y su riesgo de transmisión; la detección del patógeno e identificación de sus síntomas en planta y en tubérculo; el estudio etiológico con la búsqueda de la bacteria en posibles plantas huéspedes y el potencial de transmisión de tubérculo a planta, se realizaron muestreos ocasionales y periódicos en las zonas productoras de patata de siembra y de consumo de Castilla y León y se estableció un ensayo en la localidad de Zamadueñas (Valladolid) durante los años 2016, 2017 y 2018.

La especie de psílido mayormente encontrada tanto en los muestreos periódicos como ocasionales con todos los métodos de monitoreo realizados fue *Bactericera nigricornis* Förster, con unos niveles de capturas bajos, que se produjeron principalmente entre los meses de junio y agosto. El porcentaje de *B. nigricornis* portadores de Lso encontrado fue del 3,01 % en los muestreos periódicos y del 2% en los muestreos ocasionales. El pico poblacional máximo fue de 0,73 insectos/manguero en 2018 en Zamadueñas, donde se pudo constatar que *B. nigricornis* era capaz de completar ciclo en este cultivo.

En los muestreos ocasionales realizados en parcelas convencionales de patata y distribuidos en parcelas de patata de la región, solo se detectó Lso en siete plantas, seis de ellas con síntomas de tubérculos aéreos y una planta sin síntomas y en nueve plantas con síntomas muy inespecíficos en las plantas monitoreadas del ensayo realizado en la localidad de Zamadueñas. En los tubérculos, el porcentaje de Lso nunca fue superior al 2%, no encontrando diferencias significativas entre las variedades estudiadas.

Con el nivel de plantas e insectos portadores de la bacteria encontrado, no parece que ZC sea un problema grave en Castilla y León, sin embargo, es suficiente para encontrar la bacteria en

los tubérculos, pero no es fácil detectar la bacteria en las plantas. A pesar de eso, los porcentajes de tubérculos afectados no suponen una pérdida importante de la cosecha.

No se encontró la bacteria en el análisis de las plantas silvestres próximas al cultivo de la patata en la zona de siembra, lo que parece indicar que la transmisión proviene de zonas donde la zanahoria comparte espacio con la patata y donde *B. nigricornis* podría adquirir la bacteria, teniendo en cuenta el riesgo limitado de transmisión en patata de *Bactericera trigonica*. El riesgo de transmisión de planta a tubérculo no parece ser importante, ya que más de la mitad de los tubérculos de plantas positivas eran no viables.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), *Bactericera* spp., vector, planta, tubérculo, siembra, consumo, monitoreo, síntomas, transmisión.

Abstract

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) is Gram-negative and vascular bacteria that live as phloem-limited obligate parasites in plants, widely distributed in *Apiaceae* and *Solanaceae* spp., transmitted by psyllids (Hemiptera: Triozidae) and with 10 haplotypes described. Lso is responsible for the transmission of Zebra Chip (ZC) disease, considered a problem in potato culture areas where *Bactericera cockerelli* (Sulc) is widely distributed. Lso were detected in potato tubers in Castilla y León in 2013, although, symptoms of the disease have not been detected yet in potato plants, and aspects about its etiology and epidemiology remains unknown.

With the main objective to know what is the importance of ZC in potato culture of Castilla y León, by the identification of vectors psyllids, studying their abundance and appearance relative to the emergence of the crop and risk of transmission; pathogen detection and symptoms identification in plants and tubers; the etiology study with bacteria detection in host plants and the potential for transmission of plant to tuber, occasional and regular surveys were carried in cultivated area of seed and consumption potatoes of Castilla y León and a trial field was conducted in the locality of Zamadueñas (Valladolid) during 2016, 2017 and 2018.

The psyllid species found more frequently but very scarce in occasional and regular surveys monitored of all sampling methods was *B. nigricornis*, appearing more frequently during the months of June to August. The percentage of *B. nigricornis* positive to Lso was 3.01 % in regular surveys and 2% in occasional surveys. The maximum peak was 0.73 insects by sweep in 2018 in Zamadueñas, where *B. nigricornis* was able to complete the hole life cycle on potato.

Only seven positive plants were detected in occasional surveys conducted in the cultivated areas of potato of the region, six of them with aerial tubers and another one without symptoms. Nine plants with unspecific symptoms was positive to Lso in the field trial located in Zamadueñas. The percentage of Lso in tubers was lower than 2 %, with no significative differences between the cultivars of potato studied.

Considering the level of positive plants and psyllids founded, ZC does not seem to be a serious problem in Castilla y León, however, this level is enough to detect the bacteria in tubers, but it is not easy to detect Lso in plants. Despite this, the percentage of affected tubers does not cause losses at harvest.

The bacteria were not detected in the analysis in wild plants close to seed potato fields, indicating that the risk of transmission of Lso originates from carrot fields close to potato

where *B. nigricornis* was able to acquire the bacteria, considering that the transmission from carrot to potato by *Bactericera trigonica* seems to be very limited. The potential of transmission to plant to tuber was low, more than half tubers from positive plants were not viable.

Key words: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), *Bactericera* spp., vector, plant, tuber, seed, consumption, monitoring, symptoms, transmission.

Índice general

Agradecimientos	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	v
Índice general.....	vii
Índice de figuras.....	xi
Índice de tablas	xiii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Introducción general.....	1
1.1.1. Origen, importancia y cultivo de la patata.	1
1.1.2. Producción de la patata en el mundo, Europa y España.	3
1.1.3. La patata en Castilla y León.....	3
1.1.4. Principales plagas y enfermedades del cultivo de la patata.	4
1.1.5. Problemas emergentes del cultivo de la patata.	10
1.2. “Zebra Chip” en el cultivo de la patata	11
1.2.1. Importancia económica de Zebra Chip (ZC) en el cultivo de la patata	11
1.2.2. <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (Lso).....	11
1.2.3. Sintomatología de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en patata, “Zebra Chip”, en otras Solanáceas y en Apiáceas.	13
1.2.4. Los psílidos, familia <i>Psyllidae</i> (Hemiptera: Triozidae).....	14
1.2.5. Principales especies de psílidos transmisoras de patógenos en plantas cultivadas.	16
1.2.6. Transmisión de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> por psílidos (Hemiptera: Triozidae).....	17
1.2.7. Haplotipos de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> y su relación con los psílidos vectores.....	18
1.2.8. Medidas de control de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	19

1.2.9. <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en la Península Ibérica y en Canarias. ..	21
1.3. Justificación y objetivos.	22
Capítulo 2: Distribución de Zebra Chip en el cultivo de la patata de Castilla y León.....	24
Resumen.....	24
2.1. Introducción	25
2.2. Objetivos	27
2.3. Material y métodos.....	28
2.3.1. Localización de los muestreos ocasionales.....	28
2.3.2. Recolección del material vegetal en campo.....	29
2.3.3. Muestreo de los psílidos asociados al cultivo de la patata y plantas silvestres....	29
2.3.4. Extracción del ADN y detección de Lso en los insectos y material vegetal recogido.....	29
2.4. Resultados	30
2.4.1. Inspección visual de ZC y análisis de Lso en planta de las principales zonas productoras de patata de Castilla y León	30
2.4.2. Resultados de la evaluación de plantas silvestres	31
2.4.3. Identificación, abundancia y determinación de la bacteria Lso de las especies de psílidos asociadas al cultivo de la patata en Castilla y León	32
2.5. Discusión.....	35
2.6. Conclusiones	37
Capítulo 3: Dinámica poblacional de los psílidos presentes en el cultivo de la patata de Castilla y León	38
Resumen.....	38
3.1. Introducción	39
3.2. Objetivos	41
3.3. Material y métodos.....	42
3.3.1. Localización de las parcelas de patata para el monitoreo de psílidos.....	42
3.3.2. Estudio de la dinámica poblacional de psílidos mediante el uso de trampas adhesivas amarillas.	42
3.3.3. Estudio de la dinámica poblacional de psílidos mediante el uso de trampas Irwin.	43

3.3.4. Estudio de la dinámica poblacional de psílidos mediante el empleo de manga entomológica.....	43
3.3.5. Estudio de la presencia de las formas inmaduras de psílidos en la planta.....	44
3.3.6. Evaluación de la distribución de las formas inmaduras dentro de la planta.....	44
3.3.7. Extracción de ADN en psílidos y detección de Lso.....	45
3.4. Resultados.....	45
3.3.1. Dinámica poblacional de psílidos mediante el uso de trampas adhesivas amarillas.....	45
3.3.2. Dinámica poblacional de psílidos mediante el uso de trampas Irwin.....	46
3.3.3. Dinámica poblacional de psílidos mediante el empleo de manga entomológica.....	47
3.3.4. Presencia de las formas inmaduras de psílidos en la planta.....	49
3.3.5. Evaluación de la distribución de las formas inmaduras dentro de la planta.....	50
3.3.6. Detección de Lso en los insectos capturados.....	50
3.4. Discusión.....	51
3.5. Conclusiones.....	55
Capítulo 4: Estudio de Zebra Chip (ZC) en las plantas y tubérculos de patata en Castilla y León.....	56
Resumen.....	56
4.1. Introducción.....	57
4.2. Objetivos.....	60
4.3. Material y métodos.....	60
4.3.1. Localización y establecimiento del ensayo.....	60
4.3.2. Evaluación de los síntomas de ZC en planta.....	62
4.3.3. Análisis de plantas sintomáticas y sin síntomas para la detección de Lso.....	62
4.3.4. Análisis de tubérculos para la detección de Lso.....	62
4.3.5. Extracción de ADN de muestras vegetales: plantas y tubérculos y detección de Lso.....	62
4.4. Resultados.....	63
4.4.1. Estudio del porcentaje de germinación de los tubérculos.....	63
4.4.2. Evaluación de los síntomas de ZC en planta.....	63

4.4.3. Análisis de Lso en plantas sintomáticas y sin síntomas.....	64
4.4.4. Análisis de tubérculos sintomáticos para ZC.....	66
4.4.5. Análisis de los tubérculos de plantas positivas.....	69
4.5. Discusión.....	70
4.6. Conclusiones	73
Capítulo 5: Conclusiones	74
Capítulo 6: Referencias bibliográficas.....	76

Índice de figuras

Figura 1.1. Planta de patata en floración.....	2
Figura 1.2. Presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> a nivel mundial (EPPO, 2021).....	12
Figura 1.3. Células infectadas por Lso y células sanas del floema de apio. Proyecto Ponte (https://www.ponteproject.eu/).....	12
Figura 1.4. Síntomas de ZC en tubérculos de patata (EPPO) y síntomas de tubérculos aéreos en plantas de patata.....	14
Figura 1.5. Huevos, ninfas y adultos de <i>Bactericera cockerelli</i> (EPPO).....	17
Figura 1.6. Distribución de los haplotipos de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en Europa y en el Mediterráneo. Proyecto Ponte (https://www.ponteproject.eu/).....	19
Figura 2.1. Distribución mundial de <i>B. nigricornis</i> (Ouvrard, D. 2021. Psyllist - The World Psylloidea Database. (http://www.hemiptera-databases.com/psyllist - acceso 26 julio de 2021 doi:10.5519/0029634).....	27
Figura 2.2. Localización de las parcelas prospectadas durante los años 2016 (cruces de color morado), 2017 (asteriscos de color verde) y 2018 (símbolo de suma azul) en la comunidad de Castilla y León.....	28
Figura 3.1. Formas inmaduras de <i>Bactericera trigonica</i> : huevo y estadios ninfales: ninfas N1, N2, N3, N4 y N5 (ICIA).....	41
Figura 3.2. Trampa adhesiva amarilla.....	42
Figura 3.3. Trampa de agua horizontal de color verde (trampa Irwin).....	43
Figura 3.4. Muestreo mediante manga entomológica en campo.....	44
Figura 3.5. Extracción de ADN de los psílidos capturados.....	45
Figura 3.6. Promedio de insectos capturados en las trampas amarillas de las localidades de Zamadueñas (Valladolid) y Gomezserracín (Segovia) en el año 2016.....	46
Figura 3.7. Número de insectos capturados en la trampa Irwin por fecha en la localidad de Zamadueñas (Valladolid) en 2017.....	46
Figura 3.8. Promedio de insectos capturados por muestreo de <i>B. trigonica</i> y <i>B. nigricornis</i> en los muestreos periódicos realizados en Gomezserracín (Segovia) en 2016.....	47
Figura 3.9. Promedio de insectos capturados por muestreo de <i>B. trigonica</i> y <i>B. nigricornis</i> en los muestreos periódicos realizados en Zamadueñas (Valladolid) en 2016.....	48
Figura 3.10. Promedio de insectos capturados por muestreo de <i>B. trigonica</i> y <i>B. nigricornis</i> en los muestreos periódicos realizados en Zamadueñas (Valladolid) en 2017.....	48

Figura 3.11. Promedio de insectos capturados por manguero de <i>B. trigonica</i> y <i>B. nigricornis</i> en los muestreos periódicos realizados en Zamadueñas (Valladolid) en 2018.....	49
Figura 3.12. Evolución de las medias por planta (20 plantas) de los huevos y ninfas de psílicos localizadas en el ensayo de patata de Gomezserracín (Segovia) en 2016.....	49
Figura 3.13. Evolución de las medias por planta (20 plantas) de los huevos y ninfas de psílicos localizadas en el ensayo de patata de Zamadueñas (Valladolid) en 2016.....	50
Figura 4.1. Aspecto general del ensayo de Zamadueñas.....	61
Figura 4.2. Promedio de porcentaje de germinación por variedades en los tres muestreos realizados en el año 2016 en el ensayo de Zamadueñas (Valladolid).....	63
Figura 4.3. N° plantas afectadas por síntomas en las tres visitas realizadas en el ensayo de patata de la localidad de Zamadueñas (Valladolid) durante los años 2016-2018.....	64
Figura 4.4. Aspecto de las plantas de patata donde se fue detectada Lso.....	66
Figura 4.5. Aspecto de los tubérculos donde fue detectada Lso.....	67

Índice de tablas

Tabla 2.1. Número total de plantas sintomáticas y sin síntomas y positivas para Lso en las parcelas de patata prospectadas en Castilla y León durante los años 2016, 2017 y 2018.....	31
Tabla 2.2. Número de psílicos encontrados en el barrido realizado con manga entomológica en las especies silvestres en campos de cultivo de patata de siembra en 2018.....	32
Tabla 2.3. Plantas silvestres identificadas, número de ejemplares encontrados y detección de Lso, en las prospecciones realizadas en las lindes de campos de cultivo de patata de siembra en 2018.....	32
Tabla 2.4. Media, número de machos y hembras y porcentaje de Lso en psílicos adultos capturados por red de barrido en las capturas ocasionales realizadas en campos de patata en diferentes áreas de producción de Castilla y León en 2016, 2017 y 2018.....	34
Tabla 3.1. Localización de las parcelas de patata donde se realizó el monitoreo de los psílicos durante las campañas 2016, 2017 y 2018.....	42
Tabla 3.2. Valores de DF, F valor y P valor para los factores variedad y posición de la hoja para las variables dependientes huevos, ninfas N1-N2 y N3-N5 de psílicos en patata en el ensayo de Zamadueñas (2016).....	50
Tabla 3.3. Número de huevos, ninfas N1-N2 y N3-N5 por hoja para cada posición de la planta.....	50
Tabla 3.4. Número de individuos totales por especie y género, y positivos en Lso capturados en los mangueros y en la trampa Irwin de las localidades de Gomezserracín (Segovia) y Zamadueñas (Valladolid) durante los años 2016, 2017 y 2018.....	51
Tabla 4.1. Fechas de siembra y cosecha del ensayo de patata durante las campañas 2016, 2017 y 2018.....	60
Tabla 4.2. Número de lotes sembrados de cada variedad de patata en cada año de estudio.	61
Tabla 4.3. Sintomatología y resultado del análisis de Lso en las plantas positivas detectadas en las prospecciones realizadas en planta en el ensayo realizado en Zamadueñas (Valladolid), años 2016-2018.....	65
Tabla 4.4. Resultados del análisis de Lso por lote y por total de tubérculos en los años 2016, 2017 y 2018.....	67
Tabla 4.5. Número de tubérculos sintomáticos analizados y tubérculos positivos a Lso por lote y variedad por año; y número total de tubérculos positivos por variedad en los tres años de estudio.....	68
Tabla 4.6. Número de tubérculos por planta, número de tubérculos no viables y tubérculos sintomáticos y asintomáticos, y en cada caso número de tubérculos positivos a Lso de las plantas positivas a Lso detectadas en la localidad de Zamadueñas, años 2016-2017.....	70

Capítulo 1: Introducción

1.1. Introducción general

1.1.1. Origen, importancia y cultivo de la patata.

La patata, *Solanum tuberosum* L., es una especie de la familia de las solanáceas, originaria del altiplano sur del Perú y el noroccidente de Bolivia, la cual fue domesticada en el altiplano de los Andes. En el siglo XVI se trasladó a Europa por los conquistadores españoles, adaptándose el cultivo con rapidez a las condiciones territoriales y extendiéndose su consumo, hasta convertirse en uno de los principales alimentos del ser humano. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019), se trata del cuarto alimento más cultivado en el mundo, detrás del maíz, el trigo y el arroz. Se trata, además, de un cultivo decisivo para la seguridad alimentaria de cientos de millones de personas en el mundo en desarrollo

Se trata de un alimento que, si bien posee relativamente pocos nutrientes, es capaz de ofrecer una importante fuente de energía al contener gran cantidad de carbohidratos. Además, las patatas se presentan como el tubérculo con el contenido de proteínas más elevado, en torno al 2,1% del peso del producto en fresco. Unas proteínas que, por otro lado, están constituidas por aminoácidos adecuados a las necesidades humanas (FAO, 2011).

Es una planta herbácea, tuberosa, de tallo erecto, que puede medir hasta 1 m de altura (Figura 1.1.). Sus hojas son compuestas, con siete a nueve folíolos, de forma lanceolada. Los tallos aéreos se originan a partir de yemas del tubérculo utilizado como semilla, volviéndose relativamente leñosos en la parte basal en la etapa final del desarrollo. Disponen de dos tipos de tallos subterráneos: rizomas y tubérculos. Cada rizoma, a través de un engrosamiento en su extremo distal, genera un tubérculo. La inflorescencia es en panícula o cima, la cual nace en el extremo terminal del tallo, variando el número de flores desde una hasta treinta, siendo lo más habitual entre siete y quince. El número de inflorescencias está altamente influenciado por el cultivar. La corola puede ser de color blanco o una mezcla más o menos compleja de azul, borra vino y púrpura dependiendo del tipo y cantidad de antocianinas presentes. El fruto es de tipo baya, entre 1 y 3 cm, con color variable de verde a amarillento. La reproducción se realiza por multiplicación vegetativa a partir de tubérculos, debido a que la producción por semilla, al tratarse de una planta tetraploide con variabilidad en la descendencia muy alta, daría lugar a plantas muy heterogéneas.



Figura 1.1. Planta de patata en floración.

Existen hasta 5.500 variedades de este cultivo, muchas de las cuales van quedando obsoletas por la aparición de otras con mayor rendimiento y adaptabilidad, de manera que sólo se consumen unas pocas decenas. La mejora actual del cultivo es la búsqueda de variedades resistentes a la sequía, con mayor sistema radicular. Las variedades se pueden diferenciar por el color de la epidermis y de la pulpa, la resistencia a enfermedades, la duración del ciclo de cultivo y los requisitos nutricionales, entre otras características de relevancia productiva. Los cultivares modernos suelen ser de forma redondeada, con la piel amarilla o rosada, la pulpa blanca o amarilla y los ojos poco profundos. En los países de origen del cultivo también se conocen variedades tradicionales con estas formas, pero además existen muchas otras de piel púrpura, azul o bicolor, de carne azulada, violeta o amarilla y de formas alargadas, curvas o casi esféricas.

El tubérculo inicia su brotación a 5 °C. Para un buen desarrollo de la planta las temperaturas deben oscilar entre 20-25 °C, afectando al cultivo aquellas por encima de 37 °C. Para el desarrollo del área foliar el cultivo requiere fotoperiodos largos, con más de 14 h de luz, y en su proceso de tuberización, fotoperiodos cortos, con menos de 14 h de luz. La patata es un cultivo muy exigente en agua, aunque un exceso reduce el porcentaje en fécula y favorece el desarrollo de enfermedades. El cultivo se caracteriza por necesidades hídricas variables a lo largo de todo su ciclo, pero sobre todo es fundamental en la fase de nascencia y de floración. Son recomendables riegos frecuentes, aunque no con grandes dosis.

1.1.2. Producción de la patata en el mundo, Europa y España.

En el año 2019 se produjeron a nivel mundial 370.435.474 t de tubérculos, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 2019). Los principales países productores de patata a nivel mundial son China, India, Rusia, Ucrania, Estados Unidos y la Unión Europea. Solo China produce casi el 25 % de la producción mundial. Los mayores rendimientos los obtienen países como Kuwait, Estados Unidos y Nueva Zelanda, con valores próximos a 50 t/ha. En cuanto a su consumo, Bielorrusia es el país donde más patatas se consumen a nivel mundial con 501,81 g/persona/día. Le siguen, con un consumo por encima de los 300 g/persona/día, países como Ucrania, Malawi, Montenegro, Letonia y Rusia (FAO, 2019).

La Unión Europea produce 56.403.790 t, que supone el 15 % de la producción mundial, siendo los principales países productores Alemania, Holanda, Polonia, Reino Unido y Bélgica. Solo estos cinco países obtienen el 82 % de la producción de patata europea. Los mayores rendimientos los obtienen países como Irlanda, Dinamarca, Países Bajos y Francia con valores entre 40-50 t/ha. En cuanto a su consumo, Polonia, Irlanda, Bélgica o Países Bajos son grandes consumidores de este cultivo, con un consumo entre 248 y 284 g/persona/día, formando parte de los primeros veinte puestos de la lista de consumidores a nivel mundial (FAO, 2019).

España es el noveno productor de la Unión Europea con una producción de 2.259.320 t, un rendimiento medio de 33,89 t/ha y un consumo de este tubérculo de 164,5 g/persona/día (FAO, 2019). Destacan como principales comunidades productoras Castilla y León, Galicia y Andalucía (MAPA, 2019). En el año 2019 se cultivaron 66.650 ha con una producción de 2.259.320 t, destacando las CC.AA de Castilla y León, Galicia y Andalucía. Castilla y León, con 19.180 ha y 933.663 t de producción, es la principal comunidad productora de patata tardía del país (MAPA, 2019).

En cuanto a la estacionalidad de la producción por Comunidades, destacan Andalucía y Canarias como productoras de patata extratemprana y temprana, Galicia y Castilla y León en patata de media estación, y Castilla y León en tardía, siendo la principal comunidad productora de este tipo de patata estacional del país. Los mayores rendimientos se consiguen en patata tardía y suelen situarse en Castilla y León, Álava y La Rioja.

1.1.3. La patata en Castilla y León.

Castilla y León es una de las principales comunidades productoras de patata de España, destacando principalmente en la producción de patata tardía. Según el Anuario de Estadística Agraria de la Junta Castilla y León, en el año 2019 se sembraron 19.180 ha de este cultivo en

esta comunidad, obteniendo 933.663 t de producción, con rendimientos que varían desde 30,1 t/ha, obtenidos en patata temprana, hasta 49,64 t/ha en patata tardía. Por provincias destacan principalmente Salamanca y Valladolid, Salamanca con la mayor superficie de patata tardía de Castilla y León, y Valladolid con una superficie superior a 2.500 ha tanto en patata de media estación como tardía

Castilla y León lidera el sector de la patata de siembra nacional con una superficie de 1.500 ha y una producción de 21.509 t. Esta producción representa aproximadamente el 75 % de la patata de siembra de España, siendo el País Vasco y Navarra las otras dos comunidades productoras de este tipo de patata (Patata de siembra de España, 2021). La zona de producción se sitúa en el norte de la comunidad, principalmente en municipios de las provincias de Burgos, Palencia, en cinco municipios de Soria y uno de León que permiten. Estos campos de producción cuentan con condiciones ambientales y sanitarias adecuadas para el cultivo de patata, con mayor altitud y separados de las áreas de consumo de producción de patata para preservarlos de posibles plagas y enfermedades.

1.1.4. Principales plagas y enfermedades del cultivo de la patata.

Las pérdidas económicas debidas a las plagas y enfermedades que afectan al cultivo de la patata, son difíciles de estimar, ya que depende la región, y a numerosos factores agronómicos relacionados con el ciclo y manejo del cultivo, variedad, etc. Con buenas prácticas agrícolas, una hectárea de patata en las regiones templadas del norte de Europa y de América del Norte puede producir más de 40 t. Sin embargo, casi en todos los países desarrollados la producción promedio es mucho más baja, desde 5 hasta 25 toneladas, debido a la falta de semillas de buena calidad y de cultivares mejorados, a un uso inferior de fertilizantes e irrigación, y a problemas de plagas y enfermedades (FAO, 2008).

1.1.4.1. Plagas que afectan al cultivo de la patata

Dentro de las plagas que afectan a nivel productivo este cultivo se definen las siguientes:

- Gusano del alambre, *Agriotes* spp.

Se trata de gusanos que destruyen semillas, practican galerías en tubérculos, destruyen las raíces y el tallo en plántulas. En el caso de cultivos aprovechables por sus órganos subterráneos, como es el caso de la patata, sufren una depreciación comercial total (Ruíz de Azua, 2009).

- Pulguilla de la patata, *Epitrix similaris* Gentner.

Según la información del Observatorio de plagas del ITACyL (2021) se trata de un insecto coleóptero de la familia *Crhysomelidae* originario de Norteamérica (California), introducido

de manera accidental en Europa en 2004. Los adultos se alimentan de las hojas, en las que se observan pequeños agujeros circulares (de 1 a 1,5 mm de diámetro). En el borde de estos orificios se pueden presentar pequeñas clorosis, lo que no suele tener una repercusión importante en el rendimiento del cultivo.

En los tubérculos afectados, se observan galerías sinuosas de aspecto acorchado y pequeñas verrugas superficiales. Estas lesiones son provocadas por las larvas, que se alimentan debajo de la epidermis. Las galerías son superficiales no afectando por tanto a la carne del tubérculo, pudiendo eliminarse bien con un pelado de la piel. El daño producido por las larvas es principalmente estético, reduciendo el valor de mercado de la patata. Sin embargo, las heridas pueden ser una vía de entrada para otros patógenos (*Fusarium* spp.).

- Gusanos grises, *Agrotis* spp.

Según la Guía de Gestión Integrada para el cultivo de patata (2015), los gusanos grises son noctuidos del género *Agrotis* cuya larva provoca daños tanto a los tubérculos como a las plantas de patata. Las larvas pueden provocar un daño considerable en plantas jóvenes al cortarlas por la zona del cuello. Las plantas cortadas por la oruga pueden volver a brotar, pero presentarán retraso, y su fuerza o vigor será menor que la de las plantas no atacadas.

La oruga también se alimenta del tubérculo, manifestándose los daños en las oquedades o cavidades producidas por las larvas en las zonas roídas, lo que supone depreciación de la producción. Las heridas provocadas en el tubérculo favorecen la entrada de hongos fitopatógenos.

- Polillas, *Tecia solanivora* (Povolny) y *Phthorimaea operculella* (Zeller)

Según la información que ofrece la sección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la polilla guatemalteca, *Tecia solanivora* (Povolny), es un insecto de hábitos nocturnos perteneciente a la familia *Gelechiidae*. El único hospedante identificado hasta la fecha es la patata. El adulto hace la puesta en la base de las plantas de patata o directamente en los tubérculos que no están enterrados a profundidad suficiente. La larva penetra en el tubérculo para alimentarse provocando la presencia de galerías, que ocasionan importantes daños en el cultivo y en el almacén. Como consecuencia de la presencia de orificios en el tubérculo, que sirven de entrada para otros patógenos, y a la producción de excrementos de la larva, es frecuente la aparición de descomposiciones secundarias en el tubérculo que hacen que la patata no se pueda comercializar.

Phthorimaea operculella (Zeller), es otra especie de polilla que producen daños en los cultivos de patata, que además ocasiona daños en la parte aérea de la planta, lo que la diferencia de la polilla guatemalteca.

- Pulgones, *Aphis* spp. y *Myzus* spp.

Según la Guía de Gestión Integrada para el cultivo de patata (2015), los pulgones más comúnmente presentes en el cultivo de la patata y por tanto potencialmente transmisores o vectores de virus, son: *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878), *Aulacortum solani* (Kaltenbach, 1843) y *Aphis narsturtii* Kaltenbach, 1843. Los daños directos se ocasionan por su actividad alimenticia, por la extracción de savia y por la posible contaminación a través de su estilete de hongos saprófitos u otros patógenos que se desarrollan en la melaza secretada por estos insectos. Los daños indirectos, que son los más importantes, se producen por la transmisión de virus.

- Escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata* Say.

Según el Observatorio de Plagas del ITACyL (2021), el escarabajo de la patata es un coleóptero de la familia de los crisomélidos de amplia distribución mundial en el cultivo de la patata. Tanto las larvas como los adultos se alimentan de las hojas y pueden llegar a eliminar totalmente las plantas. Se trata de una plaga endémica en muchos lugares donde se cultiva la patata y produce daños cuantiosos si no se combate en el momento adecuado.

1.1.4.2. Nemátodos que afectan al cultivo de la patata

Debido a que se trata de una especie donde la parte comestible es el tubérculo, tiene especial importancia la presencia de nemátodos. Dentro de las especies que pueden atacar a este cultivo destacan cinco especies de pertenecientes a tres géneros distintos: anguilulosis de la patata, *Ditylenchus destructor*, los nemátodos del quiste de la patata, *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* y los nemátodos del nódulo de la raíz, *Meloidogyne chitwoodi* y *Meloidogyne fallax* (MAPA, 2015).

- Anguilulosis de la patata, *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945.

Según la Guía de Gestión Integrada para el cultivo de patata (2015), no se observan síntomas específicos del ataque de este nematodo en la parte aérea de la planta en la patata de siembra, salvo en caso de ataques muy severos, en los cuales se observa debilitamiento de las plantas. Los síntomas se observan sobre los tubérculos: la piel adquiere un color negro grisáceo, se arruga, se agrieta y aparece desgarrada por zonas y delgada como el papel, debido a que el tejido subepidérmico se seca y encoge. Al ser pelados los tubérculos, muestran debajo de la piel manchas de color blanco tiza o débilmente coloreadas, que progresivamente se ensanchan. El tejido afectado es de consistencia seca y granular y a medida que estas áreas se unen, el tejido se oscurece por la invasión de organismos secundarios como hongos, bacterias y nemátodos saprofitos. En condiciones favorables para el ataque, en el campo o en el almacén,

los tubérculos pueden llegar a destruirse completamente como consecuencia de una podredumbre húmeda, emanando un olor desagradable.

- Nematodos del quiste de la patata, *Globodera pallida* (Stone, 1973) y *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923)

Los nematodos formadores de quistes son organismos endoparásitos sedentarios de las especies *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*, que producen problemas nematológicos en el cultivo de la patata, según la Guía de Gestión Integrada para el cultivo de la patata. Los nematodos sobreviven en el suelo en forma de quistes, pudiendo aguantar más de 20 años en ausencia del cultivo. Las formas juveniles buscan las raicillas para alimentarse, penetrando en ellas. Los primeros ataques se observan en rodales con un pobre crecimiento del cultivo y retraso en la floración. El follaje se vuelve amarillento y si no hay humedad suficiente se marchita, pudiendo morir. Se observan agallas y lesiones necróticas en las raíces. Se quedan cortas y proliferan las raíces secundarias sobre las que pueden observarse los quistes. Los tubérculos formados son de pequeño tamaño, comprometiendo la recolección, ya que las pérdidas pueden ser muy importantes.

- Nemátodos del nódulo de la raíz, *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo, & Finley, 1980 y *Meloidogyne fallax* (Karssen, 1996).

Según la Guía de Gestión Integrada para el cultivo de la patata (2015), la diferencia fundamental de los nemátodos del género *Meloidoyne* spp. con *Globodera* spp. consiste en que los *Meloidogyne* spp. no forman quistes resistentes. Estos nematodos no producen síntomas aéreos específicos en la planta como para poder diagnosticar la enfermedad, pero dependiendo de la cantidad de nematodos que haya, las plantas afectadas pueden presentar diferentes grados de enanismo. Además del bajo porte, las plantas tienden a marchitarse más acusadamente ante la falta de humedad. Durante su alimentación producen una secreción que causa un engrosamiento de las células de la raíz dando lugar a los llamados “nudos”, “agallas” o “nódulos”. En los casos más graves, cuando la densidad de nematodos es alta y las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo del nematodo, los tubérculos desarrollan nódulos que les dan una apariencia verrugosa; dentro de estos nódulos se encuentran las hembras del nematodo.

1.1.4.3. Enfermedades que afectan al cultivo de la patata.

La Guía de Gestión Integrada para el cultivo de la patata (2015), describe las siguientes enfermedades que afectan al cultivo de la patata:

- Mildiu de la patata, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

Destruye las hojas y el tubérculo en la última fase de su crecimiento, manifestándose en necrosis de las hojas, manchas de un color plateado y destrucción de tejidos de los tubérculos

- La pudrición de la raíz, *Rhizoctonia solani* Kühn

Hongo en suelos fértiles, ácidos y muy húmedos o con falta de drenaje. En años lluviosos aumenta su incidencia. En la superficie de los tubérculos maduros se forman esclorotos de color negro a castaño oscuro. Otros síntomas en los tubérculos incluyen grietas, malformaciones, concavidades y necrosis en el extremo de unión con el estolón.

- El tizón temprano, *Alternaria solani* Sorauer

Hongo que causa manchas necróticas en las hojas de color marrón a negro de diferentes tamaños y con anillos concéntricos característicos, que pueden juntarse. En los tubérculos las lesiones son oscuras, hundidas, de forma circular e irregular, pudiendo aumentar de tamaño durante el almacenamiento.

- La podredumbre del pie y raíz, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Es una enfermedad típica de las patatas almacenadas. Los tubérculos presentan un moho algodonoso blanco o ligeramente rosado. Este hongo se desarrolla muy bien a temperaturas de 15 a 20 °C y con humedad ambiente superior al 70%. Se produce por lesiones, heridas o cortes al tubérculo. Debido a su influencia en la desecación, el tubérculo se momifica y la pulpa adquiere una textura granulosa.

- Sarna plateada, *Helminthosporium solani* Dur & Mont.

Esta enfermedad se dispersa principalmente durante la fase de almacenamiento. Los conidios se esparcen con el viento a través del sistema de ventilación o se transmiten mediante el contacto directo de tubérculos sanos con tubérculos enfermos. El daño, que es superficial, afecta sólo a los tubérculos. Produce manchas circulares o difusas en la epidermis, decolorándola, tomando la superficie un aspecto plateado, que es más patente al lavar los tubérculos. Si el área afectada es muy extensa, los tubérculos pueden arrugarse durante el almacenamiento, debido a la pérdida excesiva de humedad.

- Verticilosis, *Verticillium dahliae* Kleb

La enfermedad se caracteriza por un amarillamiento de las hojas, el que comienza en la base de la planta y puede desarrollarse unilateralmente, restringiéndose a los lados de las hojas, el tallo o la planta. Después, la planta puede marchitarse llegando a una muerte prematura.

- Sarna común, *Streptomyces* spp.

La sarna afecta a los tubérculos de la patata que, en casos muy severos puede provocar que las plantas detengan su crecimiento causando marchitez. Los tubérculos son los más afectados y los síntomas más comunes son pústulas o lesiones levantadas de forma circular, aspecto

corchoso y color marrón. A veces estas lesiones están hundidas o cavidades semiprofundas y en otros se forman lesiones necróticas en forma de figuras poliédricas y/o lesiones necróticas de forma reticular o estrellada.

- El marcheamiento bacteriano de la patata, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi. Es la enfermedad bacteriana más grave de la patata en las regiones cálidas del mundo. Con frecuencia restringe la producción de este cultivo. Los síntomas iniciales de amarillamiento leve se observan primero en un solo lado de la hoja o en una rama y no en la siguiente. Los síntomas avanzados son la marchitez severa y la sequedad, que preceden a la muerte de la planta.

- Necrosis bacteriana o podredumbre anular, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckemann & Kotthoff)

Bacteria que produce importantes pérdidas económicas, tanto en patata de siembra como de consumo, al provocar la pudrición de los tubérculos. Existe un gran riesgo de introducción de estas enfermedades a través de la patata de siembra. En almacén, estas bacterias se propagan fácilmente de los tubérculos infectados a los sanos, sin que necesariamente presenten síntomas. Si se siembran tubérculos infectados, dichas bacterias pueden sobrevivir en campo durante varios años.

- Pie negro, *Pectobacterium* spp. y *Dickeya* spp.

El pie negro es una enfermedad que representa un conjunto de síntomas de pudrición ocasionados por diferentes bacterias. Las bacterias que producen estas enfermedades suelen estar presentes en las lenticelas de los tubérculos utilizados como semilla, pero también pueden estar en los suelos y en las aguas de riego. En condiciones idóneas de alta humedad en el suelo, alta temperatura y heridas en los tubérculos producidas por golpes, magulladuras y fisiopatías, las bacterias latentes se activan pudriendo el tubérculo antes de la emergencia de las plantas. Las plantas afectadas suelen presentar necrosis y reabsorción del tallo subterráneo, presentando una podredumbre de color negro y húmeda muy típica en el cuello. Los síntomas en tubérculos van desde pudrición poco definida en el contorno, hasta pudrición total de todo el tubérculo con un característico olor desagradable.

Por último, la guía de Patógenos de plantas descritos en España por la Sociedad Española de Fitopatología (2010), define los siguientes virus de la patata en el cultivo en España:

- Virus de la rizomanía, Beet necrotic yellow vein virus

Virus transmitido por un hongo de suelo, *Polymyxa betae*. La enfermedad se detecta en cultivo porque presenta síntomas, de amarilleo y estrechamiento de las hojas y malformaciones en raíz.

Las hojas presentan clorosis moteada en el cultivo, síntomas de marchitez pese a tener humedad disponible; plantas con pecíolos largos y hojas estrechas. Se produce gran formación de raíces laterales que rápidamente se ponen de color café. En el caso de pudrición de la raíz principal, los haces vasculares toman una coloración oscura.

- Virus del bronceado, Tomato spotted wilt virus

Las plantas infectadas presentan manchas necróticas en las hojas, necrosis en los tallos, muerte del brote terminal y en algún caso, de toda la planta. Además, los tubérculos infectados pueden presentar aspecto normal, pero tener defectos internos como grietas y manchas necróticas que disminuyen la calidad de los mismos. El virus es transmitido por insectos del orden *Thysanoptera* como *Frankliniella occidentalis* Pergande, 1895, *Frankliniella schultzei* (Trybom, 1910), *Frankliniella gemina* Bagnall, 1919 y *Thrips tabaci* Lindeman, 1889 con diferente eficiencia en la capacidad de transmitir el virus.

- Virus del ahusado de la patata, Potato spindle tuber viroid

En las plantas de patata este virus da lugar a un enroscado del ápice del tallo en el sentido de las agujas del reloj y los folíolos son alargados, verde oscuro y los tubérculos son pequeños y elongados. La principal forma de diseminación de este virus, bajo condiciones de campo, es la transmisión por contacto, la que ocurre en forma natural cuando las hojas de una planta infectada rozan o se ponen en contacto con las hojas de una planta sana, provocando roturas de pelos o tricomas de las hojas, por donde se produce la infección.

- Potato Virus Y (Virus del mosaico severo de la patata)

Los síntomas típicos de este virus son rugosidad, aglomeración, retorcimiento, doblez hacia abajo del margen de los folíolos y/o necrosis en las hojas; necrosis de las nervaduras de los folíolos; manchas necróticas y rayado en el tallo; y enanismo. Los cultivares menos sensibles reaccionan mostrando solo mosaico suave o pueden estar infectados sin presentar síntomas. El virus se perpetúa por tubérculos infectados y es transmitido por áfidos en forma no persistente. El PVY puede también transmitirse mecánicamente a través de la maquinaria o herramientas.

1.1.5. Problemas emergentes del cultivo de la patata.

En el año 2013 se detectó por primera vez en tubérculos de patata procedentes de varias localidades de Castilla y León la bacteria '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lso) (Palomo *et al.*, 2014). Este patógeno es el causante de la enfermedad conocida como "Zebra Chip" (ZC), una enfermedad que causa importantes pérdidas en el cultivo de la patata en el Norte y centro de América y Nueva Zelanda (Munyaneza, 2015).

Lso es una bacteria gram-negativa, vascular, limitada al floema de la planta, no cultivable en laboratorio y de la que se han descrito hasta 10 haplotipos (EPPO, 2020). Es transmitida por psílidos (Hemiptera: Triozidae) que se alimentan de la savia del floema de la planta.

1.2. “Zebra Chip” en el cultivo de la patata

1.2.1. Importancia económica de Zebra Chip (ZC) en el cultivo de la patata

Zebra Chip (ZC) es una enfermedad de importancia económica en el cultivo de la patata, que ha sido documentada en campos comerciales en América del Norte y Central y Nueva Zelanda (Munyaneza, 2015).

ZC tuvo una importancia esporádica hasta 2004, cuando empezó a causar pérdidas de millones de dólares a los productores de patata en América, conduciendo ocasionalmente al abandono de campos enteros (Munyaneza, 2015). A mediados de la década de 2000, el manejo químico de la enfermedad en Texas costó aproximadamente 25,86 millones de dólares en un periodo de 3 años, y en el noroeste del Pacífico este gasto fue estimado en 11 millones de dólares al año (American Phytopathological Society, 2019). La enfermedad también ha devastado la industria de la patata en Nueva Zelanda (Munyaneza, 2015).

Los impactos económicos directos anuales en Europa de una eventual infestación de Lso en cultivos de solanáceas, con una producción de patata 59 millones de toneladas en 2013 (Eurostat, 2020), se estimaba en 222 millones de euros (Soliman *et al.*, 2013). La producción de patata europea actual es inferior (51,2 millones de toneladas en 2019) (Eurostat, 2020), sin embargo, siendo la patata uno de los cultivos hortícolas más importantes de Europa y de España, con 2,01 millones de toneladas en 2018 (MAPA, 2019), la amenaza de ZC para el cultivo de patata en Europa es grave.

1.2.2. *Candidatus* Liberibacter solanacearum (Lso)

Lso es un patógeno que se encuentra ampliamente distribuido en el Norte y Centro de América, en Europa y en Nueva Zelanda (Figura 1.2.) (EPPO, 2021).

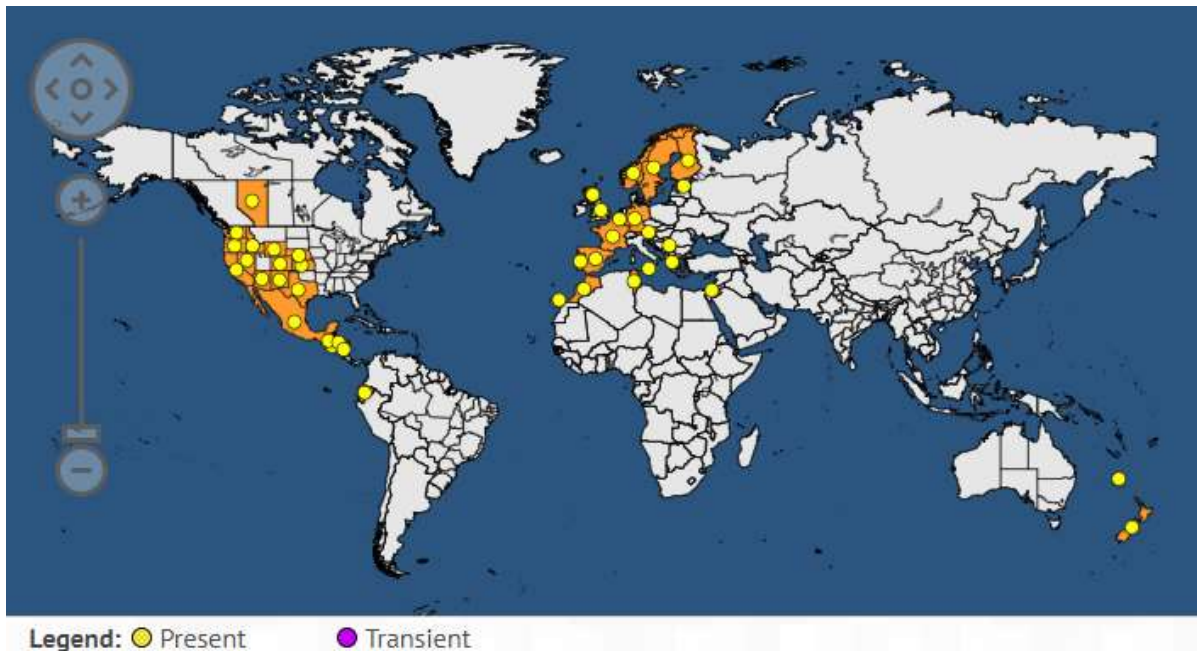


Figura 1.2. Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* a nivel mundial (EPPO, 2021)

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) es una bacteria Gram-negativa, de la familia Rhizobiaceae, clase α - Proteobacteria, parásita obligada del floema de distintas plantas y de la hemolinfa de algunos insectos, no cultivable *in vitro* (Jagoueix *et al.*, 1994; Bove, 2006) (Figura 1.3.).

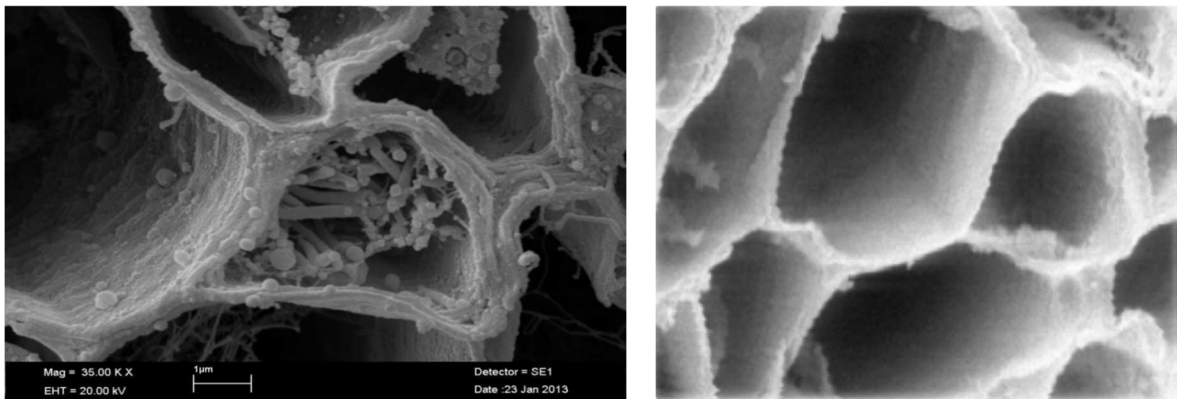


Figura 1.3. Células infectadas por Lso y células sanas del floema de apio. Proyecto Ponte (<https://www.ponteproject.eu/>)

La morfología del género *Candidatus Liberibacter* visto bajo el microscopio electrónico es de un bacilo que mide aproximadamente de 2-3 μ m de largo y 0,2-0,3 μ m de ancho (Tanaka *et al.*, 2007). Al igual que otras bacterias del género *Liberibacter*, Lso se puede transmitir por injerto, semilla e insectos vectores (Liefing *et al.*, 2009a; Secor *et al.*, 2009; Crosslin & Munyaneza, 2009; Camacho-Tapia *et al.*, 2011; Bertolini *et al.*, 2015).

La detección de Lso se basa en la amplificación por PCR de fragmentos del gen ARNr 16S con cebadores específicos. Estudios de metagenómica revelaron que el genoma de Lso es un cromosoma circular de 1.258. 278 pb; la función de sus genes se estableció por comparación de genes ortólogos. Dentro del genoma se encuentran tres operones completos de rRNA (16s, 23s y 5s), 45 genes que codifican tRNA y alrededor de 35 pseudogenes (Lin *et al.*, 2011a,b).

1.3.2. Plantas huéspedes cultivadas de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) se reportó inicialmente como el agente causal de ZC en la patata en 2009 por Liefting *et al.* (2009a, 2009b), basado en su secuencia molecular (Liefting *et al.*, 2008b). Este patógeno también fue detectado en patata en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2008b). Se ha detectado en otras Solanáceas como tamarillo (*Solanum betaceum*) y uchuva (*Physalis peruviana*), sin síntomas de enfermedad (Liefting *et al.*, 2008a); en cultivos de tomate y pimiento en México (Munyaneza *et al.*, 2009a,b); en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Honduras (Aguilar *et al.*, 2013); y en cultivos de berenjena (*Solanum melongena* L.), pimiento jalapeño (*Capsicum annuum*), hierba mora de hoja plateada (*Solanum elaeagnifolium* Cav.), hierba mora negra (*Solanum ptychanthum* Dun.) y bayas de Goyi (*Lycium barbarum*) en Estados Unidos (Wen *et al.*, 2009).

En Europa Lso se ha asociado con cultivos de Apiáceas, encontrándose en plantas de zanahoria (*Daucus carota*) afectadas en Finlandia (Munyaneza *et al.*, 2010a, 2011), Suecia (Munyaneza *et al.*, 2012c) y en Noruega (Munyaneza *et al.*, 2012d). Este patógeno se ha reportado también en plantas de zanahoria en las Islas Canarias y en la Península Ibérica (Teresani *et al.*, 2015); en apio (*Apium graveolens*) en España, en zanahorias en Marruecos (Tahzima *et al.*, 2014), en zanahorias en campos de cultivo cerca de Orléans (Loiseau *et al.*, 2014); en chirivía (*Pastinaca sativa* L.) y plantas de perejil (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) en España (Alfaro-Fernández *et al.* 2017) y Francia (Hajri *et al.*, 2017), y en hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.) y perifollo (*Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm.) en Francia (Hajri *et al.*, 2017).

1.2.3. Sintomatología de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en patata, “Zebra Chip”, en otras Solanáceas y en Apiáceas.

Los síntomas de ZC en patata fueron observados por primera vez en México en 1994 (Secor *et al.*, 2009), y se le dio el nombre por la coloración marrón de los vasos vasculares de los tubérculos de las plantas afectadas distribuida de forma característica. Los síntomas característicos de esta enfermedad en los tubérculos frescos son rayas oscuras y claras,

especialmente detectables en patatas fritas, que afectan su apariencia y sabor, haciendo los tubérculos comercialmente inaceptables (Figura 1.4.)

Los síntomas foliares asociados con ZC incluyen enrollamientos hacia arriba de las hojas superiores, decoloraciones amarillentas o violáceas, proliferación de yemas axilares, entrenudos cortos, nódulos hinchados, tubérculos aéreos, clorosis y quemaduras de las hojas, crecimiento rápido y en algún caso, muerte de la planta (Figura 1.4.)



Figura 1.4. Síntomas de ZC en tubérculos de patata (EPP0) y síntomas de tubérculos aéreos en plantas de patata.

Los síntomas de ZC en Nueva Zelanda en tomate de invernadero (*Solanum lycopersicum*) y plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) mostraron múltiples síntomas, incluyendo el moteado de las hojas, rizado de las venas, crecimiento apical puntiagudo y clorótico, retraso del crecimiento y deformación del fruto (Liefting *et al.*, 2008b).

En el caso de zanahoria, los síntomas en las plantas afectadas incluyen curvatura de las hojas, coloración amarillenta, bronceada y violácea de las hojas; atrofia de los brotes y raíces; y proliferación de raíces secundarias (Munyanzeza *et al.*, 2010a). En apio (*Apium graveolens*) los síntomas de las plantas donde fue detectada la bacteria fueron proliferación y distorsión de los tallos (EPP0, 2012; Teresani *et al.*, 2014);

Existe evidencia de que Lso puede estar presente en los tubérculos de patata y zanahoria sin síntomas apreciables (Palomo *et al.*, 2014; Loiseau *et al.*, 2014; MAPA, 2017; Haapalainen *et al.*, 2018a; Ruíz-Padilla *et al.*, 2020).

1.2.4. Los psílidos, familia *Psyllidae* (Hemiptera: Triozidae)

Los psílidos (Hemiptera: Psylloidea) son pequeños insectos de 2 a 3 mm de largo con cuatro alas que se alimentan de plantas, chupando la savia del floema. Se distribuyen en casi todas las principales regiones climáticas del mundo donde encuentran las plantas hospedantes

adecuadas. La gran mayoría de las especies de psílicos son muy específicas del huésped y están predominantemente asociadas con angiospermas dicotiledóneas perennes (Hodkinson, 2009). Algunas especies se desarrollan en monocotiledóneas incluyendo *Livia* spp. en *Carex* y *Juncus*, *Bactericera tremblayi* (Wagner) y *B. kratohvili* (Vondracek) sobre *Allium* spp. (Alliaceae) y sobre especies de Palmáceas (Hodkinson, 2009). Las gimnospermas no suelen ser utilizadas como plantas hospedantes, pero sin embargo juegan un papel muy importante como plantas de refugio de hibernación para adultos de una amplia gama de especies de psílicos.

Los psílicos se han ido adaptando para explotar una variedad de plantas a lo largo del tiempo evolutivo, diversificando su fisonomía, fisiología y fenología para irse habilitando a las diferentes condiciones ambientales dentro de las principales zonas climáticas. A su vez, las plantas huéspedes también han experimentado una evolución química de forma simultánea, en particular las características de sus compuestos secundarios. Estas características químicas son la base de la selección del huésped y la permanencia de los psílicos en el huésped (Hodkinson, 2009). Dicha evolución está impulsada por dos variables primordiales, la temperatura y la precipitación, que varía en respuesta a la latitud, altitud y continentalidad del sitio (Hodkinson, 2009). Al ser capaces de volar de forma autónoma pequeñas distancias, les permite cambiar de planta huésped para la búsqueda del recurso alimenticio del que depende para el éxito de la reproducción y moverse entre diferentes especies de plantas hospedadoras y buscar especies no hospedadoras como lugares de hibernación, escapando de los efectos de fuerte competencia intraespecífica y enemigos naturales (Hodkinson, 2009).

El ciclo de vida del psílido comienza con el apareamiento entre adultos fértiles, seguido de oviposición por la hembra en las hojas de la planta huésped, la eclosión del huevo y desarrollo ninfal a través de cinco estadios, y la aparición de adultos después de la metamorfosis, generalmente mostrando una proporción de sexos de 1: 1 en el momento de la emergencia (Hodkinson, 2009). Dependiendo de la estación y las condiciones climáticas, los adultos recién emergidos vuelan a nuevas plantas hospedantes y comienzan un nuevo ciclo o bien migran a plantas refugio para hibernar. Los adultos pueden volar a una distancia de 1 km y pueden también ser arrastrados por el viento a distancias más largas. El tiempo necesario para el desarrollo de huevos a adultos varía dependiendo de la temperatura, pero generalmente es alrededor de un mes. El número total de huevos puestos por una hembra apareada es de cien a mil para la mayoría de las especies estudiadas (Hodkinson, 2009). Existen numerosos factores que intervienen en la fecundidad de las especies de psílicos, relacionadas con su ciclo de vida, la temperatura, la duración del día, etc. difiriendo esta fecundidad ampliamente,

incluso entre especies del mismo género o familia. Por lo general, la fecundidad media por hembra varía de 40 a 50 a más de 1000 huevos, con una mayoría de especies que se encuentran en el rango de 200 a 800 (Hodkinson, 2009). En las zonas tropicales, con condiciones de calor y humedad durante todo el año, los ciclos de vida tienden a ser continuos, con múltiples generaciones por año (Hodkinson, 2009).

Existe un alto grado de especificidad del huésped en los psílidos, sin embargo, las excepciones suelen ser especies multivoltinas de zonas templadas del norte (Hodkinson, 2009). Dentro de estas especies se encuentran plagas como *Bactericera nigricornis* Förster, *Bactericera trigonica* Hodkinson y *Bactericera cockerelli* (Sulc), las cuales se alimentan de una diversidad de géneros de plantas hospedadoras dentro de las familias de las Solanáceas, Umbelíferas y Crucíferas (Hodkinson 1981).

1.2.5. Principales especies de psílidos transmisoras de patógenos en plantas cultivadas.

Los psílidos (Hemiptera: Psylloidea) son transmisores principalmente de bacterias y fitoplasmas, encontrando numerosas enfermedades relacionadas con estos insectos vectores en distintas especies cultivadas (Hodkinson, 2009).

Huanglongbing (HLB), conocido también como el “greening” de los cítricos, es una enfermedad asociada con la infección de tres especies de α -proteobacterias de *Candidatus* Liberibacter: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. africanus* (Bove, 2006). Los síntomas del HLB incluyen manchas moteadas y clorosis, que pueden llegar a confundirse con deficiencias nutricionales, además de achaparramiento y reducción del follaje conforme progresa la enfermedad, y en casos extremos los árboles mueren por la infección (Gottwald *et al.*, 2007). Existen varias especies de psílidos vectores asociadas a HLB en cítricos. El psílido *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 es responsable de la transmisión de *Ca. L. asiaticus* en América, Asia y África (Halbert & Manjunath, 2004, Das *et al.*, 2007; Shimwela *et al.*, 2016) y de *Ca. L. americanus* en América (Texeira *et al.*, 2005). *Trioza erytreae* Del Guercio, 1918, es responsable de la transmisión de *Ca. L. africanus* en África (Aidoo *et al.*, 2019) y *Ca. L. asiaticus* en el sur de África (Ajene *et al.*, 2020a,b).

Zebra chip (ZC) es una enfermedad del cultivo de la patata que causa importantes pérdidas en el Norte y centro de América y Nueva Zelanda (Munyaneza, 2015). El agente causal es *Candidatus* Liberibacter solanacearum (Lso) (Liefing *et al.* 2009a,b). En todos estos casos Lso parece ser transmitida por *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Figura 1.5.), que es endémica de América, pero que fue introducida accidentalmente en Nueva Zelanda, encontrándose por primera vez en este país en 2006 (Thomas *et al.*, 2011).

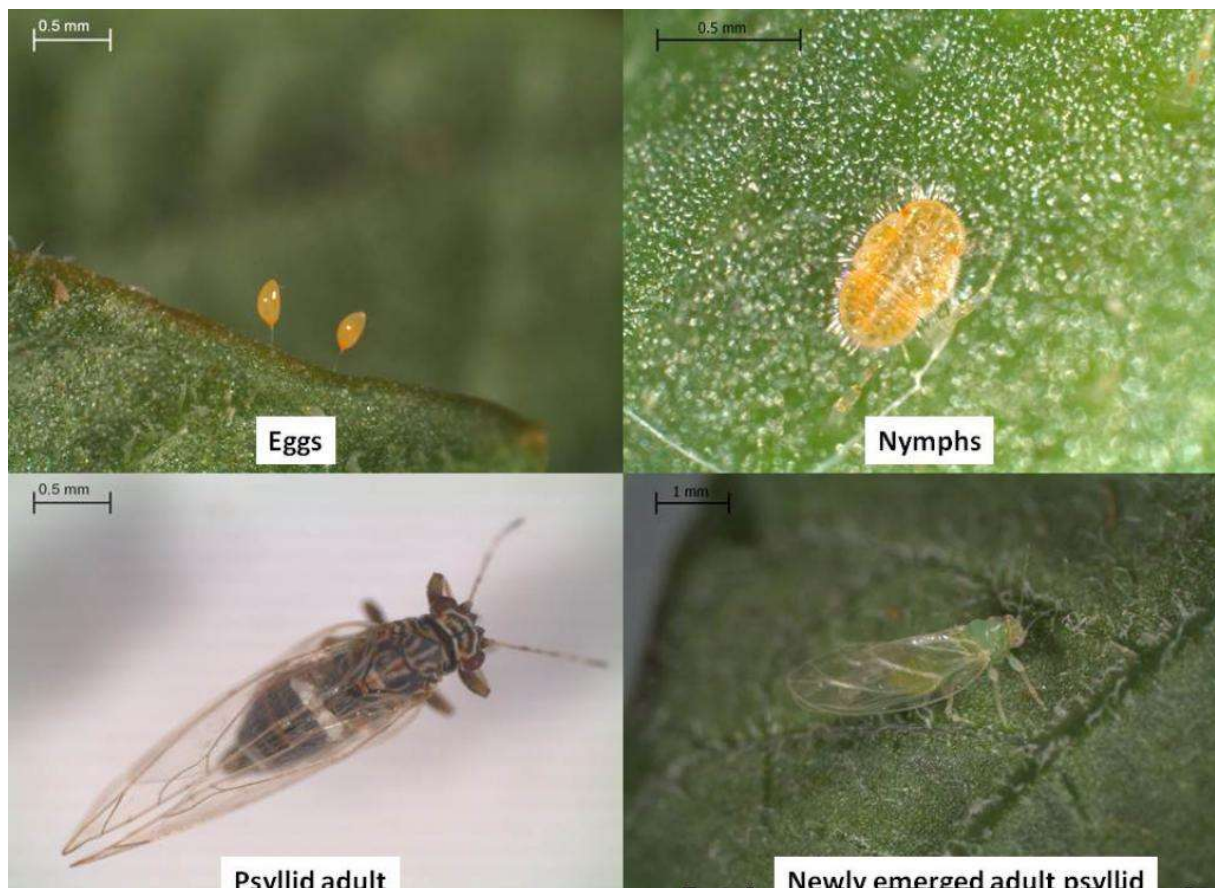


Figura 1.5. Huevos, ninfas, adultos y adultos recién emergidos de *Bactericera cockerelli* (EPPO)

En el norte Europa *Trioza apicalis* Förster es la especie responsable de la transmisión de Lso en el cultivo de zanahoria (Munyaneza *et al.*, 2010b, 2011), mientras que en el sur de Europa y países del Mediterráneo es el psílido *Bactericera trigonica* (Alfaro-Fernández *et al.*, 2012a,b; Teresani *et al.*, 2014; Tahzima *et al.*, 2014; Loiseau *et al.*, 2014).

Sin embargo, no existe información suficiente de la abundancia y distribución de psílidos en cultivos de patata en Europa (Antolínez *et al.*, 2019; Haapalainen *et al.*, 2018a; Teresani *et al.*, 2015).

1.2.6. Transmisión de *Candidatus Liberibacter solanacearum* por psílidos (Hemiptera: Triozidae).

Cuando un psílido se alimenta de la savia del floema infectada por Lso, la bacteria puede ser ingerida por el insecto. El tiempo entre la adquisición del patógeno y alcanzar el potencial de poder transmitir el patógeno a una nueva planta se llama periodo latente (Haapalainen, 2014). El período de latencia de Lso en *B. cockerelli* es de aproximadamente dos semanas y la

bacteria se transmite de manera persistente, circulativa y propagativa (Sengoda *et al.*, 2013, 2014; Cooper *et al.*, 2014).

Para que la bacteria sea transmitida por el psílido de forma persistente, las células bacterianas deben atravesar la pared del canal alimentario, moverse a través de la hemolinfa y finalmente llegar a las glándulas salivales, desde donde la bacteria puede transmitirse con las secreciones salivales a una nueva planta huésped durante la alimentación del psílido (Hodkinson, 2009). Además de la transmisión de las bacterias por psílicos a través de una planta huésped, Lso también puede ser transmitida transováricamente (verticalmente) a la progenie de un psílido femenino infectado.

1.2.7. Haplotipos de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y su relación con los psílicos vectores

La caracterización de la bacteria a partir de muestras de plantas y psílicos de diferentes orígenes ha permitido agruparla en diferentes haplotipos. Los haplotipos de Lso están basados en las secuencias de tres regiones de los genes 16S rRNA, ITS 23S rRNA y 50S rRNA (rplj-rplL).

Los haplotipos A y B están asociados con enfermedades causadas por la bacteria en la patata y otras especies de solanáceas (Nelson *et al.*, 2011) y están diseminados por *Bactericera cockerelli* en América Central, del Norte y Nueva Zelanda. En Europa, el haplotipo C se asocia con zanahoria y *Triozia apicalis* en Finlandia (Munyanza *et al.*, 2010b,2011). Los haplotipos D y E se describen en zanahorias y otros cultivos de Apiáceas en la cuenca mediterránea (Nelson *et al.*, 2013; Teresani *et al.*, 2014): España (Alfaro-Fernández *et al.*, 2012a,b; Teresani *et al.*, 2015), Francia (Loiseau *et al.* 2014) y África del Norte (Tahzima *et al.*, 2014, Ben Othmen *et al.*, 2018). En estas áreas de producción Lso es transmitido por *Bactericera trigonica* Hodkinson (Font *et al.*, 1999; Teresani *et al.*, 2015; Ben Othmen *et al.*, 2018; Antolínez *et al.*, 2019). La distribución de los haplotipos en Europa se muestra en la Figura 1.6.

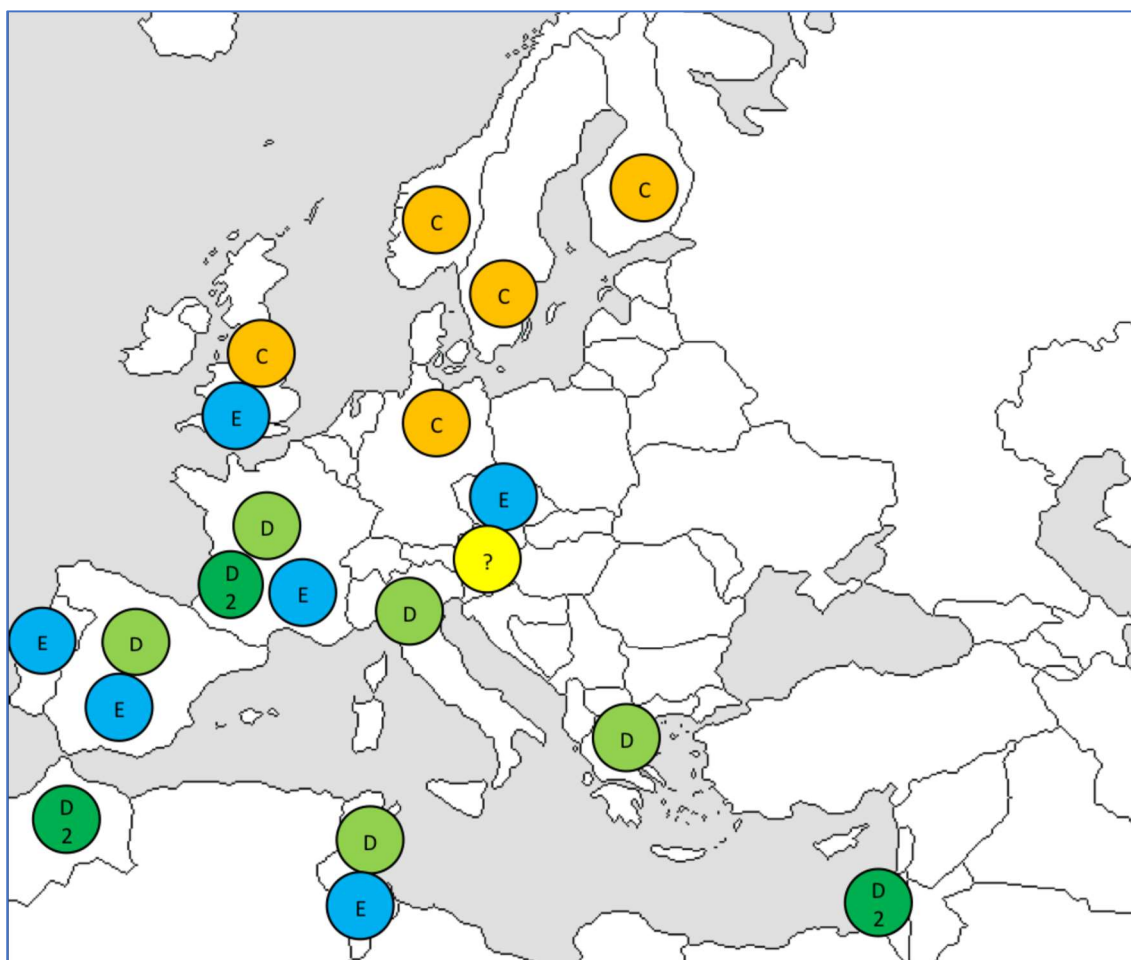


Figura 1.6. Distribución de los haplotipos de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en Europa y en el Mediterráneo. Proyecto Ponte (<https://www.ponteproject.eu/>)

Se ha encontrado un sexto haplotipo en el psílido *Trioza urticae* y en la ortiga (*Urtica dioica*, Urticaceae) en Finlandia, denominándose haplotipo U (Haapalainen *et al.*, 2018b). Se ha identificado un séptimo haplotipo, denominado haplotipo F, en patata en Estados Unidos (Grimm *et al.*, 2018; Swisher Grimm & Garczynski, 2019) y recientemente se han detectado dos nuevos haplotipos, G y H. El haplotipo G se ha detectado en muestras de *Solanum umbelliferum* (Solanaceae) de los condados de Kern y Riverside (Estados Unidos) de la colección del herbario de la Universidad de California Riverside (Mauck *et al.*, 2019). Por último, el haplotipo H se ha descrito en plantas de la familia Apiaceae y Polygonaceae de diferentes regiones de Finlandia (Haapalainen *et al.*, 2020).

1.2.8. Medidas de control de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Las medidas para el control de ZC, en zonas donde esta enfermedad causa graves problemas en el cultivo de la patata, se han basado en la detección temprana y el control del insecto vector disminuyendo su presencia (Haapalainen, 2014).

La mayoría de las variedades comerciales de patata disponibles en los Estados Unidos son susceptibles a ZC aunque ciertas líneas de mejora de variedades de patata exhiben cierta tolerancia a ZC, a Lso y a *B. cockerelli* (Munyanzeza *et al.* 2010e). Las líneas de mejora de patata incluyen aquellas con germoplasma derivado de especies silvestres de Solanáceas que se ha demostrado que exhiben resistencia a muchas plagas de insectos de la patata (Munyanzeza *et al.* 2010e; Novy *et al.*, 2010).

El desarrollo e identificación de variedades de patata y/o líneas de mejora avanzadas con resistencia o tolerancia a ZC, utilizando métodos tradicionales de reproducción o ingeniería genética, se han reportado como métodos cruciales para el desarrollo de estrategias de manejo efectivas y sostenibles para esta importante y emergente enfermedad en patata. Se han realizado trabajos para desarrollar cultivares resistentes y pruebas de detección para identificar variedades de patata y líneas de mejora avanzadas con resistencia a ZC y a *B. cockerelli* (Mora *et al.*, 2021)

Las plantas emplean diferentes mecanismos para protegerse de los patógenos y los insectos. Algunos de los mecanismos de resistencia de algunas plantas huéspedes son constitutivos, como barreras físicas, o liberación de químicos que interrumpen la transmisión del patógeno, la permanencia y la oviposición del psílido en la planta. Otras defensas de las plantas, como la emisión de compuestos volátiles o el incremento regulado de genes de resistencia pueden ser respuesta a la plaga o el patógeno (Mora *et al.*, 2021).

Los mecanismos de resistencia de la planta huésped al patógeno pueden ser categorizados como antixenosis y antibiosis. Generalmente, la antixenosis se refiere al efecto disuasorio que las plantas pueden tener en el comportamiento de los insectos, mientras que la antibiosis afecta a su ciclo de vida y su reproducción (Mora *et al.*, 2021). En el caso de ZC, varias variedades de patata e híbridos de patata poseen cierto grado de tolerancia a ZC. En algunas variedades, la tolerancia se atribuyó a efectos antixenóticos de los tricomas glandulares (Mora *et al.*, 2021).

Un número reducido de variedades parecen tener una base genética para la tolerancia a Lso en adición con efectos del comportamiento del psílido (Rashidi *et al.*, 2017; Fife *et al.*, 2020). Recientemente se ha reportado la resistencia a *B. cockerelli* de algunos parientes silvestres de tomate, *S. pennelli* y *S. corneliomulleri* (Avila *et al.*, 2019), con varios loci de rasgos cuantitativos (QTL) asociados con la mortalidad de insectos y menor fecundidad. Estos QTL en especies silvestres podrían ser una fuente valiosa para mejorar la resistencia de los cultivares, sin embargo, su herencia compleja, su modo de acción y la interacción entre huésped-vector-patógeno requieren una caracterización adicional.

Los avances recientes en genómica y recursos genéticos (Mora *et al.*, 2021), incluidos los de la patata, deberían ayudar a identificar rasgos deseables, alelos y desarrollo de marcadores para desarrollar nuevos cultivares de resistencia a ZC. Por ejemplo, la disponibilidad de la secuencia del genoma de referencia de la patata y el descubrimiento de marcadores de SNP (polimorfismo del nucleótido único) en el germoplasma de patata de América del Norte ha ayudado en la identificación de genes vinculados a características agronómicas mejoradas (Mora *et al.*, 2021). La selección asistida por marcadores (MAS) ayudaría a identificar marcadores estrechamente vinculados a un locus objetivo, en lugar de depender de selecciones fenotípicas para hacer cruzamientos.

1.2.9. *Candidatus Liberibacter solanacearum* en la Península Ibérica y en Canarias.

En España Lso se cita por primera vez en 2012 en muestras de zanahoria recogidas de 2008 a 2010 en Alicante, Valencia y Albacete (Alfaro-Fernández *et al.*, 2012a,b). La especie identificada como responsable de la transmisión en este cultivo fue el psílido *Bactericera trigonica* Hodkinson (Font *et al.*, 1999; Teresani *et al.*, 2015; Antolínez *et al.*, 2019).

En patata, la presencia solo ha sido detectada en análisis rutinarios de tubérculos en el momento de cosecha (Palomo *et al.*, 2014), desconociendo la etiología y la importancia epidemiológica de la aparición de la bacteria en este cultivo.

Los haplotipos descritos en la cuenca Mediterránea en zanahorias y otros cultivos de Apiáceas han sido los haplotipos D y E (Alfaro-Fernández *et al.*, 2012a,b; Teresani *et al.*, 2015) y en estudios recientes realizados con muestras de material vegetal de Apiáceas y Solanáceas de diferentes regiones españolas, se ha confirmado de nuevo la presencia de los haplotipos D y E, y en el caso de los tubérculos de patata, entre ellos algunos procedentes de la zona productora de patata de Castilla y León, el haplotipo detectado ha sido siempre el E (Ruíz-Padilla *et al.*, 2020).

Las especies de psílicos reportadas en cultivos de patata y zanahoria en la Península Ibérica han sido *Bactericera nigricornis* (Förster) y *B. trigonica* (Antolínez *et al.*, 2019). Así mismo, ha sido reportada la presencia de *B. trigonica* en Canarias en cultivo de zanahoria (Teresani *et al.*, 2015). Estos autores han citado ambas especies en cultivos de zanahoria y patata, siendo *B. trigonica* más abundante en zanahoria y *B. nigricornis* más abundante en patata. Sin embargo, el riesgo de transmisión de Lso de zanahoria a patata por *B. trigonica* parece muy limitado (Antolínez *et al.*, 2017) y teniendo en cuenta que *B. nigricornis* aparece en ambos cultivos, esta especie podría ser responsable de la transmisión de Lso de zanahoria a patata en España. Por último, se ha documentado la presencia de otra especie del género *Bactericera*

spp. que podría estar involucrada en la transmisión de Lso, *Bactericera tremblayi* (Wagner, 1961), el psílido de la cebolla. Este psílido ha sido reportado en la zona de producción hortícola española, causando importantes daños en los cultivos de puerro (Ouvrard & Burckhardt, 2012), aunque si bien puede portar la bacteria, no es transmisora de la misma (Antolínez *et al.*, 2017). *B. trigonica*, *B. nigricornis* y *B. tremblayi* son morfológicamente cercanas y pertenecen al complejo *Bactericera nigricornis* Förster (Hodkinson, 1981). Aunque existen trabajos previos sobre estas especies, se requieren estudios más extensos y sistemáticos para dilucidar el papel real de cada especie en la transmisión de Lso de los cultivos de zanahoria a patata.

1.3. Justificación y objetivos.

La expansión y propagación de Lso es rápida, y su dispersión depende principalmente del control en las especies de los psílicos vectores (Haapalainen, 2014).

La presencia de la bacteria Lso en el cultivo de patata en España ha sido testimonial, reportada en los análisis tubérculos de patata realizados desde el Centro Regional de Diagnóstico de la Junta de Castilla y León en el año 2013, lo que no tendría en principio repercusión epidemiológica ni económica en el cultivo (Palomo *et al.*, 2014).

Los psílicos transmisores de Lso actualmente reportados en zonas hortícolas en cultivos de patata y zanahoria de la Península han sido *B. trigonica* y *B. nigricornis* (Antolínez *et al.*, 2019) y *B. trigonica* en Canarias (Teresani *et al.*, 2015). *B. trigonica* es una especie que aparece con abundancia en el cultivo de la zanahoria y se trata de un vector eficiente en este cultivo, sin embargo, en los estudios realizados por Antolínez *et al.*, en 2017 reportaron que el riesgo de transmisión de Lso de zanahoria a patata por *B. trigonica* parece ser muy limitado. Por tanto, con el fin de evaluar la amenaza real de Lso en el cultivo de la patata en Castilla y León, se realizaron muestreos ocasionales distribuidos en las zonas productoras de patata, tanto de siembra como de consumo, muestreos de forma periódica para estudiar la dinámica poblacional de los psílicos en patata y se estableció un ensayo para comprobar la transmisión de la bacteria tanto en planta como en tubérculo, evaluando en todo caso la amenaza real de las posibles especies de psílicos vectores de esta bacteria y de los tubérculos infectados.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Identificar las especies de psílicos asociadas al cultivo de patata en Castilla y León, así como estudiar su dispersión, dinámica poblacional, abundancia y el riesgo como especies vectores de Lso.

- Evaluar diferentes métodos de muestreo para la determinación de las poblaciones de psílicos.
- Determinar la incidencia de la enfermedad en las principales zonas productoras de patata de Castilla y León, tanto de siembra como de consumo, mediante la detección de los síntomas de la enfermedad en planta y detección de la bacteria por métodos moleculares.
- Estudiar la sintomatología y transmisión de la enfermedad en la planta y tubérculo en diferentes variedades de patata
- Identificar posibles focos de transmisión de la bacteria y advertir el potencial de riesgo de transmisión de la bacteria de este material infectado.

Capítulo 2: Distribución de Zebra Chip en el cultivo de la patata de Castilla y León

Resumen

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) es un patógeno ampliamente distribuido en diferentes cultivos de las familias *Apiaceae* spp. y *Solanaceae* spp. En patata provoca la enfermedad conocida como Zebra Chip (ZC) ocasionando grandes pérdidas económicas a nivel mundial. En el año 2013 se detectó la presencia de Lso en tubérculos de patata en los análisis rutinarios realizados por el Centro Regional de la Junta de Castilla y León, sin embargo, aún no se conocen distintos aspectos de la etiología y epidemiología de esta enfermedad en el cultivo de patata de Castilla y León. Con los objetivos de conocer qué importancia tiene la enfermedad en el cultivo de patata de Castilla y León, estudiar la abundancia y el potencial en la transmisión de las distintas especies vectoras, así como buscar posibles plantas hospedantes que puedan albergar la bacteria y actuar como foco de dispersión, se realizaron muestreos ocasionales en las zonas productoras de patata de siembra y de consumo de Castilla y León durante los años 2016, 2017 y 2018.

De las 660 plantas muestreadas, solo se encontraron siete plantas positivas en el análisis de Lso, seis de ellas con síntomas de tubérculos aéreos y una planta sin síntomas. La especie mayormente encontrada ha sido *Bactericera nigricornis*, que tiene hábitos polífagos, con unos niveles de capturas bajos. La presencia de otras especies próximas como *B. trigonica* y de *B. tremblayi* ha sido testimonial. El porcentaje de individuos de *B. nigricornis* portadores de la bacteria fue del 2%. En el análisis de las plantas silvestres próximas al cultivo de la patata en la zona de siembra no se reportó la presencia de Lso.

En conclusión, con el nivel de plantas e insectos portadores de la bacteria encontrado, no parece que ZC sea un problema grave en Castilla y León. Existen zonas de producción de patata de consumo en Castilla y León donde el cultivo de la patata se encuentra muy próximo al de zanahoria en el que Lso es un problema. Teniendo en cuenta que el riesgo de transmisión de *B. trigonica* a patata es muy limitado, *B. nigricornis* podría adquirir la bacteria en este cultivo para posteriormente transmitirla al cultivo de la patata.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), *Bactericera* spp., vector, planta, tubérculo, siembra, consumo, huésped.

2.1. Introducción

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso), es el patógeno responsable de la enfermedad conocida como “Zebra Chip” (ZC) en patata y otras Solanáceas (Munyaneza, 2015); y de los desórdenes vegetativos detectados en Apiáceas en el norte de Europa (Munyaneza *et al.*, 2010a, 2011, 2012c,d) y en la cuenca Mediterránea (Loiseau *et al.*, 2014; Tahzima *et al.*, 2014; Teresani *et al.*, 2015; Alfaro-Fernández *et al.*, 2017; Hajri *et al.*, 2017). Es transmitida por psílidos (Hemiptera: Triozidae) que se alimentan de la savia del floema de la planta (Hodkinson, 2009).

La transmisión de los haplotipos A y B de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en el Norte y centro de América y Nueva Zelanda (Munyaneza, 2015) es realizada por *Bactericera cockerelli* (Sulc), o psílido de la patata, provocando importantes daños en este cultivo. Se trata de una especie polífaga, y tiene una gama de plantas hospedantes excepcionalmente amplia, siendo capaz de ovipositar y completar el desarrollo en más de 40 especies hospedadoras (Knowlton & Thomas, 1934; Wallis, 1951). Las plantas hospederas de *B. cockerelli* se incluyen dentro de las familias Solanaceae y Convolvulaceae, aunque sobrevive y parece preferir especies de plantas de la familia de las Solanáceas (Wallis, 1955). *B. cockerelli* es endémica de América del Norte con la distribución de este insecto en diversos estados de los EE. UU. (Pletsch, 1947; Cranshaw, 1994; Munyaneza *et al.*, 2009c, 2010d), pudiéndose encontrar en Canadá (Pletsch, 1947; Wallis, 1955; Ferguson *et al.*, 2002), así como en México, y en varios países de Centroamérica al menos tan al sur como Guatemala y Honduras (Tuthill, 1945; Butler & Trumble, 2012; Pletsch, 1947; Jackson *et al.*, 2009; Crosslin *et al.*, 2012a,b). A principios de la década de 2000, *B. cockerelli* invadió Nueva Zelanda y se ha extendido por todo este país (Gill, 2006; Davidson *et al.*, 2008; Teulon *et al.*, 2009).

El haplotipo C de Lso es transmitido en Europa por *Trioza apicalis* Förster, el psílido de la zanahoria, plaga común de la zanahoria en el norte y Europa Central (Munyaneza *et al.*, 2010b, 2011). *T. apicalis* es univoltino, con una sola generación por año que se produce durante los meses de verano en los que se alimenta de zanahorias (Hodkinson, 2009). La siguiente generación será la que pase el invierno como adulto en coníferas, preferentemente en abetos (*Picea abies*) (Kristoffersen & Anderbrant, 2007).

En los cultivos de Apiáceas de la cuenca Mediterránea. *Bactericera trigonica* Hodkinson es el psílido responsable de la transmisión de los haplotipos D y E de Lso, donde se encuentra ampliamente distribuido. *B. trigonica* tiene dos o tres generaciones al año, se alimenta de zanahorias y plantas relacionadas, y los adultos hibernan en arbustos de hoja perenne (Hodkinson, 2009). Se ha detectado su presencia en la Península y en Canarias, detectando la

bacteria tanto en el psílido como en las plantas de zanahoria de estas regiones (Font *et al.*, 1999; Alfaro-Fernández *et al.*, 2012a,b; Teresani *et al.*, 2015; Antolínez *et al.*, 2019).

B. trigonica, forma junto con *Bactericera tremblayi* (Wagner, 1961) y *Bactericera nigricornis* (Förster) el complejo *Bactericera nigricornis* Förster (Hodkinson, 1981). Se trata de tres especies morfológicamente parecidas, con áreas de distribución superpuestas, que se caracterizan por la extensión posterior del proctiger masculino, la terminalia femenina corta, la ausencia de espínulas superficiales en el ala anterior, los pequeños conos genales y el tercer segmento de la antena más estrecho (Klimaszewski, 1975). *B. tremblayi*, el psílido de la cebolla y el puerro, se distribuye en la región mediterránea que abarca España (Península y Canarias), Francia, Grecia, Turquía e Italia, y ha sido reportada en otros países como Serbia, Bulgaria, Jordania e Irán (<https://gd.eppo.int/taxon/TRIZTE/distribution>). Se ha citado su presencia en especies del género *Allium* (Hodkinson, 2009), las familias Brassicaceae (Conci *et al.*, 1996), Apiaceae (Jerinić-Prodanović, 2006) y Caryophyllaceae (Conci *et al.*, 1996). Ouvrard & Burckhardt (2012) reportaron esta especie de psílido en diferentes áreas agrícolas de cultivo de puerro en Francia y en 2015, Asensio *et al.* (2019a) detectaron síntomas en este cultivo asociados con poblaciones elevadas de *B. tremblayi* en la zona hortícola de Castilla y León. Se trata de una especie que no es capaz de transmitir Lso a zanahoria y a puerro, aunque sí se ha detectado la bacteria en el insecto (Antolínez *et al.*, 2017). *B. nigricornis* ha sido reportada en diferentes plantas cultivadas como zanahoria, perejil, patata, remolacha, brassica, rábano y cebolla (Conci *et al.*, 1996; Hodkinson, 1981; Malumphy *et al.*, 2009) y en plantas silvestres pertenecientes a las familias *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Liliaceae*, *Papaveraceae* y *Solanaceae* (Hodkinson, 1981; Ossiannilsson, 1992; Malumphy *et al.*, 2009). Se trata de una especie que se distribuye principalmente por Europa y el norte de África (Figura 2.1.). Se ha registrado también su presencia en coníferas durante la hibernación (Reuter, 1908; Schaefer, 1949). Este nivel de polifagia es excepcional entre las Psylloidea, que suelen ser específicas de un huésped (Hodkinson, 1974).

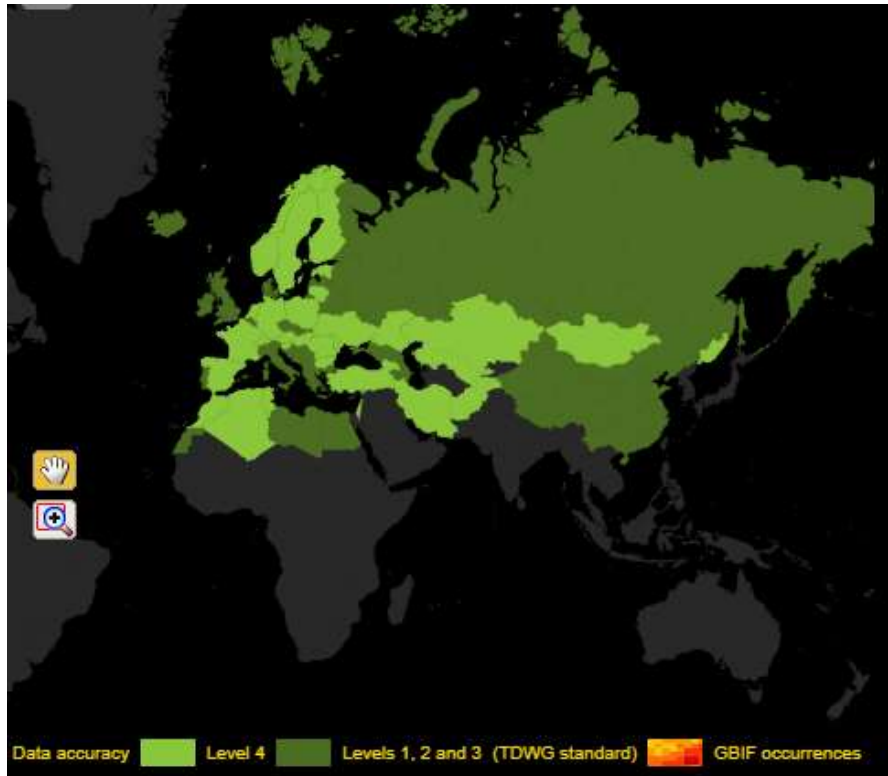


Figura 2.1. Distribución mundial de *B. nigricornis* (Ouvrard, D. 2021. Psyllist - The World Psylloidea Database. <http://www.hemiptera-databases.com/psyllist> - acceso 26 de julio 2021 doi:10.5519/0029634)

Las tres especies han sido reportadas en la Península, y en el caso de Canarias, se ha citado la presencia de *B. trigonica* y *B. tremblayi* (Teresani *et al.*, 2015). La presencia *B. trigonica* y de *B. nigricornis* ha sido reportada en cultivos de patata y zanahoria, siendo *B. trigonica* más abundante en zanahoria y *B. nigricornis* en patata (Antolínez *et al.*, 2019).

2.2. Objetivos

Los objetivos del siguiente trabajo fueron:

- Estudiar la dispersión y la abundancia de las especies de psílidos asociadas al cultivo de la patata en Castilla y León, evaluando la presencia de Lso y ver su potencial como especies vectores de la bacteria.
- Determinar la incidencia de la enfermedad en las principales zonas productoras de patata de Castilla y León, tanto de siembra como de consumo, mediante la detección de los síntomas de la enfermedad en planta y detección de la bacteria por métodos moleculares.
- Comprobar la presencia del insecto en otras plantas hospedantes y estudiar su relación con la bacteria.

2.3. Material y métodos

2.3.1. Localización de los muestreos ocasionales

Entre 2016 y 2018 se realizaron prospecciones ocasionales en parcelas de patata de Castilla y León de al menos 1 ha, tanto de patata de siembra como para consumo humano.

La distribución de los muestreos en la región se encuentra en la Figura 2.2. Las prospecciones en patata de consumo se realizaron en las provincias de Salamanca, Segovia, Ávila y Valladolid. En Segovia, Ávila y Valladolid, el cultivo de la patata comparte espacio con cultivos de zanahoria y puerro, encontrándose parcelas muy próximas de los tres cultivos. No es el caso de Salamanca, donde apenas existe superficie agrícola de los cultivos hortícolas mencionados.

En el caso de la patata de siembra, las parcelas se localizan en los municipios al norte de las provincias de Palencia y Burgos. Se trata de zonas aisladas de la patata de consumo, con unas condiciones para el cultivo idóneas y exentas de plagas y enfermedades.

El mapa con la localización de los puntos de muestreo para cada año aparece en la Figura 2.2.

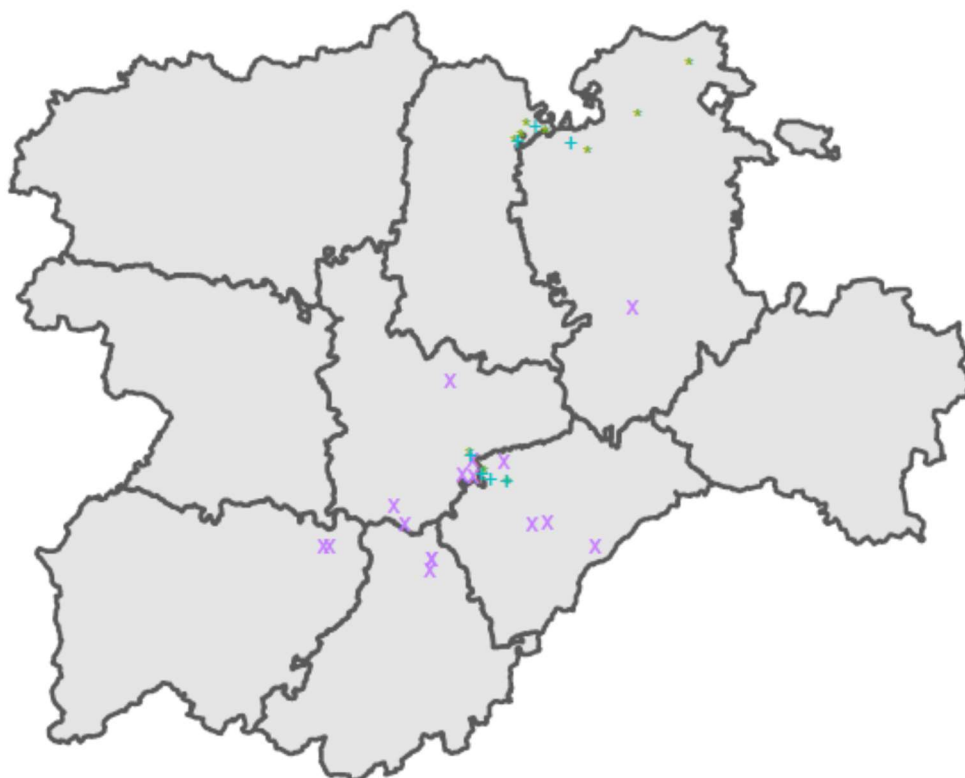


Figura 2.2. Localización de las parcelas prospectadas durante los años 2016 (cruces de color morado), 2017 (asteriscos de color verde) y 2018 (símbolo de suma azul) en la comunidad de Castilla y León.

2.3.2. Recolección del material vegetal en campo

Para el monitoreo de plantas del cultivo de patata se recolectaron veinte plantas por parcela visitada. Se seleccionaron plantas que presentaran síntomas compatibles con ZC. Si las plantas no presentaban síntomas, se recogieron plantas sin síntomas aparentes. Cada muestra estuvo compuesta por tres o cuatro brotes de cada planta, los cuales fueron guardados individualmente y mantenidos a 4 °C hasta ser sometidos al procedimiento de laboratorio para la extracción de ADN.

En el año 2018 se realizó un monitoreo de plantas silvestres en parcelas de patata de siembra. Para ello se realizó una prospección de las especies silvestres que circundaban las parcelas de patata, mediante reconocimiento de aquellas hospederas de *B. nigricornis* citadas en la bibliografía. Del material reconocido se recogieron igualmente tres o cuatro brotes que se mantuvieron a 4 °C hasta su extracción de ADN.

2.3.3. Muestreo de los psílidos asociados al cultivo de la patata y plantas silvestres

El muestreo de psílidos se realizó mediante manga entomológica. Los muestreos se realizaron con una red de barrido plegable telescópica.

En el cultivo de la patata cada muestra consistió en diez barridos consecutivos en diez puntos distintos elegidos de forma aleatoria, para obtener un total de diez muestras por parcela y fecha. El muestreo de las plantas silvestres colindantes se realizó mediante barrido de todas las plantas identificadas como hospedantes y circundantes a la parcela de patata, con una muestra por parcela y fecha.

Cada muestra se colocó en una bolsa de plástico con cierre hermético y se almacenó en el laboratorio a - 20 °C durante 48 h. A partir de ese momento las muestras se conservaron en tubos con etanol al 70%, hasta el momento de la identificación por sexo y especie (Hodkinson, 1981; Ouvrard & Burckhardt, 2012).

2.3.4. Extracción del ADN y detección de Lso en los insectos y material vegetal recogido

Para la extracción de ADN en las muestras vegetales se utilizó aproximadamente 0,5 g de cada muestra vegetal, el cual fue triturado en bolsas de plástico de malla Bioreba. A continuación, se añadieron 10 ml del tampón de extracción de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaCl 8 g / l; NaH₂PO₄ 2H₂O, 0,4 g / l; y Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2,7 g / l; pH 7,2) con un homogeneizador Homex 6 (Bioreba, Suiza). De cada muestra se almacenó 1 ml a -20 ° C hasta su uso. El ADN se purificó a partir de 200 µl de extracto vegetal crudo usando una modificación del protocolo de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) sin β-mercaptoetanol

(Murray & Thompson, 1980) como se describe en EPPO (2020). El ADN purificado se conservó a -20°C hasta su uso.

Los individuos adultos capturados mediante manga entomológica o red de barrido se analizaron individualmente para la detección de la bacteria. La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo Chelex de un solo paso de Casquet *et al.* (2012). Cada individuo fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml separando la cabeza del cuerpo. Se añadieron 10 μl de Proteinasa K y cada tubo se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se añadieron 150 μl de solución de resina Chelex 100 al 10% en agua a cada tubo. Los tubos se sellaron y se incubaron durante la noche a 55°C . La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min y se extrajo el sobrenadante. El material utilizado durante la preparación se limpió y desinfectó entre muestras. La extracción se analizó o bien inmediatamente, o se conservó a -20°C hasta su uso.

El análisis para la detección de Lso se realizó utilizando el PlantPrint Detection Kit por Real Time PCR (Taqman) descrito por Teresani *et al.* (2014). Este Kit utiliza una mezcla con todos los componentes necesarios para la amplificación del ADN específico (polimerasa Taq, oligonucleótidos, buffer, MgCl, cebadores y sonda TaqMan FAM / TAMRA). La mezcla de PCR se preparó con 9 μl de master mix y 3 μl de ADN total de insectos o planta o tubérculo, y la amplificación se realizó mediante un ciclo inicial de 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 95°C (15 s) y 64°C (1 min). Los controles suministrados por el kit de PlantPrint se utilizaron como controles positivos y negativos.

2.4. Resultados

2.4.1. Inspección visual de ZC y análisis de Lso en planta de las principales zonas productoras de patata de Castilla y León

Se recogieron 660 plantas en 33 localidades; 175 mostraron síntomas como hojas deformadas (12%), amarillentas (36%), hojas rizadas (22%), hojas moradas (3%), hojas cloróticas (39%), plantas con tubérculos aéreos (4%) y plantas enanas (28%). Solamente 7 plantas de las 660 analizadas fueron positivas para Lso: 6 plantas con síntomas de tubérculos aéreos en la localidad de Remondo en 2017 y 1 planta sin síntomas aparentes localizada en 2016 en Lomoviejo (Tabla 2.1.).

Tabla 2.1. Número total de plantas sintomáticas y sin síntomas y positivas para Lso en las parcelas de patata prospectadas en Castilla y León durante los años 2016, 2017 y 2018.

Localidad	Provincia	Tipo de cultivo	Fecha	Plantas sintomáticas		Plantas sin sintomáticas	
				N	Lso+	N	Lso+
Cabezón de Pisuerga	Valladolid	consumo	09/08/2016	3	0	17	0
Cabizuela	Ávila	consumo	07/07/2016	7	0	13	0
Cantalpino	Salamanca	consumo	28/07/2016	19	0	1	0
Cogeces de Íscar	Valladolid	consumo	28/06/2016	13	0	7	0
Escalona del Prado	Segovia	consumo	30/06/2016	19	0	1	0
Íscar	Valladolid	consumo	28/06/2016	10	0	10	0
Lomoviejo	Valladolid	consumo	09/08/2016	0	-	20	1
Mozoncillo	Segovia	consumo	30/06/2016	7	0	13	0
Nava de Arévalo	Ávila	consumo	07/07/2016	13	0	7	0
Pedrajas de San Esteban	Valladolid	consumo	28/06/2016	17	0	3	0
Pedrosillo de los Aires	Salamanca	consumo	28/07/2016	17	0	3	0
Quintanilla del agua	Burgos	consumo	21/07/2016	19	0	1	0
Tordomar	Burgos	consumo	21/07/2016	0	-	20	0
Torregutiérrez	Segovia	consumo	30/06/2016	10	0	10	0
Velascávaro	Valladolid	consumo	09/08/2016	4	0	16	0
Vinaderos	Ávila	consumo	07/07/2016	11	0	9	0
Remondo	Segovia	consumo	01/08/2017	6	6	14	0
Chatún	Segovia	consumo	01/08/2017	0	-	20	0
Cogeces de Íscar	Valladolid	consumo	01/08/2017	0	-	20	0
Villallano	Palencia	siembra	17/08/2017	0	-	20	0
Santa M ^a de Mave	Palencia	siembra	17/08/2017	0	-	20	0
Becerril de Carpio	Palencia	siembra	17/08/2017	0	-	20	0
Castresana de Losa	Burgos	siembra	03/08/2017	0	-	20	0
Dobro	Burgos	siembra	03/08/2017	0	-	20	0
Fuencaliente de Valdelucio	Burgos	siembra	17/08/2017	0	-	20	0
Fuenteurbel	Burgos	siembra	03/08/2017	0	-	20	0
Remondo	Segovia	consumo	12/07/2018	0	-	20	0
Chañe	Segovia	consumo	12/07/2018	0	-	20	0
Cogeces de Íscar	Valladolid	consumo	12/07/2018	0	-	20	0
Campo de Cuéllar	Segovia	consumo	24/07/2018	0	-	20	0
Basconillos del Tozo	Burgos	siembra	21/08/2018	0	-	20	0
Villarén de Valdivia	Palencia	siembra	21/08/2018	0	-	20	0
Santa M ^a Mave	Palencia	siembra	21/08/2018	0	-	20	0
N total				175	6	485	1
% plantas Lso+				1,06			

2.4.2. Resultados de la evaluación de plantas silvestres

En la tabla 2.2. se muestran los resultados obtenidos en el barrido realizado con manga entomológica en las especies silvestres encontradas en campos de cultivo de patata de siembra. Se encontraron 25 ejemplares de psílidos, de los cuales solo uno de ellos resultó *B. nigricornis*. El resto de individuos encontrados fueron especies de psílidos no identificadas como potenciales vectores de la bacteria.

Tabla 2.2. Número de psílidos encontrados en el barrido realizado con manga entomológica en las especies silvestres en campos de cultivo de patata de siembra en 2018.

Localidad	Provincia	Fecha	<i>B. nigricornis</i>	Otros psílidos
Basconcillos del Tozo	Burgos	21/08/2018	0	1
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	0	3
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	1	20

El número de plantas silvestres hospederas de *B. nigricornis* encontradas en las parcelas fue testimonial (Tabla 2.3.); *Conium maculatum* L. (Apiaceae) fue la especie que apareció con más frecuencia, encontrándola en las tres parcelas evaluadas. En los resultados obtenidos en el análisis de Lso ninguna planta silvestre fue positiva.

Tabla 2.3. Plantas silvestres identificadas, número de ejemplares encontrados y detección de Lso, en las prospecciones realizadas en las lindes de campos de cultivo de patata de siembra en 2018.

Localidad	Provincia	Fecha	Planta silvestre	N	+Lso
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	<i>Sinapis arvensis</i>	3	0
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	<i>Cirsium arvense</i>	1	0
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	<i>Epilobium hirsutum</i>	1	0
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	<i>Veronica officinalis</i>	1	0
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	<i>Conium maculatum</i>	4	0
Villarén de Valdivia	Palencia	21/08/2018	<i>Pastinaca sativa</i>	2	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Solanum physalifolium</i>	4	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Solanum dulcamara</i>	2	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Eryngium campestre</i>	1	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Daucus carota</i>	1	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Sinapis arvensis</i>	1	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Conium maculatum</i>	1	0
Santa M ^a Mave	Palencia	21/08/2018	<i>Senecio vulgaris</i>	1	0
Basconcillos del Tozo	Burgos	21/08/2018	<i>Ligusticum lucidum</i>	1	0
Basconcillos del Tozo	Burgos	21/08/2018	<i>Daucus carota</i>	1	0
Basconcillos del Tozo	Burgos	21/08/2018	<i>Conium maculatum</i>	1	0
Basconcillos del Tozo	Burgos	21/08/2018	<i>Pastinaca sativa</i>	2	0

2.4.3. Identificación, abundancia y determinación de la bacteria Lso de las especies de psílidos asociadas al cultivo de la patata en Castilla y León

Se capturaron 600 especímenes adultos del género *Bactericera* spp. en 29 de las 33 parcelas visitadas (Tabla 2.4.). El 98 % de los psílidos capturados con la manga entomológica se identificaron como *B. nigricornis*. El número de ejemplares capturados de las especies *B. trigonica* y *B. tremblayi* fue mínimo, y se capturaron en cuatro parcelas de patata ubicadas en la provincia de Segovia (Mozoncillo, Cogeces de Íscar, Chatún y Remondo), donde se encuentran la mayoría de cultivos de zanahoria y puerro en Castilla y León.

La media de psílicos adultos de *B. nigricornis* capturados varió entre 0,01 (\pm 0,03) insectos/mangueo (Quintanilla del Agua y Cabezón de Pisuerga) y 0,47 (\pm 0,18 Torregutiérrez; y \pm 0,13 Villallano), excepto una parcela ubicada en Campo de Cuéllar (Segovia) que mostró un mayor número de insectos/ mangueo ($2,26 \pm 0,73$).

En cuanto a la captura de individuos por género, el número de hembras de *B. nigricornis* capturado fue mayor, con un 68% de las capturas.

Los especímenes de *B. nigricornis* capturados mostraron una carga baja de Lso: solo 12 de 590 individuos analizados fueron positivos para Lso.

Tabla 2.4. Media, número de machos y hembras y porcentaje de Lso en psíidos adultos capturados por red de barrido en las capturas ocasionales realizadas en campos de patata en diferentes áreas de producción de Castilla y León en 2016, 2017 y 2018.

Localidad	Provincia	Cultivo	Fecha	<i>B. trigonica</i>						<i>B. nigricornis</i>						<i>B. tremblayi</i>					
				insectos/manguero			♂	♀	insectos/manguero			♂	♀	insectos/manguero			♂	♀			
				Promedio	Des st	N	+ Lso	N	+ Lso	Promedio	Des st	N	Lso	N	+ Lso	Promedio	Des st	N	+ Lso	N	+ Lso
Cogeces de Íscar	Valladolid	consumo	28/06/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,19	0,19	9	0	10	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Íscar	Valladolid	consumo	28/06/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,31	0,44	0	-	14	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Pedrajas de San Esteban	Valladolid	consumo	28/06/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,04	0,13	0	-	4	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Mozoncillo	Segovia	consumo	30/06/2016	0,01	0,03	1	0	0	-	0,34	0,22	18	6	16	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Escalona del Prado	Segovia	consumo	30/06/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-
Torregutiérrez	Segovia	consumo	30/06/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,47	0,18	14	0	33	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Vinaderos	Ávila	consumo	07/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,04	0,07	0	-	4	2	0,00	0,00	0	-	0	-
Nava de Arévalo	Ávila	consumo	07/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,02	0,04	2	0	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-
Cabizuela	Ávila	consumo	07/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-
Quintanilla del Agua	Burgos	consumo	21/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,01	0,03	0	-	1	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Tordomar	Burgos	consumo	21/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,04	0,07	0	-	4	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Cantalpino	Salamanca	consumo	28/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,02	0,06	0	-	2	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Pedrosillo del los Aires	Salamanca	consumo	28/07/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,07	0,13	3	0	4	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Lomoviejo	Valladolid	consumo	09/08/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,05	0,16	2	-	3	-	0,00	0,00	0	-	0	-
Velascálvaro	Valladolid	consumo	09/08/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,10	0,32	3	0	7	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Cabezón de Pisuerga	Valladolid	consumo	09/08/2016	0,00	0,00	0	-	0	-	0,01	0,03	0	0	1	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Cogeces de Íscar	Segovia	consumo	01/08/2017	0,03	0,05	0	-	3	1	0,22	0,20	10	0	12	0	0,04	0,07	0	-	2	0
Remondo	Segovia	consumo	01/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,05	0,05	1	0	4	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Chatún	Segovia	consumo	01/08/2017	0,02	0,04	1	0	1	1	0,04	0,05	3	0	2	0	0,02	0,04	0	-	1	0
Fuenteurbel	Burgos	siembra	03/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,07	0,08	0	-	7	1	0,00	0,00	0	-	0	-
Castresana	Burgos	siembra	03/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-
Dobro	Burgos	siembra	03/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-	0,00	0,00	0	-	0	-
Santa Mª de Mave	Palencia	siembra	17/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,27	0,25	11	0	16	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Villallano Fuencaliente de Valdelucio	Palencia	siembra	17/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,47	0,13	18	0	29	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Becerril de Carpio	Burgos	siembra	17/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,19	0,19	4	0	15	1	0,00	0,00	0	-	0	-
Becerril de Carpio	Palencia	consumo	17/08/2017	0,00	0,00	0	-	0	-	0,04	0,07	3	1	1	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Chañe	Segovia	consumo	12/07/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	0,16	0,16	4	0	12	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Cogeces de Íscar	Valladolid	consumo	12/07/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	0,03	0,05	0	-	3	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Remondo	Segovia	consumo	12/07/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	0,27	0,25	6	0	21	0	0,02	0,04	0	-	1	0
Campo de Cuéllar	Segovia	consumo	24/07/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	2,26	0,73	66	1	160	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Mave	Palencia	siembra	21/08/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	0,18	0,28	5	0	13	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Basconcillos del Tozo	Burgos	siembra	21/08/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	0,07	0,11	2	0	5	0	0,00	0,00	0	-	0	-
Villarén de Valdivia	Palencia	siembra	21/08/2018	0,00	0,00	0	-	0	-	0,03	0,07	2	0	1	0	0,00	0,00	0	-	0	-
N total				2 0 4 2						186 8 404 4						0 0 4 0					
% Lso por género				0,00 50,00						4,30 0,99						- 0,00					
% Lso por especie				33,3						2,03						0,00					

2.5. Discusión

ZC es un problema de gran importancia en el cultivo de la patata en aquellas zonas donde *B. cockerelli* está ampliamente distribuido, ya que se trata de un vector muy eficiente en este cultivo (Munyanza, 2015). Debido a que Castilla y León tiene una importante superficie de patata de consumo, siendo la principal comunidad productora de patata tardía de España, si se produjese una situación similar a la que se produce en zonas donde aparece *B. cockerelli* en patata, provocaría graves pérdidas económicas a los agricultores de este cultivo en la comunidad. Existe además el agravante de que se trata de una de las pocas comunidades productoras de patata de siembra lo que permitiría una mayor distribución de Lso, ya que se ha reportado transmisión a través de los tubérculos de siembra (Secor *et al.*, 2009). En el análisis de muestras positivas de Lso encontradas por Palomo *et al.* (2014) se puso de manifiesto la importancia de conocer la etiología y epidemiología de ZC en el cultivo de la patata en Castilla y León, de modo que permitiese desarrollar estrategias para frenar el avance del insecto y la bacteria, en el caso que fuese necesario.

La mayor parte de los síntomas descritos en los muestreos realizados en las plantas de patata son muy inespecíficos, encontrando muchas plantas con síntomas, y, sin embargo, muy pocas plantas positivas a Lso. Los tubérculos aéreos encontrados en plantas de una sola parcela, sí resultaron síntomas característicos de la enfermedad, ya que todas las plantas con esos síntomas resultaron portadoras de Lso. Se localizó una planta sin síntomas de ZC pero positiva para Lso, es decir, existe la posibilidad también de que haya plantas infectadas sin síntomas como ha ocurrido en otras zonas de producción en Europa (Haapalainen *et al.*, 2018a). El número de plantas localizadas con síntomas característicos y positivas a Lso ha resultado tan baja, que podemos decir que la incidencia de la enfermedad en cultivos de patata en Castilla y León puede considerarse mínima.

No se ha encontrado ningún ejemplar de *B. cockerelli*, por lo tanto, parece que tienen que ser otros vectores los responsables de la transmisión tal y como ya ha sido sugerido (Antolínez *et al.*, 2019). La especie mayormente encontrada ha sido *B. nigricornis*, que tiene hábitos polípagos. Según la base del Museo de Historia Natural de Londres (Ouvrard, 2021), las especies herbáceas donde se ha registrado la presencia de *B. nigricornis* son *Allium cepa* L. (Asparagales, Amaryllidaceae), *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales, Asteraceae), *Brassica* L. (Brassicales, Brassicaceae), *Brassica chinensis* L. (Brassicales, Brassicaceae), *Cirsium arvense* (L.) Scop. (Asterales, Asteraceae), *Daucus carota* L. (Apiales, Apiaceae), *Senecio vulgaris* L. (Asterales, Asteraceae), *Solanum* L. (Solanales, Solanaceae) y *Solanum*

tuberosum L. (Solanales, Solanaceae). La presencia de otras especies próximas como *B. trigonica* y de *B. tremblayi* ha sido testimonial, encontrándose principalmente en zonas de cultivo donde la patata comparte distribución geográfica con la zanahoria y el puerro. Según los estudios realizados sobre transmisión de Lso por *B. trigonica* en ensayos sin elección de cultivo con distintas especies hortícolas, el porcentaje máximo de plantas de patata infectadas por *B. trigonica* fue tan solo del 3 % (Antolínez *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta este porcentaje, y la presencia de esta especie en el cultivo de patata, no parece que *B. trigonica* sea la especie responsable de transmitir Lso de la zanahoria a la patata (Antolínez *et al.*, 2019).

B. nigricornis se ha encontrado ampliamente distribuida en el cultivo de patata de Castilla y León, ya que sólo en cuatro de las parcelas visitadas no se capturó ningún individuo. Los resultados de las capturas realizados en las lindes, en los que sólo se capturó un individuo de *B. nigricornis*, sugieren, que, a pesar de tratarse de una especie con hábitos polípagos, existe una preferencia por la patata cuando este cultivo se encuentra en el campo (Fathi *et al.*, 2008).

Los niveles de capturas fueron bajos, similares a los reportados por Antolínez *et al.* (2019) para la patata en España. Sin embargo, no ocurre así con el número de psílidos capturados en cultivos como zanahoria o apio en Europa (Teresani *et al.*, 2015, Antolínez *et al.*, 2019) o patata en EE.UU. (Munyanza *et al.*, 2009c), donde las capturas de estas especies son mucho mayores

En estudios realizados en *B. cockerelli* en los EE.UU. (Goolsby *et al.*, 2012), se encontró que menos del 10% de la población de campo de portaba Lso. Por el contrario, la proporción de la población de *T. apicalis* que albergaba Lso en Finlandia era del 61% al 67% (Munyanza *et al.*, 2011; Nissinen *et al.*, 2014). En ambos casos, los daños causados por Lso en esos cultivos son muy cuantiosos aun tratándose de haplotipos de Lso y huéspedes diferentes. Los datos sugieren que *T. apicalis* puede ser un vector de Lso menos eficiente que *B. cockerelli*, ya que la cantidad de bacteria requerida para la infección de la planta y el inicio del desarrollo de la enfermedad es mayor (Nissinen *et al.*, 2014). El porcentaje de individuos de *B. nigricornis* portadores de la bacteria ha resultado muy baja en nuestro estudio, siendo del 2% en el total de la especie, y del 4% en los machos y del 1% en las hembras. A pesar de que se desconoce la eficiencia en la transmisión de la bacteria de *B. nigricornis*, tanto las bajas capturas como la escasa presencia de Lso en los insectos explicarían la dificultad de encontrar ZC en los cultivos de patata de Castilla y León.

Un mayor número de hembras que de machos podría influir en la eficacia de la transmisión de Lso. Estudios realizados en *B. trigonica* demuestran que el porcentaje de transmisión no se ve afectado por el sexo del vector (Antolínez *et al.*, 2016), y los porcentajes de transmisión de Lso encontrados son similares para machos y hembras en el caso de *T. apicalis* (Nissinen *et al.*,

2014). Sin embargo, sí existe una interacción significativa entre el sexo, la cantidad de Lso y los daños ocasionados en las plantas. Las hembras, con mayores requerimientos nutricionales que los machos, aumentan el tiempo dedicado a la alimentación y también aumenta el tiempo durante el cual las hembras pueden adquirir y transmitir más cantidad de bacteria a las células del floema causando un daño superior en las plantas (Nissinen *et al.*, 2014).

A pesar de encontrarse algún ejemplar de *B. nigricornis* positivo a Lso en las zonas de patata de siembra, donde no hay cultivo de zanahoria próximo, la adquisición de la bacteria no parece ser que provenga de plantas silvestres. Tres de las especies encontradas han sido reportadas como plantas huéspedes de la bacteria: *Daucus carota* (Munyanzeza *et al.*, 2012c,d; Teresani *et al.*, 2014), *Pastinaca sativa* (Hajri *et al.*, 2017) y *Solanum dulcamara* (Cooper *et al.*, 2019), aunque el número de ejemplares encontrados y analizados ha sido testimonial. Cabe la posibilidad, teniendo en cuenta la dispersión de los psílidos que pueden recorrer grandes distancias por el viento (White 1970; Ashmole & Ashmole 1988), de que estos individuos provengan de zonas de patata de consumo, donde la zanahoria está asociada en muchos casos al cultivo de la patata, lo que explicaría la presencia de la bacteria en los individuos de *B. nigricornis* recogidos en los muestreos ocasionales de las parcelas de patata de siembra.

2.6. Conclusiones

B. nigricornis es el psílido mayormente distribuido en el cultivo de la patata de Castilla y León, apareciendo tanto en las zonas de patata de consumo como de siembra. Sin embargo, hay muy pocas plantas en las que se haya detectado la bacteria y muy pocos insectos portadores, lo que sugiere que ZC no es un problema grave. Considerando la proximidad de cultivos de patata a zanahoria en áreas de producción, *B. nigricornis* adquiriría la bacteria en zanahoria para posteriormente transmitirla a la patata. Por tanto, sería necesario estudiar si *B. nigricornis* es capaz de transmitir Lso de zanahoria a patata y si esa transmisión es muy eficaz.

Capítulo 3: Dinámica poblacional de los psílicos presentes en el cultivo de la patata de Castilla y León

Resumen

Zebra Chip es un problema de gran importancia en el cultivo de la patata en aquellas zonas donde *Bactericera cockerelli* está ampliamente distribuido. Teniendo en cuenta que sí se ha detectado el patógeno que provoca esta enfermedad en tubérculos de cosecha en Castilla y León, es importante qué psílicos se encuentran en este cultivo en esta comunidad y pueden ser posibles vectores de Lso. Además de identificar las posibles especies vectores, los objetivos planteados fueron estudiar en qué momentos del cultivo la población aparece y con qué abundancia, además del riesgo que pueden suponer como especies transmisoras de Lso. Para ello se realizó el seguimiento periódico de parcelas de patata utilizando distintos tipos de monitoreo, para posteriormente identificar las especies presentes y realizar el análisis para la detección de Lso en los insectos capturados. Al igual que en los muestreos ocasionales realizados en parcelas de la región de Castilla y León (capítulo 2), de nuevo, la especie de psílido que se encontró con mayor frecuencia en los cultivos de patata fue *Bactericera nigricornis*, tanto en los muestreos realizados en trampa Irwin como en las capturas con manga entomológica. La mayor parte de las capturas de *B. nigricornis* se producen entre los meses de junio y agosto, cuando el cultivo de la patata presenta mayor follaje. El pico poblacional máximo reportado en este estudio en los muestreos realizados con manga entomológica fue de 0,73 insectos/mangueo durante la campaña de 2018 en la localidad de Zamadueñas. En esta localidad se pudo constatar la existencia de la una población estable de psílicos de patata, que teniendo en cuenta las ninfas que habían evolucionado en el laboratorio, se trató de *B. nigricornis*. La parte más joven y más expuesta de la planta de patata es la que presenta un número mayor de formas inmaduras más juveniles (huevos y ninfas N1-N2). El porcentaje de *B. nigricornis* portadores de Lso encontrado fue del 3,01 %, porcentaje bajo si comparamos este porcentaje con otros psílicos vectores de esta bacteria.

Los niveles poblacionales encontrados de *B. nigricornis* no parecen suficientes para ser considerada plaga, y el número de individuos portadores de Lso es relativamente bajo como para que ZC sea un problema que cause daños reales en este cultivo

Palabras clave: *Bactericera* spp., *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), Zebra Chip (ZC), manga entomológica, trampas, huevos, ninfas.

3.1. Introducción

El clima es un elemento decisivo en la biología de los psílidos, principalmente la temperatura, la cual afecta a su presencia y desarrollo en los cultivos, afectando al número de generaciones, y en el potencial de daño que provocan en estos (Hodkinson, 2009).

Bactericera cockerelli (Sulc), vector de Lso en el cultivo de la patata, el período de duración promedio de huevo a ninfa en patata es de 5,5 días, alcanzando el estado de adulto en 27 días (Caudillo, 2010)., completando una sola generación entre tres y cinco semanas, según las condiciones de temperatura (Munyaneza *et al.*, 2012a). El desarrollo óptimo se produce a los 27 °C; mientras que la oviposición, eclosión, desarrollo y supervivencia se retardan o reducen a 32 °C, y cesan a partir de 35 °C (Munyaneza, 2012a), las mismas que son favorables a Lso y al desarrollo de los síntomas de ZC. En el campo, la llegada de adultos de *B. cockerelli* a las plantas de patata del noroeste de Nuevo México se produce cuando la temperatura del aire promedio es superior a 15 °C, con picos de población alrededor de 25 °C, que suele ocurrir entre los meses de junio y septiembre (Djaman *et al.*, 2019). Sin embargo, los adultos y las ninfas *B. cockerelli* son muy tolerantes al frío. Las ninfas sobreviven a la exposición a temperaturas de -15 °C y el 50% de los adultos sobreviven a la exposición a -10 °C durante 24 horas (Henne *et al.*, 2010b).

Trioza apicalis Förster es univoltino, con una sola solo una generación por año que se produce durante los meses de verano en los que se alimenta de zanahorias (Hodkinson, 2009). La siguiente generación será la que pase el invierno como adulto en coníferas, preferentemente en abetos (*Picea abies*) (Kristoffersen & Anderbrant, 2007). En estudios realizados en *T. apicalis* por Nissinen *et al.* (2020) se observó que en solo seis semanas desde que se inicia el vuelo del psílido se alcanzó el pico poblacional, lo que sugiere que las altas temperaturas en el mes de julio, momento en el que se encuentra el cultivo de la zanahoria en campo, aceleran el desarrollo de las ninfas y se solapan los vuelos de distintas generaciones. Se trata de especies que una vez que invaden un área, si las condiciones climáticas son favorables, la oviposición prolongada de los adultos hace que las generaciones se superpongan lo que dificulta la distinción entre generaciones (Pletsch, 1947, Wallis, 1955).

En estudios realizados en cultivo de zanahoria en zonas hortícolas españolas, los picos máximos de población de *B. trigonica* se produjeron durante los meses de junio a octubre, cuando las temperaturas medias son más altas en estas regiones (Antolínez *et al.*, 2019).

Existen estudios preliminares del ciclo de vida y la biología reproductiva del complejo “*Bactericera nigricornis* (Förster)” (Hodkinson, 1981; Ouvrard & Burckhardt, 2012), que comprende las especies *B. tremblayi* (Wagner), *B. nigricornis* (Förster) y *B. trigonica*

Hodkinson. En condiciones aisladas, de 21 °C, 60 % de humedad y fotoperiodo de 14:10, *B. tremblayi* en plantas de puerro tiene una supervivencia de adultos de 33 días en las hembras y 40 días en los machos y una sex ratio de 1:1, y el número medio de huevos por hembra es de 625 con una supervivencia del 90 %, completando el ciclo biológico en 25 días (Kazemi *et al.*, 2008). Las hembras de *B. trigonica* en plantas de zanahoria, a 25 °C, 70 % de humedad y fotoperiodo de 16:8, tienen una supervivencia media de 23 días, y los machos de 21 días con una sex-ratio de 1:2; el número medio de huevos por hembra es 194, con una tasa de supervivencia del 73 %, completándose el ciclo biológico en 20 días (Bastin *et al.*, 2015). Por último, estudios realizados por Fathi *et al.* (2011) en *B. nigricornis* sobre cuatro cultivares de patata, a 25 °C, con un 60 % de humedad y fotoperiodo 12:12, indican que esta especie completa su ciclo biológico entre 25 y 29 días, el promedio de huevos por hembra oscila entre 47 y 63 huevos, la longevidad de los adultos en machos está entre 13 y 16 días y de hembras entre 21 y 23 días, con una sex ratio entre 1:1,2 y 1:2.

Las horas de luz diarias parece que también afectan a los niveles de población de los psílidos. Rygg (1977) encontró en *T. apicalis* que la correlación positiva entre las capturas de trampas y las horas de luz solar era más fuerte en septiembre que en verano, a pesar de que las temperaturas son más bajas. Valterová *et al.* (1997) mostraron que cuando la duración del día es menor es cuando suele comenzar a surgir la nueva generación de *T. apicalis*. Este factor está además relacionado con la migración, ya que en la mayoría de las especies migratorias esta ocurre antes de la reproducción (Gatehouse, 1997).

En cuanto a los métodos de monitoreo de estas especies, se han utilizado varios métodos para la detección y el seguimiento de las poblaciones de psílidos, como trampas de succión, muestreo de plantas por vacío, muestreo con redes de barrido, inspección visual de material vegetal, trampas de agua horizontales (trampas Irwin) y trampas pegajosas de colores.

Las trampas de succión y los muestreos de plantas por vacío no han sido efectivos para detectar y muestrear *B. cockerelli* (Cranshaw, 1994; Goolsby *et al.*, 2007a,b). Sin embargo, las redes de barrido y las trampas adhesivas se han utilizado ampliamente (Pletsch, 1947; Cranshaw, 1994; Goolsby *et al.*, 2007a,b; Munyaneza *et al.*, 2009c; Djaman *et al.* 2019). Estos dos métodos también se han utilizado para *B. trigonica* y *B. nigricornis* (Ben Othnmen *et al.*, 2019; Antolínez *et al.*, 2019).

Las trampas de agua horizontales de color verde (Irwin, 1980) son eficaces para atrapar a los primeros inmigrantes en el caso de áfidos (Rygg, 1977) y para determinar qué especies se posan sobre el cultivo en busca de plantas hospederas. Este tipo de trampa fue utilizada por Antolínez

et al. (2019) para determinar qué especies de psílidos se posaban en los cultivos de zanahoria y patata.

Por último, la inspección visual de plantas proporciona información detallada sobre la densidad de población de la plaga, así como la capacidad del psílido de completar su ciclo en el cultivo. Se ha utilizado para *B. cockerelli* (Cranshaw & Hein, 2004; Goolsby *et al.*, 2007a,b) *B. trigonica* (Ben Othmen *et al.*, 2018; Antolínez *et al.*, 2019) y *B. nigricornis* (Ben Othmen *et al.*, 2019). La inspección visual permite la observación de las formas inmaduras en el cultivo: huevos y ninfas (Figura 3.1.). Generalmente los huevos son depositados en el envés o márgenes de las hojas y se localizan en el follaje más tierno de la planta. En general, los estadios ninfales son de coloraciones verdoso-amarillento brillantes. El cambio más evidente entre los estadios ninfales es el tamaño y color, desarrollo de los primordios alares e incremento de las glándulas de cera en el margen de su cuerpo (Caudillo, 2010).

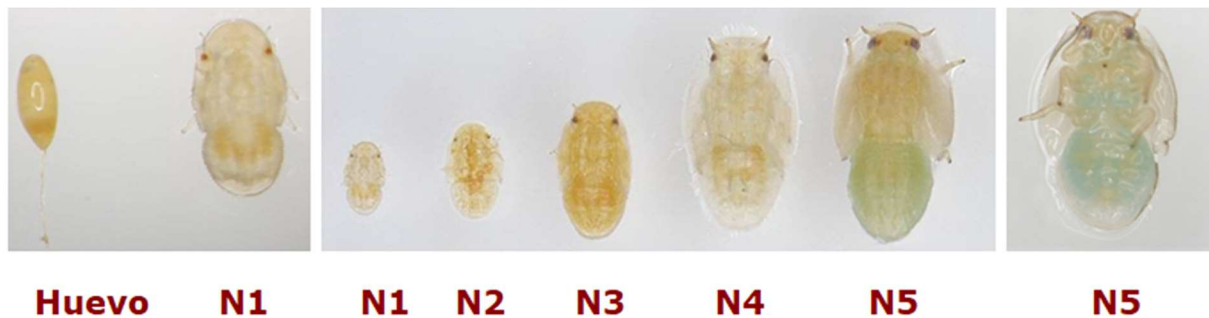


Figura 3.1. Formas inmaduras de *Bactericera trigonica*: huevo y estadios ninfales: ninfas N1, N2, N3, N4 y N5 (ICIA)

3.2. Objetivos

La aparición de una o varias especies de psílidos portadores de Lso que utilizaran la patata como huésped para completar su desarrollo, supondría un grave riesgo en este cultivo en Castilla y León por la posible dispersión de la enfermedad conocida como ‘Zebra Chip’. Por tanto, es necesario conocer qué psílidos se encuentran en este cultivo, estudiar en qué momentos del cultivo la población aparece y con qué abundancia, a través de su dinámica poblacional, además del riesgo que pueden suponer como transmisores de Lso. Para ello se realizó el seguimiento de parcelas de patata utilizando distintos tipos de monitoreo que permitieran identificar y cuantificar a estos insectos en distintos momentos del cultivo, se identificaron las especies presentes y se realizaron análisis para la detección de Lso sobre los propios insectos capturados.

3.3. Material y métodos

3.3.1. Localización de las parcelas de patata para el monitoreo de psílicos.

Las localidades seleccionadas para el monitoreo de los psílicos, fueron Zamadueñas (Valladolid), zona tradicional del cultivo de patata, y Gomezserracín (Segovia), situada en la zona de tradición hortícola de Castilla y León, que tenía colindantes parcelas de zanahoria y puerro. Los datos de siembra y cosecha de cada una de las parcelas aparecen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Localización de las parcelas de patata donde se realizó el monitoreo de los psílicos durante las campañas 2016, 2017 y 2018.

Año	Localidad	Provincia	Superficie (ha)	Siembra	Cosecha
2016	Gomezserracín	Segovia	1,10	19 de mayo	Octubre
2016	Zamadueñas	Valladolid	0,14	14 de abril	20 de septiembre
2017	Zamadueñas	Valladolid	0,15	5 de abril	22 de septiembre
2018	Zamadueñas	Valladolid	0,21	3 de mayo	24 de septiembre

3.3.2. Estudio de la dinámica poblacional de psílicos mediante el uso de trampas adhesivas amarillas.

El monitoreo realizado mediante trampas amarillas se realizó en el año 2016 en las dos localidades de estudio: Gomezserracín y Zamadueñas. En cada parcela se dispusieron 9 trampas amarillas adhesivas, en forma de rejilla de de 3 x 3 con distancia entre los puntos de 10 m de lado (Figura 3.2.). Estas trampas eran pegajosas por ambos lados, de 25 cm de alto por 10 cm de ancho, y se colocaron a 0,5 m sobre el suelo en una estaca de madera para la captura de adultos de psílicos. El muestreo se realizó desde el momento de emergencia de las plantas hasta la senescencia de las mismas. Las trampas se recogieron con una periodicidad de 7-10 días y se observaron psílicos en las trampas adhesivas bajo lupa binocular, contando el número de individuos del género *Bactericera* spp.

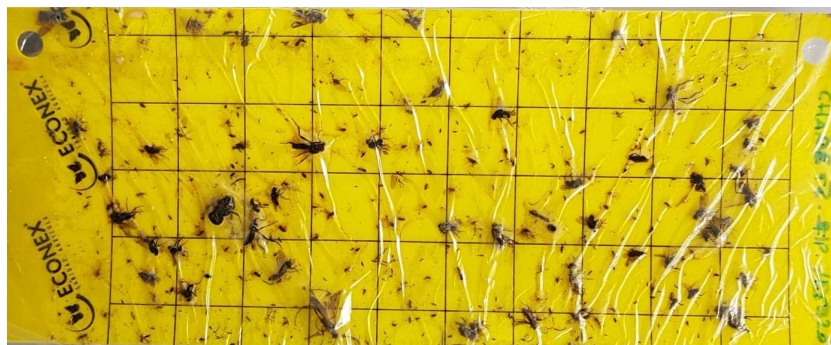


Figura 3.2. Trampa adhesiva amarilla

3.3.3. Estudio de la dinámica poblacional de psílicos mediante el uso de trampas Irwin.

Durante los años 2017 y 2018 se dispuso de una trampa de agua horizontal de color verde (trampa Irwin) en un cultivo de patata de la localidad de Zamadueñas (Valladolid). Se utilizó una trampa de metacrilato (16,5 × 16,5 × 4,5 cm) con una loseta de cerámica de color verde (15,5 × 15,5 cm) dentro del contenedor (Cambridge 815 de Cambridge tile C., PO Box 15071, Cincinnati, OH 46215, EE. UU.) (Figura 3.3.). El interior de la trampa de metacrilato se llenó de una solución al 50 % de etilenglicol en agua. La trampa se colocó a la altura de la planta (Antolínez *et al.*, 2019). La recogida de insectos se realizó cada 7-10 días. Los insectos recolectados se conservaron en etanol al 70 % hasta su identificación en lupa binocular, distinguiendo por sexo y por especie (Hodkinson, 1981; Ouvrard & Burckhardt, 2012).



Figura 3.3. Trampa de agua horizontal de color verde (trampa Irwin)

3.3.4. Estudio de la dinámica poblacional de psílicos mediante el empleo de manga entomológica

Durante el año 2016 en la localidad de Gomezserracín (Segovia) y durante las campañas 2016, 2017 y 2018 en la localidad de Zamadueñas (Valladolid), se procedió al muestreo de adultos mediante manga entomológica (Figura 3.4.). Los muestreos se realizaron con una manga entomológica plegable telescópica cada 7-10 días. Cada muestra consistió en diez barridos consecutivos en diez puntos diferentes, para obtener un total de diez muestras por campo y fecha. Cada muestra se colocó en una bolsa de plástico con cierre hermético y se almacenó en el laboratorio a -20 °C durante 48 h. A partir de ese momento las muestras se conservaron en tubos con etanol al 70 %, hasta el momento de su identificación por sexo y especie (Hodkinson, 1981; Ouvrard & Burckhardt, 2012).



Figura 3.4. Muestreo mediante manga entomológica en campo.

3.3.5. Estudio de la presencia de las formas inmaduras de psílidos en la planta.

Durante el año 2016 se realizó una inspección visual de plantas para la evaluación de las etapas de desarrollo de los psílidos en las dos localidades: Zamadueñas (Valladolid) y Gomezserracín (Segovia). La inspección visual de las plantas se realizó cada 7-10 días, para detectar la presencia de huevos y ninfas de psílidos en 20 plantas. La inspección se llevó a cabo desde la emergencia de las plantas hasta el momento de la senescencia. En cada fecha de observación se seleccionaron al azar 20 plantas en la parcela, y se contó el número de huevos y ninfas encontrados en cada planta.

Durante el mes de julio se recogieron 17 ninfas de los estadios N4 y N5 con brotes de la planta, fueron introducidas en tubos plásticos y mantenidas en el laboratorio para permitir su desarrollo en condiciones ambientales controladas. Los adultos de psílidos que evolucionaron en laboratorio a partir de plantas de patata se identificaron hasta nivel de especie.

3.3.6. Evaluación de la distribución de las formas inmaduras dentro de la planta

Entre el 27 de julio y el 17 de agosto de 2016, una vez que se había puesto de manifiesto que existía una población de psílidos estable dentro de la parcela de la localidad de Zamadueñas (Valladolid), se evaluó la distribución y preferencia de las formas inmaduras dentro de las plantas. El muestreo se realizó en 20 plantas de cinco variedades de patata: Agria, Baraka, Kennebec, Red Pontiac y Spunta. En cada planta se seleccionaron tres hojas, del tercio superior (hoja joven), del tercio medio y del tercio inferior (hoja más vieja), contabilizando en cada una de ellas los huevos, ninfas N1-N2 y ninfas N3-N5.

Para el tratamiento de los datos se realizó el análisis de la varianza mediante el programa R (<http://cran.r-project.org/>), estudiando los factores: variedad y hoja en las variables huevos,

ninfas N1-N2 y N3-N5. La separación de medias para cada factor estudiado se hizo mediante la prueba HSD de Tukey con un nivel de significación del 5%.

3.3.7. Extracción de ADN en psílidos y detección de Lso

Los individuos adultos capturados mediante manga entomológica y trampa Irwin se analizaron individualmente para la detección de la bacteria (Figura 3.5.). La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo Chelex de un solo paso según Casquet *et al.* (2012).

El análisis para la detección de Lso se realizó utilizando el PlantPrint Detection Kit por Real Time PCR (Taqman) que usa condiciones, cebadores y sondas descritos por Teresani *et al.* (2014).



Figura 3.5. Extracción de ADN de los psílidos capturados

3.4. Resultados

3.3.1. Dinámica poblacional de psílidos mediante el uso de trampas adhesivas amarillas

Los insectos recogidos en las trampas amarillas solo pudieron identificarse a nivel de género, no distinguiendo entre las tres especies del complejo *Bactericera nigricornis* Föster. Las capturas con este tipo de muestreo fueron las más altas de todos los métodos de monitoreo que se utilizaron para el estudio de la dinámica de los psílidos en el cultivo de patata, debido al efecto atrayente de estas trampas.

En cuanto a las localidades, las capturas de las trampas amarillas de la localidad de Gomezserracín (Segovia) fueron más altas que las de la localidad de Zamadueñas (Valladolid) alcanzando el pico poblacional a finales de agosto ($684,67 \pm 322,57$ insectos / trampa) (Figura

3.6.). Los niveles de capturas de las trampas de Zamadueñas (Valladolid) fueron más bajos, con el pico de población ($226,67 \pm 38,71$ insectos / trampa) a principios de julio.

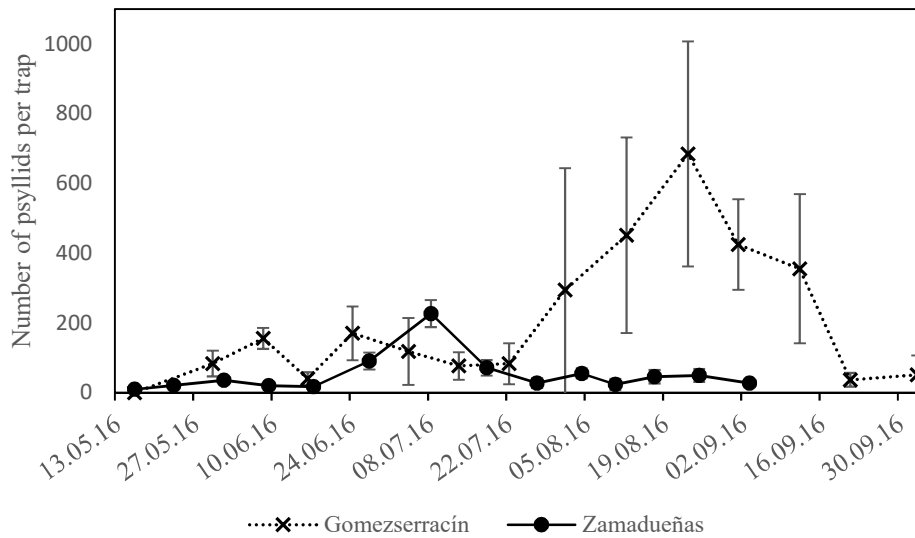


Figura 3.6. Promedio de insectos capturados en las trampas amarillas de las localidades de Zamadueñas (Valladolid) y Gomezserracín (Segovia) en el año 2016.

3.3.2. Dinámica poblacional de psílidos mediante el uso de trampas Irwin.

La trampa Irwin ubicada en Zamadueñas (Valladolid) en 2017 y 2018 (Figura 3.7.) fue el método de monitoreo que registró un menor número de capturas. En 2017 se capturaron un total de 25 psílidos, todos ellos identificados como *B. nigricornis* (Tabla 3.3.). El mayor número de capturas (14 ejemplares) se produjo al inicio de la temporada (23/05/2017) y a finales de junio (9 ejemplares). En 2018 no se capturó ningún psílido

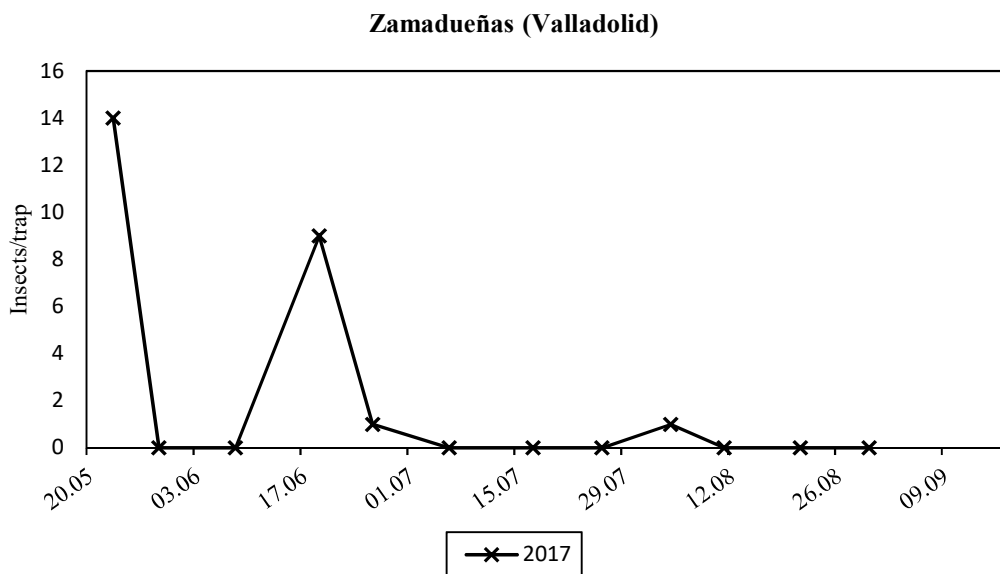


Figura 3.7. Número de insectos capturados en la trampa Irwin por fecha en la localidad de Zamadueñas (Valladolid) en 2017.

3.3.3. Dinámica poblacional de psílidos mediante el empleo de manga entomológica

La mayoría de los psílidos adultos capturados en el cultivo de patata mediante muestreo con manga entomológica en las dos localidades, Gomezserracín y Zamadueñas, fueron identificados como *B. nigricornis* (Figuras 3.8 a 3.11), pero también se capturó *B. trigonica* en el año 2016. En este año 2016 en la localidad de Gomezserracín, 71 insectos fueron identificados como *B. trigonica* (51 machos y 20 hembras), y 15 individuos de esta especie (8 machos y 7 hembras) fueron capturados en Zamadueñas. *B. tremblayi* no se capturó en ningún caso.

En cuanto a la dinámica de los psílidos en la localidad de Gomezserracín (Segovia) en 2016, donde se habían recogido ambas especies, *B. nigricornis* y *B. trigonica*, los primeros psílidos aparecieron a finales de junio. El nivel de población de *B. nigricornis* fue bajo durante toda la temporada y la población de *B. trigonica* alcanzó un pequeño pico de 0,25 insectos/mangueo a fines de agosto (Figura 3.8).

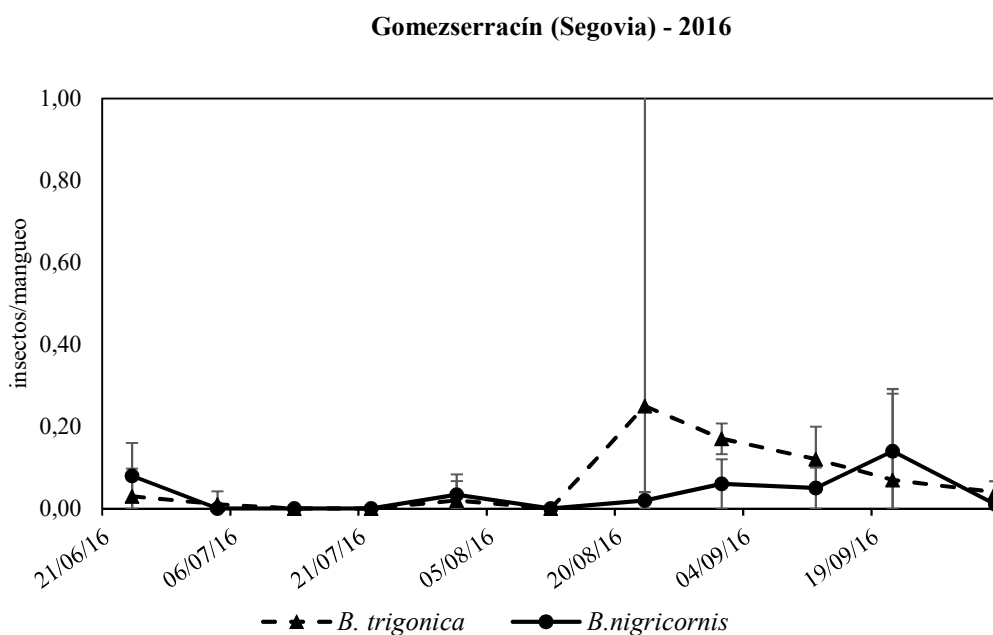


Figura 3.8. Promedio de insectos capturados por mangueo de *B. trigonica* y *B. nigricornis* en los muestreos periódicos realizados en Gomezserracín (Segovia) en 2016.

En la localidad de Zamadueñas (Valladolid) en 2016 en 2017, los niveles de población de *B. nigricornis* también fueron bajos durante toda la temporada (Figuras 3.9 y 3.10). Cabe señalar que la aparición más temprana en los campos de patata ocurrió el 23/05/2017 (Figura 3.10). En 2018 el primer psílido apareció a mediados de junio con un pico poblacional máximo a principios de julio (número medio de psílidos por mangueo $0,73 \pm 0,41$) (Figura 3.11). Los individuos de *B. trigonica* en esta localidad solamente aparecieron a finales de junio y principios de julio en 2016 (Figura 3.9.).

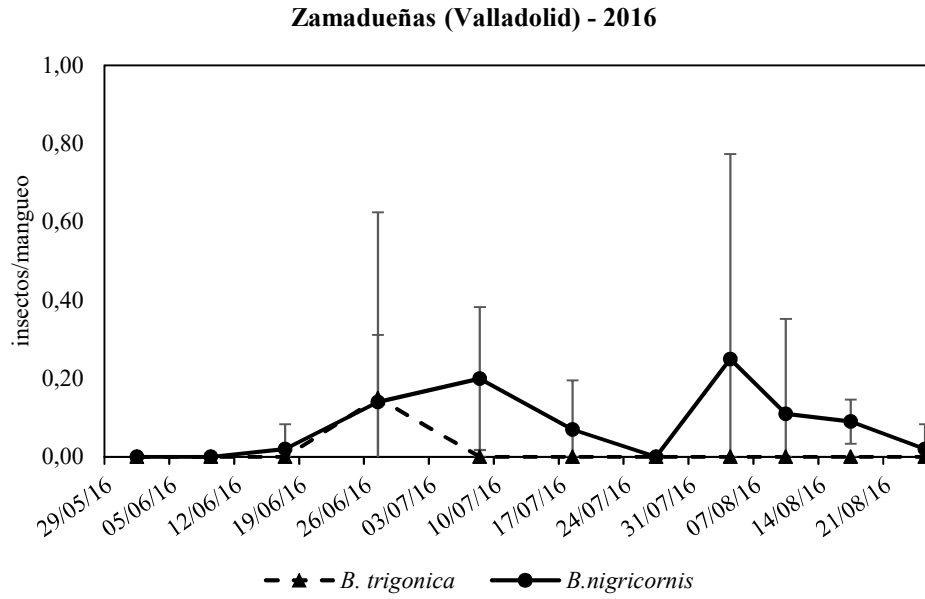


Figura 3.9. Promedio de insectos capturados por mangueo de *B. trigonica* y *B. nigricornis* en los muestreos periódicos realizados en Zamadueñas (Valladolid) en 2016.

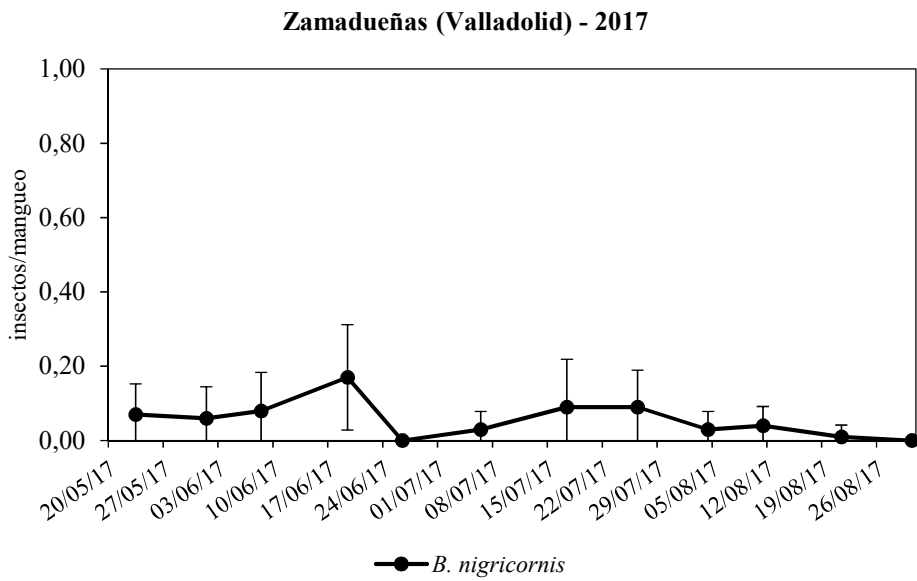


Figura 3.10. Promedio de insectos capturados por mangueo de *B. trigonica* y *B. nigricornis* en los muestreos periódicos realizados en Zamadueñas (Valladolid) en 2017.

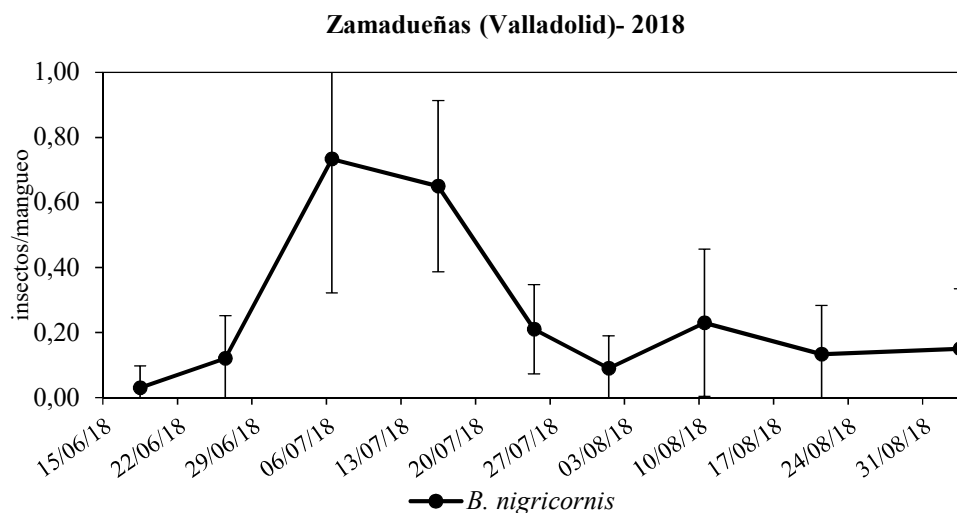


Figura 3.11. Promedio de insectos capturados por manguero de *B. trigonica* y *B. nigricornis* en los muestreos periódicos realizados en Zamadueñas (Valladolid) en 2018.

3.3.4. Presencia de las formas inmaduras de psílidos en la planta.

En cuanto al seguimiento de las formas inmaduras del insecto en las plantas en el ensayo de Gomezserracín de 2016, cabe destacar que durante toda la campaña hubo muy pocos huevos y ninfas, apareciendo sobre todo al final (Figura 3.12), siendo imposible la identificación de la especie.

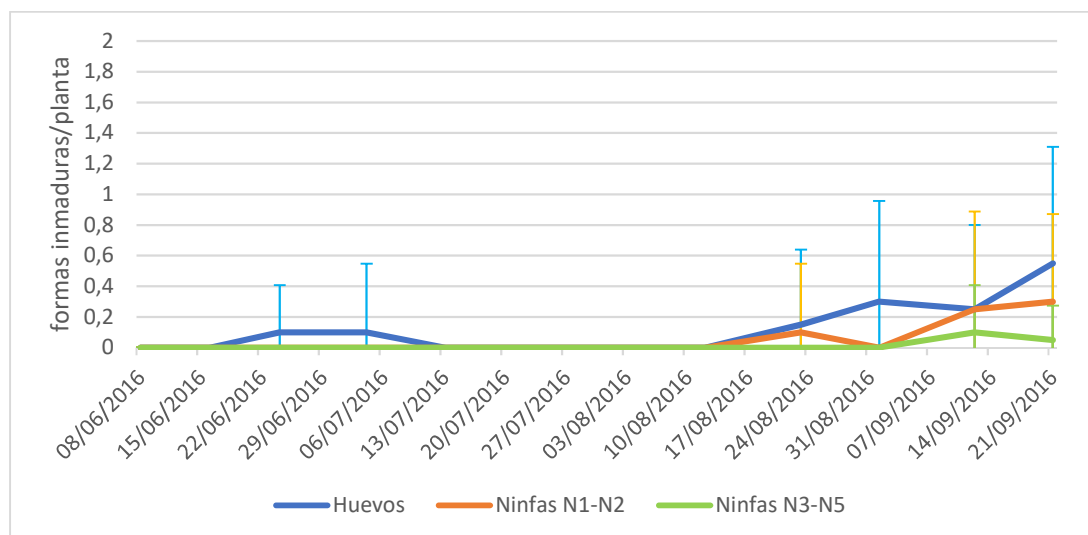


Figura 3.12. Evolución de las medias por planta (20 plantas) de los huevos y ninfas de psílidos localizadas en el ensayo de patata de Gomezserracín (Segovia) en 2016.

A diferencia del ensayo de Gomezserracín, en Zamadueñas sí se encontraron huevos y ninfas en las plantas de patata (Figura 3.13) de forma regular, poniendo de manifiesto una población estable de psílidos que utiliza la patata como huésped.

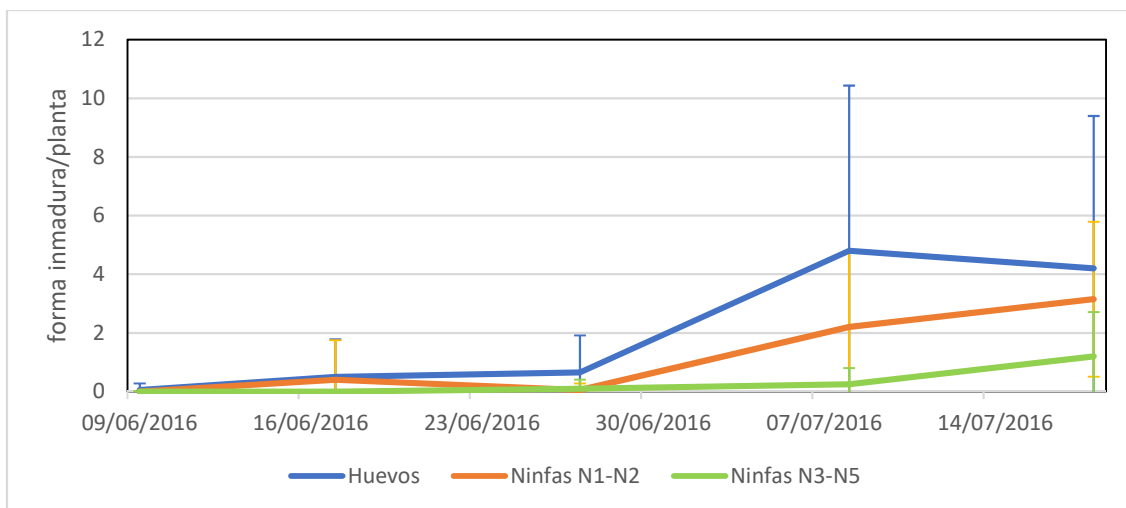


Figura 3.13. Evolución de las medias por planta (20 plantas) de los huevos y ninfas de psílidos localizadas en el ensayo de patata de Zamadueñas (Valladolid) en 2016.

De las ninfas N4 y N5 recogidas en Zamadueñas se obtuvieron 17 adultos que evolucionaron en el laboratorio siendo todas identificadas como *B. nigricornis*.

3.3.5. Evaluación de la distribución de las formas inmaduras dentro de la planta

Los resultados indican que el insecto no mostró preferencia por ninguna de las variedades estudiadas (Tabla 3.2.), sin embargo, sí se encontraron diferencias en las hojas evaluadas en los huevos y en las ninfas N1-N2, mostrando valores mayores en las hojas jóvenes (Tabla 3.3.).

Tabla 3.2. Valores de DF, F valor y P valor para los factores variedad y posición de la hoja para las variables dependientes huevos, ninfas N1-N2 y N3-N5 de psílidos en patata en el ensayo de Zamadueñas (2016).

		DF	F valor	P valor
Variedad	Huevos	3	1,05	0,37
	N1-N2	3	0,17	0,91
	N3-N5	3	1,1	0,35
Hoja	Huevos	2	6,97	0,001
	N1-N2	2	10,12	6,15E-05
	N3-N5	2	0,05	0,94

*Los datos son diferentes significativamente si P valor<0,05

Tabla 3.3. Número de huevos, ninfas N1-N2 y N3-N5 por hoja para cada posición de la planta.

	Huevos		Ninfas N1-N2		Ninfas N3-N5	
<i>Hojas superiores</i>	0,35	a	0,56	a	0,31	a
<i>Hojas medio</i>	0,21	ab	0,19	b	0,15	a
<i>Hojas inferiores</i>	0,08	b	0,16	b	0,14	a

*Letras diferentes indican diferencias significativas en la población (N/planta) según el test HSD de Tukey, p<0.05.

3.3.6. Detección de Lso en los insectos capturados

El análisis de Lso en psílidos del género *Bactericera* spp. en los ensayos en los que se realizó el monitoreo de forma periódica, mostró que el número de individuos de *B. nigricornis* portador

de Lso fue muy bajo tanto en machos como en hembras (Tabla 3.4.), detectándose la bacteria en 7 machos y 6 hembras de un total de 440 insectos evaluados. Sin embargo, *B. trigonica* mostró mayores porcentajes de individuos Lso + siendo 64% en machos y 62% en hembras.

Tabla 3.4. Número de individuos totales por especie y género, y positivos en Lso capturados en los mangueros y en la trampa Irwin de las localidades de Gomezerracín (Segovia) y Zamadueñas (Valladolid) durante los años 2016, 2017 y 2018.

Localidad	Provincia	Año	Método de muestreo	<i>Bactericera nigricornis</i>					<i>Bactericera trigonica</i>				
				Total	♂	+ Lso	♀	+ Lso	Total	♂	+ Lso	♀	+ Lso
Gomezerracín	Segovia	2016	Manguero	39	11	1	28	2	71	51	34	20	15
Zamadueñas	Valladolid	2016	Manguero	88	26	0	62	0	15	8	4	7	3
Zamadueñas	Valladolid	2017	Irwin trap	23	14	6	9	2	0	0	-	0	-
Zamadueñas	Valladolid	2017	Manguero	64	17	0	45	0	2	0	-	2	1
Zamadueñas	Valladolid	2018	Irwin trap	0	0	-	0	-	0	0	-	0	-
Zamadueñas	Valladolid	2018	Manguero	226	91	0	135	2	1	0	-	1	0
N total				440	159	7	279	6	89	59	38	30	19
% Lso por género						4,48		2,20		64,41		61,67	
% Lso por especie								3,01					63,48

3.4. Discusión

El estudio de la dinámica poblacional de los psílicos en cultivos de patata nos reporta información sobre los niveles de población a lo largo del ciclo de cultivo y, por tanto, del riesgo de que alguna de estas especies se convierta en plaga, o pueda llegar a causar daños graves con la transmisión de patógenos de los que son portadores. Existen trabajos previos con las especies de psílicos presentes en el cultivo de patata de la Península Ibérica (Teresani *et al.*, 2014; Antolínez *et al.*, 2019), donde se detectaron dos especies del grupo *Bactericera nigricornis* Förster (Hodkinson, 1981): *B. trigonica* y *B. nigricornis*.

Al igual que en los muestreos ocasionales realizados en parcelas de la región de Castilla y León (capítulo 2), de nuevo, la especie de psílido que se encontró con mayor frecuencia en los cultivos de patata fue *B. nigricornis*, tanto en los muestreos realizados en trampa Irwin como en los mangueros realizados periódicamente. En la localidad de Gomezerracín, debido a la cercanía de la parcela a otros cultivos hortícolas como la zanahoria o el puerro, se encontraron las otras especies de psílicos del complejo *Bactericera nigricornis* (Forster) (Hodkinson, 1981) en forma de adultos, especialmente en la época de la cosecha de la zanahoria, momento en el que *B. trigonica* busca nuevos campos donde alimentarse y colonizar. Los datos de las trampas amarillas de Gomezerracín (máximo de 685 psílicos/trampa cada 10 días a finales de agosto) sugieren una alta población de individuos del género *Bactericera* spp. superiores a los encontrados en Zamadueñas (máximo de 227 psílicos/trampa cada 10 días a principios de julio). Sin embargo, el dato de las capturas realizadas con manga entomológica, en el que sí se puede identificar a nivel de especie, identifica *B. trigonica* como la especie predominante en

Gomezerracín, psílido asociado al cultivo de zanahoria que está ampliamente distribuido en la provincia de Segovia (Figura 3.8.). Sin embargo, por la escasa presencia de formas inmaduras de psílicos en las plantas de patata en Gomezerracín, es probable que esta especie no sea capaz de completar su ciclo en este cultivo. En estudios realizados en condiciones aisladas, se observó que el asentamiento y oviposición de *B. trigonica* en patata es muy bajo, incluso cuando no tiene elección, prefiriendo asentarse y ovipositar en cultivos de Apiáceas frente a plantas de patata (Antolínez *et al.*, 2017). *B. trigonica* es una especie que no puede alimentarse de forma sostenida de los tejidos del floema y por lo tanto no puede colonizar la patata (Antolínez *et al.*, 2017).

Esta presencia de *B. nigricornis* en el cultivo de la patata en la Península Ibérica, se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores (Antolínez *et al.*, 2019). En el norte de Europa, *B. nigricornis* ha sido solamente observada en Finlandia y se trata de referencias muy antiguas (Haapalainen *et al.*, 2018a). La clave taxonómica del grupo *Bactericera nigricornis* Förster realizada por Hodkinson (1981) es posterior y por tanto es posible que no se trate de esta especie. En la región de Arbadil en Irán, *B. nigricornis* está considerada plaga en patata (Fathi *et al.*, 2008), observando descensos en el rendimiento de las patatas infectadas en campo con *B. nigricornis* y tubérculos con necrosis rayadas en la sección transversal del tubérculo. Sin embargo, no se ha estudiado la capacidad de transmisión de Lso de *B. nigricornis* en este cultivo.

El pico poblacional máximo reportado en este estudio en los muestreos realizados con manga entomológica fue de 0,73 insectos/manguero durante la campaña de 2018 en Zamadueñas, un número bajo comparado con otras especies de psílicos relacionadas que sí causan graves daños al cultivo huésped, tanto por la alimentación sobre él como por la transmisión de Lso. Tal es el caso de *B. trigonica*, con 35 insectos/manguero en Íscar (Antolínez *et al.*, 2019) y en *B. cockerelli* con 3 insectos/manguero en EE.UU. (Munyanza *et al.*, 2009c). En Zamadueñas, la especie mayoritaria recogida en los mangueros fue *B. nigricornis*, lo que sugiere que el pico máximo registrado de 227 individuos/trampa pegajosa amarilla cada 10 días correspondería mayoritariamente a esta especie. Estos valores no difieren mucho de los obtenidos por Nissinen *et al.*, (2020) para *T. apicalis* en este tipo de trampas, con 100 especímenes/trampa y semana, pero quedan lejos de alcanzar los niveles de 500 individuos/trampa y semana reportados por Haapalainen *et al.* (2018a) también para *T. apicalis*, o los 300 individuos por semana obtenidos para *B. cockerelli* en el norte de EE.UU (Munyanza *et al.*, 2009c).

La mayor parte de las capturas de *B. nigricornis* se producen entre los meses de junio y agosto, cuando el cultivo de la patata presenta mayor follaje. A partir del mes de agosto, cuando

comienza la senescencia del cultivo, la población disminuye. Esta aparición de *B. nigricornis* desde los meses de junio hasta finales de agosto coincide con los datos de Antolínez *et al.* (2019) en monitoreos periódicos realizados en cultivo de patata de la localidad de Aldearrubia (Salamanca) durante las campañas 2016-2017. En estudios realizados en cultivos de patata en el estado de Washington en EE. UU. desde 2005-2008, donde el ciclo del cultivo de la patata coincide con el de las condiciones de Castilla y León, *B. cockerelli* llegó al cultivo a finales de julio, con picos a finales de agosto hasta finales de septiembre (Munyanza *et al.*, 2009c).

La presencia de formas inmaduras en las plantas en los muestreos realizados en Zamadueñas en 2016, donde la especie mayormente encontrada en el monitoreo con manga entomológica fue *B. nigricornis*, va aumentando con el crecimiento del cultivo hasta llegar a un máximo ($0,25 \pm 0,52$ insectos/mangueo) en el mes de julio coincidente con el máximo de capturas de adultos en trampa amarilla y en los mangueos. Esta sincronización se observa también en otros psíidos como *B. cockerelli* o *B. trigonica* (Cameron *et al.*, 2009; Munyanza *et al.*, 2009c; Antolínez *et al.*, 2019). Los valores de huevos y ninfas encontrados en la localidad de Zamadueñas, hacen pensar que se trata de valores bajos de infestación de la plaga. En *B. trigonica* el valor de formas inmaduras (huevos y ninfas) encontrados por planta de zanahoria en la localidad de Villena (Alicante) fue superior a 50 a finales de agosto, y en las localidades de Íscar y Gomezserracín este valor osciló entre 21-50 (Antolínez *et al.*, 2019). En cultivos de patata de Nueva Zelanda y EE. UU., *B. cockerelli* llegó a valores de 3 y 4 formas inmaduras/hoja, respectivamente (Cameron *et al.*, 2009; Munyanza *et al.*, 2009c). A pesar de esta escasa presencia en las plantas sí se puede constatar la existencia de una población estable de psíidos en cultivos de patata en la Península Ibérica. Aunque los datos son escasos, los valores de ninfas N3-N5 comparados con los de huevos y ninfas N1-N2, parecen indicar que la supervivencia de huevos y ninfas de los primeros estadios son inferiores a los reportados para otras especies del grupo en ambiente controlado (Kazemi *et al.*, 2008; Fathi *et al.*, 2011; Bastin *et al.*, 2015), lo cual sugeriría un efectivo control biológico por enemigos naturales y/o una baja tasa de supervivencia y por tanto, una falta de adaptación a las condiciones ambientales del cultivo. Los adultos que emergieron de las ninfas recogidas en campos de patata, fueron identificados en su totalidad como *B. nigricornis*, lo cual confirma que esta especie es la única capaz de reproducirse y completar ciclo sobre este cultivo.

Las parte más joven y más expuesta de la planta de patata es la que presenta un número mayor de formas inmaduras más juveniles (huevos y ninfas N1-N2), zona donde se produciría la mayor oviposición de las hembras. Esta preferencia por las partes superiores de la planta también se observa en especies como *B. cockerelli* (Butler & Trumble, 2012). En *T. apicalis* las hembras,

que en los psílicos suelen ser más receptivas a la emisión de volátiles que los machos (Blackmer & Cañas, 2005), elegían aquellas plantas que mostraban una mayor intensidad de luz, y por tanto una mayor fotosíntesis y emisión de volátiles (Nissinen *et al.*, 2008). Esta preferencia por las hojas más jóvenes podría deberse a una mayor concentración de carbohidratos, fuente de alimentación del psílido (Hodkinson, 2009), lo que explicaría también que fuese en esta zona más joven de la planta donde se detectase con mayor frecuencia la aparición de la bacteria, frente a aquellas hojas situadas en la parte media e inferior de la planta (Levy *et al.*, 2011).

El porcentaje de *B. nigricornis* portadores de Lso es muy baja (3,01 %), si comparamos este porcentaje con otros psílicos vectores de esta bacteria. En poblaciones de *B. cockerelli* en EE.UU. (Goolsby *et al.*, 2012) se encontró que menos del 10% de la población de campo portaba Lso. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio en individuos de *B. trigonica* capturados en cultivo de patata muestran un porcentaje del 63.5 %, porcentaje próximo al reportado en estudios realizados en individuos de esta misma especie capturados en cultivo de zanahoria de Castilla y León, que llegó a alcanzar valores del 75 % (Asensio *et al.*, 2019b). En *T. apicalis* en Finlandia los valores obtenidos fueron del 61% al 67% (Munyanza *et al.*, 2011; Nissinen *et al.*, 2014).

Los valores registrados en este trabajo tanto en las trampas amarillas, como en las capturas con manga entomológica y en la inspección visual de las formas inmaduras en planta sugerirían un alto riesgo para el cultivo en especies como *B. cockerelli* en patata y *T. apicalis* en zanahoria, ya que habrían superado los umbrales mínimos de tratamiento para el manejo integrado de la plaga (Kogan, 1998; Tiilikka *et al.*, 1996; Cameron *et al.*, 2009; Nissinen *et al.*, 2020). Sin embargo, para *B. nigricornis* en patata en Castilla y León, no se han reportado daños importantes por ZC, lo cual sugeriría que existen otros factores, como la tasa de reproducción de la especie y la capacidad de transmisión de la bacteria, que no son suficientemente altos en *B. nigricornis* para causar graves daños en este cultivo. En este trabajo los muestreos con manga entomológica resultaron muy eficaces para el muestreo de los insectos, ya que han permitido la identificación a nivel de especie y posterior análisis de Lso, además de evaluar la población de individuos adultos a lo largo del ciclo de cultivo. Sin embargo, el tiempo y el entrenamiento necesarios para llevar a cabo la identificación, hacen que sea un método inviable de cara a un seguimiento masivo de los cultivos por parte de los productores. Con este propósito, se han utilizado ampliamente las trampas adhesivas amarillas (Pletsch, 1947; Cranshaw, 1994; Goolsby *et al.*, 2007a, b; Djaman *et al.*, 2019; Munyanza *et al.*, 2009c), ya que resultan muy útiles para detectar los picos de población adulta y son fáciles de manejar, aunque no se pueden identificar los individuos a nivel de especie, solamente a nivel de género, y ejercen atracción

sobre los insectos, recogiendo individuos que no se encuentren propiamente en la parcela de muestreo. Por otro lado, la inspección visual ha proporcionado información detallada sobre la densidad de población de formas inmaduras de esta plaga en planta. Se trata de un método tedioso en campo, pero permite conocer la instalación de la plaga en el cultivo, y dentro de este trabajo, ha permitido observar por primera vez el desarrollo de *B. nigricornis* en el cultivo de patata, en el que ha conseguido completar el ciclo. Por último, las trampas Irwin, han sido utilizadas para atrapar a los primeros inmigrantes en una parcela y estudiar qué especies prueban a instalarse en el cultivo (Rygg, 1977), no han resultado muy eficaces, ya que apenas han capturado individuos, y no permiten observar la evolución de la población.

Hasta ahora se había detectado la presencia de *B. nigricornis* en el cultivo de patata, sin embargo, con la evolución en el laboratorio de las formas inmaduras de los psílicos recogidos en campo, se comprueba su capacidad de completar su ciclo en él.

3.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la única especie de psílido capaz de transmitir Lso en cultivos de patata en la Península Ibérica es *B. nigricornis*, ya que es la especie predominante en las capturas realizadas, y la única capaz de completar el ciclo vital sobre este cultivo. Sin embargo, los niveles poblacionales encontrados no parecen suficientes para ser considerada plaga, y el número de individuos portadores de Lso es relativamente bajo como para que ZC sea un problema que cause daños reales en este cultivo. No obstante, y dadas las condiciones climáticas cambiantes y la consiguiente adaptación de los diferentes organismos a ellas, conviene proseguir con el monitoreo de esta enfermedad y sus vectores de transmisión que permitan la identificación de las especies y la detección de la bacteria en los individuos recogidos.

El manguero en las plantas de patata fue el método de monitoreo que permitió, además de la detección de los picos de población, identificar las especies y la detección de la bacteria, resultando el método más tedioso pero el más eficaz para el seguimiento de esta plaga.

Capítulo 4: Estudio de Zebra Chip (ZC) en las plantas y tubérculos de patata en Castilla y León

Resumen

En España, se ha reportado la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso) en tubérculos de patata, sin embargo, no se ha detectado la presencia de Zebra Chip (ZC), enfermedad que provoca este patógeno, en condiciones de cultivo. Con los objetivos de estudiar la epidemiología de la enfermedad en el cultivo de la patata de Castilla y León, poder observar la enfermedad tanto en planta como en tubérculo, estimar que impacto puede tener en distintas variedades cultivadas en Castilla y León y evaluar el potencial de transmisión del tubérculo a la planta, se estableció un ensayo en la localidad de Zamadueñas (Valladolid) con distintos lotes de variedades de patata de siembra procedentes de esta comunidad.

Solo se detectaron 9 plantas positivas para Lso en los tres años de estudio con síntomas muy inespecíficos y el porcentaje de tubérculos infectados en el ensayo nunca fue superior al 2%, no encontrando diferencias significativas entre las variedades estudiadas. En cuanto al potencial de transmisión de planta a tubérculo se observó que más de la mitad de los tubérculos procedentes de plantas positivas eran no viables.

Con el nivel de población de *Bactericera nigricornis* detectado en la zona de estudio es suficiente para encontrar la bacteria en los tubérculos, pero no es fácil detectar la bacteria en las plantas. A pesar de eso, los porcentajes de tubérculos afectados no suponen una pérdida importante de la cosecha.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), *Bactericera nigricornis*, síntomas, transmisión, análisis, variedad, vector.

4.1. Introducción

Candidatus Liberibacter solanacearum es una bacteria Gram-negativa, parásita obligada del floema de distintas plantas y de la hemolinfa de algunos insectos, no cultivable *in vitro* (Jagoueix *et al.*, 1994; Bove, 2006). Debido a que no se puede cultivar fuera de su vector o huésped y por tanto la genética de la bacteria, la interacción bacteria-vector y bacteria-planta aún no se han explorado a fondo. Existen factores importantes aún desconocidos relacionados con la adaptación y colonización o la posible coevolución de estas bacterias y sus huéspedes y vectores.

Se trata de una bacteria que forma parte del microbiota de los psílidos y la coexistencia con otras bacterias probablemente tenga un impacto en la aptitud general del insecto, así como en el resultado de la enfermedad (Haapalainen, 2014). En el caso de *B. cockerelli*, las poblaciones de insectos portadores de Lso tienen una mayor mortandad por la cantidad de bacterias ubicadas en su aparato digestivo. También se ha reportado que existe una correlación negativa de supervivencia de ninfas infectadas por este patógeno y que influye en los ciclos reactivos: los adultos de *B. cockerelli* tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales (Nachappa *et al.*, 2014).

El número de insectos vectores puede afectar al tiempo que se necesita para la expresión de los síntomas de las plantas, debido a la diferencia inicial del inóculo, aunque después de la multiplicación bacteriana y el movimiento sistémico dentro del hospedante, la enfermedad se incrementa en la misma tasa (Haapalainen, 2014). El número de vectores es un factor importante para el éxito de la inoculación, sin embargo, la tasa de éxito es independiente de la cantidad de patógeno en *B. cockerelli* (Rashed *et al.*, 2012). Cuando Lso se distribuye en toda la planta, la cantidad de bacteria adquirida por *B. cockerelli* no está influida por el lugar de alimentación del insecto dentro de la planta. Sin embargo, en el caso de que Lso no esté completamente distribuida por la planta, los insectos muestran tendencia para adquirir altas cantidades del patógeno alimentándose de aquellas zonas de la planta con mayor densidad del patógeno, que coincide con las zonas del tallo y peciolo (Rashed *et al.*, 2012).

Una vez que los psílidos se alimentan de la savia, esto proporciona a las bacterias la entrada al floema de las plantas, induciendo cambios metabólicos y regulatorios significativos que dañan el sistema de transporte de las plantas y afectan a los sistemas de defensa. En el floema de las plantas infectadas por Lso se encuentran agregaciones de componentes fenólicos, peroxidasas, oxidasas, polifenoles, quitinasas, aminoácidos y azúcares (sacarosa, glucosa y fructuosa) libres (Gao *et al.*, 2009; Buchman *et al.*, 2012). Esas respuestas aparecen entre la tercera y la quinta semana después de la infección (Rashed *et al.*, 2013).

El incremento de la actividad reductiva de azúcares y aminoácidos podría contribuir, en el caso de Lso en patata, al aumento del tono café al en la fritura del tubérculo, porque la formación de acrilamida ocurre con el empleo de esos componentes como sustratos a altas temperaturas, mediante la reacción de Maillard (Wallis *et al.*, 2014).

El movimiento de la bacteria en el floema parece seguir la dirección de transporte de carbohidratos desde las hojas hasta el tallo descendiendo a la raíz, encontrando mayores concentraciones de bacteria en las hojas nuevas y en las raíces y estolones (Li *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2009; Levy *et al.*, 2011). Simultáneamente, con la aparición de los síntomas en los tubérculos, la concentración en los tubérculos de azúcares reductores (glucosa y sacarosa) se incrementa exponencialmente indicando una alteración en el metabolismo de los carbohidratos de la planta y en el transporte (Gao *et al.*, 2009; Buchman *et al.*, 2012). Mientras que los análisis de los tubérculos mostraron un descenso de los niveles de sólidos (almidón) (Buchman *et al.*, 2012), los tallos superiores de las plantas de patata infectadas por Lso mostraban contenidos anormalmente altos de almidón y proteínas específicas de los tubérculos (Alvarado *et al.*, 2012). A su vez, los tubérculos de patata con síntomas de ZC contienen niveles elevados de compuestos fenólicos, aminoácidos, ácido salicílico y proteínas relacionadas con el sistema inmunológico, lo que indica una respuesta de defensa activa (Navarre *et al.*, 2009; Wallis *et al.*, 2012).

El pardeamiento del tejido del rayo medular del tubérculo al freír a alta temperatura, produciendo el síntoma típico de ZC, puede ser un resultado combinado de la acumulación de azúcares reductores y el aminoácido tirosina (Navarre *et al.*, 2009). Rashed *et al.* (2013) encontraron que los niveles de fenoles, peroxidasas, polifenol oxidasas y azúcares reductores en los tubérculos aumentaron durante el avance de la infección. Sin embargo, a excepción de los fenoles, las concentraciones de los compuestos acumulados en los tubérculos no estaban correlacionados con la cantidad de bacteria Lso. Sin embargo, sí se encontró una correlación positiva entre la cantidad de bacteria Lso y la gravedad de los síntomas del follaje de la planta (Rashed *et al.*, 2014), lo que sugiere que los efectos sobre los tubérculos son un daño indirecto. Alvarado *et al.* (2012) encontró que el desarrollo de la enfermedad está correlacionado con el bloqueo de los vasos del floema, por tanto, la cantidad inicial de bacterias y la respuesta inicial de la planta a la bacteria son importantes para el desarrollo de la enfermedad, mientras que la cantidad de bacteria en el tubérculo en etapas posteriores de la infección no se correlacionan con los síntomas.

Se ha demostrado que la temperatura tiene un efecto significativo en el desarrollo de Lso en plantas de patata (Munyanza *et al.*, 2012b), comparado con *Candidatus Liberibacter* asociados

con cítricos. Lso parece ser sensible al calor y parece no tolerar temperaturas superiores a 32 °C, temperatura a la cual se inhibe la bacteria y los síntomas ocasionados por esta. Con regímenes de temperaturas superiores a 32 °C, Lso no fue detectado en plantas de patata donde se inoculó la bacteria a partir de infecciones realizadas con *B. cockerelli* y no se desarrollaron síntomas de ZC (Munyaneza *et al.*, 2012b). El desarrollo óptimo de Lso y de los síntomas de ZC en las plantas de patata se encuentra entre 27 y 32 °C. En el caso de temperaturas inferiores, a 17 °C o menos, puede disminuir significativamente el desarrollo de Lso en patata, pero no prevenirlo (Munyaneza *et al.* 2012b). La sensibilidad al calor puede explicar la incidencia y la severidad en las áreas productoras (Munyaneza, 2012b).

La severidad de la enfermedad está estudiada en los haplotipos A y B, asociados con ZC en patata y que aparecen predominantemente en América, Nueva Zelanda y Australia (Nelson *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2018; Savary *et al.*, 2019). Ambos haplotipos pueden infectar a las plantas individualmente o de forma conjunta (Harrison *et al.*, 2019). La distribución de estos haplotipos y los efectos resultantes sobre la gravedad de la enfermedad en planta en infecciones únicas o coinfecciones se han estudiado en tomate y patata (Mendoza-Herrera *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2019). La infección con el haplotipo B es perjudicial para las plantas de tomate, ya que generalmente mueren antes del desarrollo del fruto, mientras que las plantas pueden permanecer vivas con síntomas cuando se infecta con el haplotipo A. En patata, el haplotipo B provoca más síntomas en tubérculos que el haplotipo A (Grimm *et al.*, 2018) y las infecciones de doble haplotipo AB, generalmente provocan síntomas más severos que las infecciones con sólo el haplotipo B (Hernández-Deheza *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2019). Curiosamente, el haplotipo B parece reducir la tasa de supervivencia de las ninfas del psílido *B. cockerelli*, en comparación con las ninfas portadoras del haplotipo A (Yao *et al.*, 2016).

Está reportado que la bacteria se puede transmitir a la siguiente generación de plantas a través de tubérculos afectados (Pitman *et al.*, 2011) y se ha comprobado que Lso puede ser transmitida a plantas de zanahoria por semillas infectadas (Bertolini *et al.*, 2015). Sin embargo, se sabe poco de la transmisión de ZC a través del tubérculo y el impacto de esta enfermedad sobre la calidad de patata de siembra. Las patatas infectadas con Lso, que potencialmente son una fuente de propagación de la enfermedad, podrían ser una amenaza para el cultivo y su comercialización. Estudios realizados en Estados Unidos (Henne *et al.* 2010a) mostraron que aproximadamente el 44% de los tubérculos infectados con ZC permanecieron viables en condiciones de invernadero, pero produjeron brotaciones débiles en las hojas y plantas que murieron prematuramente; además, se encontró un bajo porcentaje de plantas positivas para Lso procedentes de la germinación de tubérculos positivos. Por tanto, Henne *et al.* (2010a)

concluyeron que en áreas donde ZC está actualmente establecida, la transmisión por patata de siembra infectada no contribuye significativamente a la incidencia de ZC en el cultivo de patata. Por otra parte, los estudios realizados en Nueva Zelanda por Pitman *et al.* (2011) y Berry *et al.* (2011) reportaron una tasa de emergencia de plantas de patata superior al 90 % de tubérculos positivos para Lso por PCR, sin mostrar síntomas de ZC. Estas plantas dieron como resultado la producción de tubérculos comercializables, aunque el crecimiento de las plantas y el rendimiento de la patata fueron significativamente menores.

4.2. Objetivos

Los síntomas hasta ahora descritos de ZC corresponden con las condiciones de cultivo de patata en las zonas donde la transmisión de Lso es realizada por *B. cockerelli*. En Castilla y León, Lso ha sido detectada en tubérculos de patata en momentos posteriores a la cosecha (Palomo *et al.*, 2014), sin que haya sido detectada la enfermedad en plantas de patata en condiciones de campo. Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- Observar la sintomatología de la enfermedad de ZC en planta y en tubérculo
- Estudiar la incidencia de la bacteria en distintas variedades de patata cultivadas en Castilla y León
- Evaluar la transmisión de Lso de la planta al tubérculo en condiciones de cultivo

4.3. Material y métodos

4.3.1. Localización y establecimiento del ensayo

Se establecieron ensayos de patata en la localidad de Zamadueñas, durante los años 2016, 2017 y 2018. Las fechas de siembra y cosecha aparecen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Fechas de siembra y cosecha del ensayo de patata durante las campañas 2016, 2017 y 2018.

Año	Localidad	Provincia	Siembra	Cosecha
2016	Zamadueñas	Valladolid	14 de abril	20 de septiembre
2017	Zamadueñas	Valladolid	5 de abril	22 de septiembre
2018	Zamadueñas	Valladolid	3 de mayo	24 de septiembre

Los ensayos incluyeron entre 20 y 30 lotes de diferentes variedades de patata con origen en la zona de producción de patata de siembra de Castilla y León (Figura 4.1.). Antes de la siembra, los tubérculos fueron inspeccionados uno a uno para asegurar que no tuvieran síntomas compatibles con ZC en su interior realizando un corte transversal de una longitud de 2 cm en la zona de inserción del tubérculo con el rizoma.



Figura 4.1. Aspecto general del ensayo de Zamadueñas

Tabla 4.2. Número de lotes sembrados de cada variedad de patata en cada año de estudio.

Variedad	2016	2017	2018	Total
Agria	4	4	2	10
Baraka	3	7	5	15
Brooke	0	1	0	1
Carlita	0	0	2	2
Frisia	0	1	0	1
Hermes	0	1	0	1
Kennebec	8	11	10	29
Lady Amarilla	0	1	0	1
Monalisa	0	1	0	1
Red Pontiac	2	1	3	6
Spunta	3	2	0	5
Total	20	30	22	72

Durante el mes de abril, se sembraron aproximadamente 200 tubérculos por lote, repartidos en dos surcos de 100 tubérculos cada uno, a una distancia de 0,75 m entre surcos y 0,40 m entre plantas. El manejo del cultivo (siembra, riego, fertilización, etc.) fue el habitual en esta zona de producción. Se realizaron dos tratamientos a base de thiacloprid y cipermetrina durante los meses de mayo y junio, en el momento de mayor abundancia de la plaga del escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata* S), con el fin de evitar defoliaciones intensas de este coleóptero en el cultivo.

4.3.2. Evaluación de los síntomas de ZC en planta

En el año 2016, antes de proceder a la evaluación de síntomas del cultivo, se estudió el porcentaje de germinación de los tubérculos. Para ello se procedió al conteo de plantas nacidas por surco y lote a las 4, 5 y 6 semanas de la siembra.

En cada año de estudio se realizaron tres prospecciones o visitas en planta para la visualización de síntomas compatibles con ZC en la parte aérea durante tres momentos del cultivo: 1º) desarrollo de la planta e inicio del crecimiento de los tubérculos, 2º) desarrollo de tubérculos, y 3º) madurez fisiológica de plantas y tubérculos.

Se marcó cada planta sintomática, para el seguimiento del desarrollo de los síntomas en visitas posteriores, anotando en cada caso la sintomatología observada.

4.3.3. Análisis de plantas sintomáticas y sin síntomas para la detección de Lso

Durante los tres años de estudio se realizó el análisis de Lso de las plantas sintomáticas detectadas en cada una de las tres visitas y durante los años 2017 y 2018 este análisis se realizó también en plantas sin síntomas (50 en 2017 y 75 en 2018) en el momento de la segunda visita. Cada muestra tomada por planta para análisis de Lso fue de tres brotes, incluyendo hojas y tallos, de unos 15 cm de largo. Las muestras se recolectaron y almacenaron a 4 °C hasta el momento del análisis.

4.3.4. Análisis de tubérculos para la detección de Lso.

Durante el momento de la cosecha, en el mes de septiembre, se recolectaron un total de 200 tubérculos por parcela. Los tubérculos se cortaron e inspeccionaron buscando síntomas compatibles con ZC, analizando para Lso aquellos tubérculos sintomáticos.

Además, se recogieron de forma individualizada los tubérculos de las plantas que habían dado positivo para Lso. Estos tubérculos se contabilizaron, visualizando si tenían síntomas compatibles con ZC, y se procedió al análisis para la detección de Lso.

Se realizó el análisis de la varianza del porcentaje de tubérculos infectados por variedad de los tres años mediante el programa R (<http://cran.r-project.org/>).

4.3.5. Extracción de ADN de muestras vegetales: plantas y tubérculos y detección de Lso

La extracción de ADN en planta y tubérculo se realizó a partir de 0,5 g de muestra vegetal siguiendo la modificación del protocolo de Murray & Thompson (1980) como se describe en EPPO (2020). El ADN purificado se conservó a -20 ° C hasta su uso.

El análisis para la detección de Lso se realizó utilizando el PlantPrint Detection Kit por Real Time PCR (Taqman) que usa condiciones, cebadores y sondas descrito por Teresani *et al.* (2014).

4.4. Resultados

4.4.1. Estudio del porcentaje de germinación de los tubérculos

Kennebec, Red Pontiac y Spunta presentaron una mayor precocidad, con nascencias cercanas al porcentaje final de germinación en el conteo realizado a las 4 semanas de la siembra. En el segundo muestreo realizado este porcentaje fue superior, incluso superando a los valores obtenidos en el tercer muestreo, debido a la mortandad de algunas de las plantas.

En el primer muestreo realizado, Agría y Baraka tuvieron unos valores de germinación bajos, del 5 y el 27 %, respectivamente. En el segundo muestreo los valores incrementaron por encima del 50 y 60 %. En el último y tercer muestreo, los porcentajes de nascencia incrementaron siendo en ambos casos valores próximos al 80 %.

El promedio del porcentaje de germinación final por variedad osciló entre el 66 y el 81 %, no observando diferencias entre los diferentes lotes de las variedades estudiadas (Figura 4.2.).

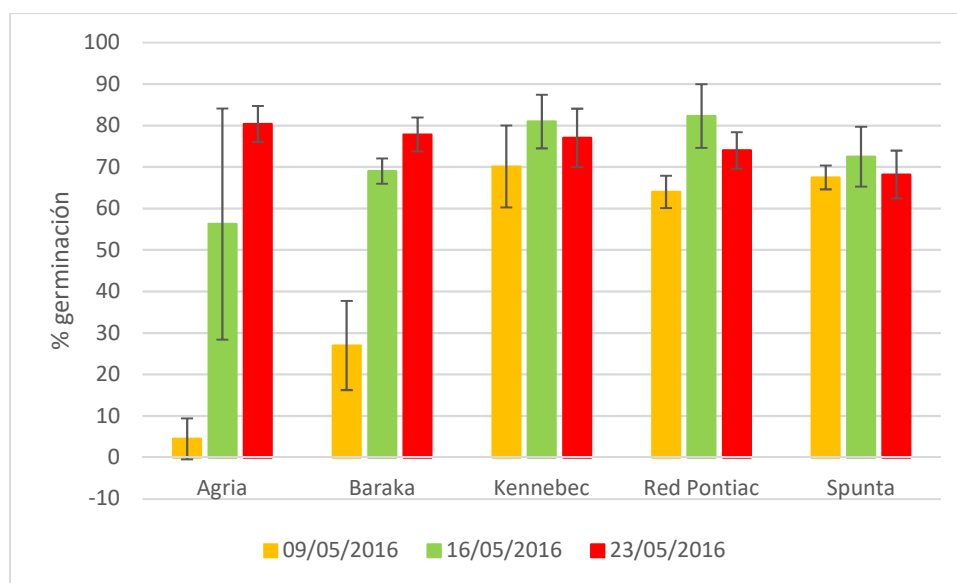


Figura 4.2. Promedio de porcentaje de germinación por variedades en los tres muestreos realizados en el año 2016 en el ensayo de Zamadueñas (Valladolid).

4.4.2. Evaluación de los síntomas de ZC en planta

Durante los tres años de estudio, 194 plantas presentaron síntomas compatibles con ZC, (24 en 2016; 100 en 2017; 60 en 2018).

Los síntomas más abundantes fueron clorosis, enanismos y hojas enrolladas. Fueron síntomas detectados desde la primera visita y que se incrementaron con el desarrollo del cultivo (Figura 4.3.).

Los síntomas de entrenudos cortos fueron más detectados en la primera visita, donde son más fáciles de detectar por el propio desarrollo de la planta. Los bordes morados, síntomas asociados principalmente con Lso, solo se detectaron en la segunda y tercera visita. Solo se encontró una planta con tubérculos aéreos, que se detectó en la segunda visita, y que en la tercera visita apareció muerta.

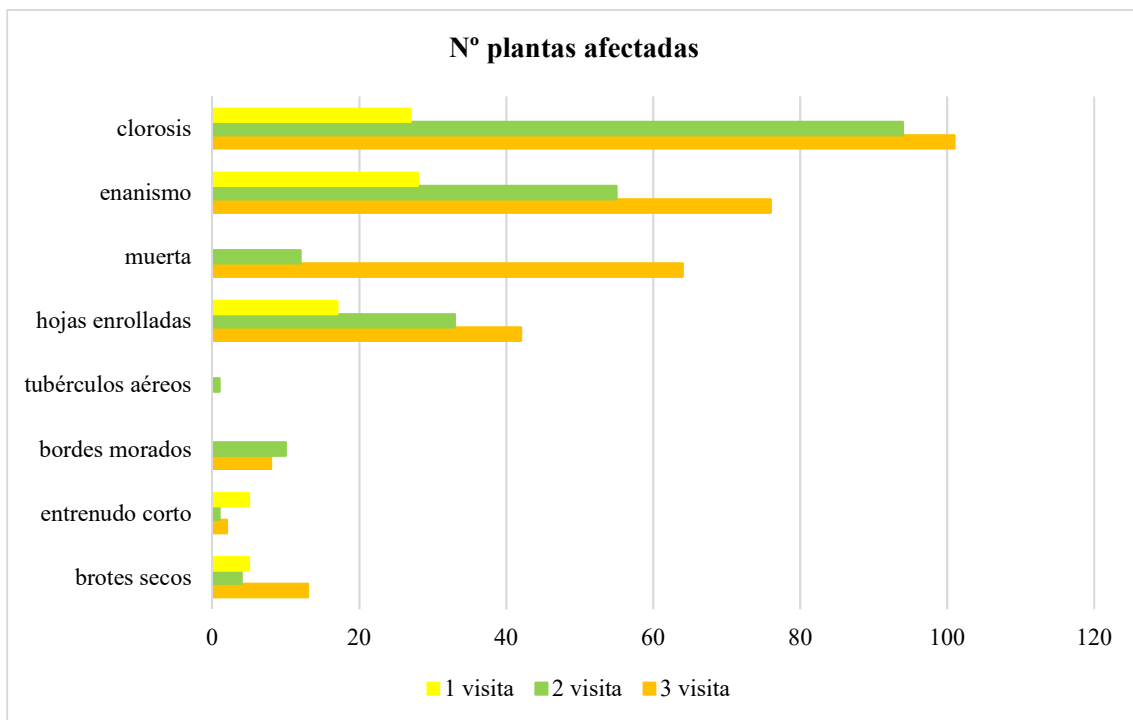


Figura 4.3. Nº plantas afectadas por síntomas en las tres visitas realizadas en el ensayo de patata de la localidad de Zamadueñas (Valladolid) durante los años 2016-2018.

Aunque no había un número homogéneo de lotes por variedad, sí se observa que hay síntomas que se detectan más en ciertas variedades. La variedad Kennebec presenta con más frecuencia hojas abarquilladas, la variedad Carlita entrenudos cortos, la variedad Spunta hojas abullonadas y Red Pontiac, bordes morados.

4.4.3. Análisis de Lso en plantas sintomáticas y sin síntomas

En los análisis de detección de Lso de plantas sintomáticas, solo 9 plantas de las 194 analizadas (2 en 2016; 5 en 2017; 2 en 2018) fueron positivas para Lso (tabla 4.3.).

Tabla 4.3. Sintomatología y resultado del análisis de Lso en las plantas positivas detectadas en las prospecciones realizadas en planta en el ensayo realizado en Zamadueñas (Valladolid), años 2016-2018.

Año	Variedad	Sintomatología 1ª visita	+ Lso	Sintomatología 2ª visita	+ Lso	Sintomatología 3ª visita	+Lso
2016	Agria			Enanismo con proliferación yemas	positiva	Enanismo con proliferación de yemas	positiva
2016	Baraka	Enanismo y clorosis	negativa	Clorosis y hojas abarquilladas	positiva	Clorosis y hojas pequeñas y abarquilladas	positiva
2017	Spunta	Enanismo y clorosis	negativa	Enanismo y clorosis	positiva	Enanismo y clorosis	positiva
2017	Spunta	Bordes cloróticos en brotes jóvenes	negativa	Enanismo con brotes pequeños y bordes morados	positiva	Enanismo con brotes pequeños y bordes morados	positiva
2017	Hermes	Clorosis general	positiva	Hojas pequeñas con bordes morados y tubérculos aéreos	positiva	Muerta	
2017	Kennebec	Clorosis y hojas abarquilladas	positiva	Enanismo	negativa	Enanismo	positiva
2017	Baraka			Enanismo, muchos brotes pequeños con clorosis y bordes morados	positiva	Enanismo, clorosis, brotes pequeños y bordes morados	positiva
2018	Red Pontiac	Enanismo y clorosis	positiva	Enanismo, clorosis y bordes de las hojas morados	negativa	Muerta	
2018	Baraka			Clorosis, hojas pequeñas y bordes morados	positiva	Casi muerta	positiva

Las plantas positivas en la primera visita solían mostrar síntomas de raquitismo, clorosis y hojas abarquilladas; en la segunda aparecían bordes morados y en un caso tubérculos aéreos; y en la tercera se solían mantener los síntomas de la segunda visita, llegando en algún caso a la muerte de la planta (Figura 4.4.).

Hubo dos plantas en las que, en el primer análisis, fueron positivas a Lso, y en el segundo, negativas. En algún caso se detectaron plantas positivas para Lso en la primera visita, y negativas en la segunda, que en la tercera visita resultaron positiva en un caso y muerta en el otro.



Figura 4.4. Aspecto de las plantas de patata donde se fue detectada Lso.

En las plantas sin síntomas analizadas durante los años 2017 y 2018 no se detectó la bacteria en ningún caso.

4.4.4. Análisis de tubérculos sintomáticos para ZC

En la tabla 4.4. aparecen los resultados del análisis de Lso de los tubérculos analizados por lote y por total de tubérculos para los años 2016, 2017 y 2018.

El número máximo de lotes con al menos algún tubérculo positivo a Lso fue 15 de 20, en 2016, 15 de 30, en 2017 y 8 de 22, en 2018. El porcentaje máximo de Lso en un lote fue de 6,50 % en 2016 y 2017.

En los tres años se inspeccionaron 14.200 tubérculos, encontrando la bacteria en 132 casos. El porcentaje de Lso osciló entre 0,3 % en 2018 hasta el 2% en 2016.

Tabla 4.4. Resultados del análisis de Lso por lote y por total de tubérculos en los años 2016, 2017 y 2018.

		2016	2017	2018
Lotes	<i>Lotes analizados</i>	20	30	22
	<i>Lotes con tubérculos positivos a Lso</i>	15	15	8
	<i>% máximo de tubérculos Lso+ en un lote</i>	6,50	6,50	1,50
Tubérculos	<i>Total de tubérculos inspeccionados</i>	3800	6000	4400
	<i>Tubérculos sintomáticos analizados</i>	263	913	48
	<i>% Lso+ en el total de tubérculos</i>	2	0,71	0,3



Figura 4.5. Aspecto de los tubérculos donde fue detectada Lso.

En la tabla 4.5. aparecen el número de tubérculos sintomáticos analizados, tubérculos positivos a Lso por lote y variedad en cada año, y el número de tubérculos positivos por variedad en los tres años de estudio.

Tabla 4.5. Número de tubérculos sintomáticos analizados y tubérculos positivos a Lso por lote y variedad por año; y número total de tubérculos positivos por variedad en los tres años de estudio

Variedad	2016			2017			2018			Lso+/ variedad
	Lote	Tub. sintomát. analizados	Lso+	Lote	Tub. sintomát. analizados	Lso+	Lote	Tub. sintomát. analizados	Lso+	
<i>Agria</i>	S28	2	0	AS1	24	0	CI	2	2	30
<i>Agria</i>	S127	5	2	S262	26	13	CII	0	0	
<i>Agria</i>	S137	14	11	S270	22	0				
<i>Agria</i>	S150	9	1	S337	37	1				
<i>Baraka</i>	S27	18	13	S263	21	0	S66	0	0	22
<i>Baraka</i>	S228	7	2	S265	32	1	S99	2	2	
<i>Baraka</i>	S243	9	0	S268	45	0	S357	3	3	
<i>Baraka</i>				S327	30	0	S381	0	0	
<i>Baraka</i>				S328	30	0	S447	1	0	
<i>Baraka</i>				S332	46	1				
<i>Baraka</i>				S333	43	0				
<i>Brooke</i>				S317	11	0				0
<i>Carlita</i>							S450	0	0	2
<i>Carlita</i>							S451	3	2	
<i>Frisia</i>				S351	11	0				0
<i>Hermes</i>				S319	2	0				0
<i>Kennebec</i>	S163	15	0	S264	12	2	S175	1	0	48
<i>Kennebec</i>	S94	13	3	S276	19	2	S198	6	0	
<i>Kennebec</i>	S144	14	13	S279	16	1	S260	5	0	
<i>Kennebec</i>	S198	36	4	S287	34	2	S304	1	0	
<i>Kennebec</i>	S204	14	3	S306	25	3	S361	4	1	
<i>Kennebec</i>	S222	16	2	S334	29	1	S445	1	0	
<i>Kennebec</i>	S95	2	0	S336	18	0	S448	2	1	
<i>Kennebec</i>	S131	15	9	S338	33	1	S453	2	0	
<i>Kennebec</i>				S340	60	0	M37	2	0	
<i>Kennebec</i>				S346	25	0	M38	2	0	
<i>Kennebec</i>				S356	39	0				
<i>Lady amarilla</i>				C141	54	3				3
<i>Monalisa</i>				S269	47	0				0
<i>Red Pontiac</i>	S176	9	6	S331	17	3	S388	3	0	11
<i>Red Pontiac</i>	S129	11	2				S491	2	0	
<i>Spunta</i>	S141	3	0				S519	6	2	16
<i>Spunta</i>	S205	3	2	S335	37	8				
<i>Spunta</i>	S155	48	3	S357	68	1				
Total		263	76		913	43		48	13	132

Del total de tubérculos sintomáticos analizados en 2016 y 2018, fueron positivos a Lso el 27 y el 29 %, respectivamente. Sin embargo, en 2017 solo se encontró la bacteria en 43 de los 913 tubérculos analizados que presentaban algún síntoma, debido probablemente a la aparición de otras sintomatologías en tubérculos en ese año.

En 2016, año en el que el porcentaje de Lso en tubérculos fue mayor, solo cinco lotes no tuvieron algún tubérculo positivo. El resto oscilaron entre 0,5 (1 tubérculo Lso+/lote) y 6,5 % (13 tubérculos Lso+/lote) de tubérculos positivos a Lso. El lote S28, en el que se había encontrado una planta positiva para Lso, no obtuvo ningún tubérculo positivo, y en el lote S228, donde había aparecido la otra planta positiva, tuvo 2 tubérculos positivos.

En el año 2017 (tabla 4.5.) el porcentaje de lotes afectados fue menor, encontrando tubérculos positivos en la mitad de los lotes analizados. El porcentaje de tubérculos positivos por lote osciló entre los mismos valores obtenidos en 2016 (0,5-6,5 %).

En el año 2018 (tabla 4.5.) el porcentaje de lotes afectados volvió a descender, hasta el 36 % de lotes afectados. En este caso el porcentaje de tubérculos infectados por lote fue también menor, con valores entre 0,5-1,5 %.

No se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza del porcentaje de tubérculos infectados por variedad (DF=10, F valor=0,35, P valor=0,96)

4.4.5. Análisis de los tubérculos de plantas positivas

En primer lugar, se separaron los tubérculos pequeños o momificados, en los que era imposible analizar o visualizar los síntomas y realizar el análisis de Lso, debido al grado de deterioro que presentaban (Tabla 4.6.) El resultado fue muy variable, con plantas con pocos tubérculos, pero que en todo caso se pudieron analizar, hasta plantas con un número alto de tubérculos, pero en las que más de la mitad eran muy pequeños y estaban momificados, por tanto, no viables.

El resto de tubérculos fueron evaluados en cuanto a la sintomatología clásica de zebra chip, separando aquellos sintomáticos de los asintomáticos, para realizar posteriormente el análisis de Lso. La mayoría de los tubérculos evaluados fueron sintomáticos, y solo uno de ellos sintomático fue negativo. De los 4 tubérculos asintomáticos, dos fueron positivos y dos negativos.

En 2018 las plantas positivas estaban muertas en la última visita y no habían desarrollado tubérculos.

Tabla 4.6. Número de tubérculos por planta, número de tubérculos no viables y tubérculos sintomáticos y asintomáticos, y en cada caso número de tubérculos positivos a Lso de las plantas positivas a Lso detectadas en la localidad de Zamadueñas, años 2016-2017.

Año	Lote	Variedad	N tubérculos /planta	N tubérculos no viables	Tubérculos sintomáticos		Tubérculos asintomáticos	
					N tubérculos	+Lso	N tubérculos	+Lso
2016	S28	Agria	2	-	2	2	-	-
2016	S228	Baraka	4	-	4	3	-	-
2017	S-335	Spunta	13	7	5	5	1	1
2017	S-357	Spunta	25	17	8	8	0	0
2017	S-319	Hermes	7	2	3	3	2	0
2017	S-334	Kennebec	1	0	1	0	0	0
2017	S-333	Baraka	11	5	5	5	1	1

4.5. Discusión

Los tubérculos de siembra utilizados para el ensayo, previamente evaluados en el momento de la siembra, fueron asintomáticos y germinaron con normalidad, lo que en principio descartaría la posibilidad de transmisión a partir de este órgano.

Los síntomas mayormente encontrados en las plantas positivas para Lso fueron clorosis y raquitismo, síntomas muy inespecíficos que pueden confundirse con carencias de nutrientes u otras enfermedades de las plantas. La aparición de otros síntomas como hojas con bordes morados, aparecieron con frecuencia asociados a la variedad de piel roja Red Pontiac, encontrando solo una planta positiva. En general todos los síntomas aumentan desde la primera visita, momento en el que se está desarrollando la planta, hasta la segunda visita, en el que se produce el crecimiento de los tubérculos. Es este momento cuando aparecen los síntomas de tubérculos aéreos y bordes de las hojas morados, estrechamente asociados a ZC. En los tubérculos, de forma general, la bacteria se detectó en aquellos que presentaban los síntomas de rayado típicos de ZC, siendo, por tanto, los síntomas de ZC más fácilmente detectables en tubérculo que en planta. Hubo alguna ocasión en que los tubérculos presentaban deterioro o pudrición de los tejidos, siendo por tanto más difícil de detectar los síntomas asociados a la enfermedad.

Tanto el número de plantas como de tubérculos infectados fue bajo, sin embargo, el número de tubérculos Lso+ fue alto en relación con el número de plantas donde fue detectada la bacteria. Mientras que el desarrollo de los síntomas de la enfermedad en la planta está correlacionado con el bloqueo de los vasos del floema, la cantidad inicial de bacteria y la respuesta inicial de

la planta, la cantidad de bacteria en el tubérculo en etapas posteriores de la infección no se correlaciona con los síntomas (Alvarado *et al.*, 2012). Esto justificaría que, en ocasiones, no se detecten los síntomas de ZC en planta, encontrando tubérculos positivos a Lso afectados en el momento de procesamiento (Sengoda *et al.*, 2010).

La detección de la bacteria en plantas de patata fue muy baja. Es posible que en el momento de la inspección algunas plantas positivas no presentaran síntomas y que los síntomas pudiesen aparecer en el momento de la senescencia, enmascarados con el propio declive de la planta en ese momento. Además, Lso es una bacteria que se distribuye de manera desigual dentro de la planta hospedante debido al movimiento dentro del floema o que puede encontrarse en unos niveles muy bajos en la zona de la planta donde se alberga, lo que dificultaría la detección de Lso en el análisis (Tatineni *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2011). Los métodos actualmente utilizados para la detección de Lso requieren que la planta presente un nivel adecuado de la bacteria, que suele ocurrir unas semanas después del momento de la infección (Haapalainen, 2014). En nuestro estudio se han encontrado plantas que en una primera visita fueron positivas para la bacteria y en análisis posteriores no, lo que indica la dificultad de detectar la bacteria con el método disponible. En algún caso, la planta encontrada en la tercera visita estaba muerta, lo que parece indicar que los tejidos en el momento del análisis se encontraban muy afectados, y esto también podría dificultar la detección de Lso.

Es importante tener en cuenta los factores ambientales para el desarrollo de síntomas de ZC en planta y en tubérculo. La multiplicación de patógenos y el progreso de los síntomas se reducen a temperaturas entre 12 y 17 °C y se detienen a temperaturas superiores a 32 °C (Munyaneza *et al.*, 2012b). En nuestro estudio, la temperatura media diaria entre los meses de junio y agosto, estuvo dentro del rango óptimo para la incubación de ZC, por lo que en principio parece que las condiciones de temperatura fueron las idóneas para el desarrollo de la enfermedad.

Además de unas condiciones favorables al desarrollo de la enfermedad, Lso requiere de un vector para su transmisión. Según los datos obtenidos de la dinámica poblacional (Capítulo 3), la población de *B. nigricornis*, el psílido más abundante en la localidad de Zamadueñas donde fue elaborado este estudio, se mantuvo en niveles bajos (máximo: 0,8 insectos/mangueo en el año 2018), comparado con los valores obtenidos para otras especies vectores como, *B. cockerelli*, *T. apicalis* o *B. trigonica* (Munyaneza *et al.*, 2009c; Haapalainen *et al.*, 2018a; Antolínez *et al.*, 2019). Sin embargo, la población de *B. nigricornis* fue suficiente para provocar los niveles de infección detectados en los tubérculos. Existen estudios que demuestran que el período general de incubación de la enfermedad es inversamente proporcional a las poblaciones de psíidos (Rashed *et al.*, 2012). En el caso de *B. cockerelli*, incluso encontrando poblaciones bajas, es

posible que estos sean capaces de infectar rápidamente muchas plantas (Buchman *et al.* 2011). Con una baja presión del insecto, la detección del patógeno por PCR puede ser indetectable en planta hasta 3 semanas después de la infección (Levy *et al.*, 2011). Para algunos autores la detección de la bacteria en los psílidos vectores que infectan las plantas podrían dar más resultados más fiables a la hora de detectar precozmente la enfermedad en una parcela (Hung *et al.*, 2004).

El momento de infección por el vector es un factor determinante para la detección de los síntomas y el desarrollo de los mismos. En la zona de estudio donde se realizó el ensayo, el máximo de adultos se produjo a primeros de julio, coincidiendo con el crecimiento vegetativo de las plantas, y la cosecha no se realizó hasta mediados de septiembre, lo que indicaría un tiempo suficiente para la infección. Estudios previos realizados en patata con *B. cockerelli* sugirieron que las plantas infectadas menos de 6 semanas antes de la cosecha no mostraron una reducción significativa en el rendimiento de tubérculos en comparación con el testigo no infectado (Rashed *et al.*, 2014). Sin embargo, si la infección ocurría al menos 7 semanas antes de la cosecha, coincidiendo con el crecimiento vegetativo, la iniciación de los tubérculos y las primeras etapas de crecimiento, se producía una reducción significativa del rendimiento (Dwelle, 2003).

Estudios previos relacionados con la transmisión de la enfermedad a través de tubérculos positivos, reducen la importancia de esta forma de transmisión (Henne *et al.*, 2010a, Pitman *et al.*, 2011, Berry *et al.*, 2011). En este estudio se observó que más del 50 % de los tubérculos recogidos de las plantas positivas a Lso fueron no viables, y el resto con escaso desarrollo. Está reportado que cuando aparece ZC, el desarrollo de tubérculo cesa y si las plantas se infectaron antes de la iniciación del tubérculo, no se forman los tubérculos (Buchman *et al.*, 2012).

En cuanto a los resultados por variedad, no se encontraron diferencias significativas en los análisis de Lso realizados en tubérculos. La presencia del insecto en las plantas tampoco había sido significativa en las variedades de patata estudiadas (capítulo 3). En estudios realizados en Estados Unidos, todas las variedades comerciales de patata fueron susceptibles a Lso, aunque ciertas líneas de mejora exhibieron cierta tolerancia (Munyanzeza *et al.*, 2010e), lo que ha dado lugar a trabajos de mejora genética para incorporar resistencia en nuevos cultivares (Munyanzeza *et al.*, 2010e; Novy *et al.*, 2010).

ZC constituye un problema importante en el cultivo de la patata en zonas donde los haplotipos de Lso detectados son A y B, asociados a la transmisión de Lso por el psílido *B. cockerelli* (Munyanzeza, 2015). El haplotipo C, ligado a la transmisión de *T. apicalis* en el cultivo de zanahoria, se ha detectado en tubérculos asintomáticos de patata en Finlandia, donde ZC no

constituye un problema en este cultivo (Haapalainen *et al.*, 2018a). En España, en estudios recientemente realizados por Ruíz-Padilla *et al.* (2020), los haplotipos encontrados en muestras vegetales de Apiáceas y Solanáceas fueron siempre los haplotipos D y E, y en el caso de los tubérculos de patata, algunos procedentes de la zona productora de patata de Castilla y León, el haplotipo que siempre se detectó fue el haplotipo E. Teniendo en cuenta la baja detección de Lso y de síntomas asociados con la enfermedad de ZC en el cultivo de patata cuando se trata de otros haplotipos diferentes al A y B, es posible que esté influyendo el tipo de haplotipo en un menor desarrollo y propagación de la enfermedad.

4.6. Conclusiones

Tanto las condiciones ambientales como el nivel de población de psílidos potencialmente vectores de Lso (*B. nigricornis*) en la zona de estudio fueron suficientes, para poder encontrar la bacteria y los síntomas tanto en las plantas como en los tubérculos. Sin embargo, los síntomas compatibles con ZC fueron bajos tanto en planta como en tubérculo, al igual que la detección de Lso en ambos órganos, aunque, el alto número de tubérculos Lso+ en relación con el número de plantas infectadas, sugiere la existencia de plantas sin síntomas positivas, no detectadas.

Capítulo 5: Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la única especie de psílido capaz de transmitir Lso en cultivos de patata en la Península Ibérica es *B. nigricornis*, especie predominante en las capturas realizadas, apareciendo tanto en las zonas de patata de consumo como de siembra de Castilla y León. Se trata de una especie que prevalece en el cultivo en los momentos de mayor follaje de la planta y es la única especie capaz de completar su ciclo biológico en este cultivo.

Los niveles poblacionales de *B. nigricornis* en las parcelas de patata de Castilla y León fueron bajos, no pareciendo suficientes para ser considerada plaga, así como el porcentaje de insectos vectores con la bacteria. Todo ello justificaría la baja incidencia de la enfermedad encontrada en cultivos de patata de Castilla y León, con un escaso número de plantas encontradas positivas a la bacteria.

Sin embargo, fue posible encontrar la bacteria y los síntomas tanto en las plantas como en los tubérculos en muestreos de campo realizados de forma exhaustiva y periódica en una parcela de ensayo, con un nivel de población de individuos de *B. nigricornis* y un porcentaje de individuos portadores de la bacteria bajos, similares a los encontrados en las parcelas convencionales de patata. El número de plantas y tubérculos con síntomas compatibles con ZC fueron bajos, al igual que la detección de Lso en ambos órganos, aunque, el alto número de tubérculos con Lso en relación con el número de plantas infectadas, sugiere la existencia de plantas asintomáticas positivas, no detectadas.

La adquisición de la bacteria por parte del vector no parece provenir de las plantas silvestres, por tanto, considerando la proximidad de cultivos de patata a zanahoria en áreas de producción, *B. nigricornis* adquiriría la bacteria en zanahoria para posteriormente transmitirla a la patata. Por tanto, sería necesario estudiar si *B. nigricornis* es capaz de transmitir Lso de zanahoria a patata y si esa transmisión es muy eficaz. En cuanto a la transmisión del patógeno por el tubérculo, se observó que los tubérculos infectados mostraron una baja viabilidad y no en principio no constituyen una fuente importante de inóculo.

En estudios previos realizados el haplotipo detectado en tubérculos de patata en la Península Ibérica ha sido el E (Palomo *et al.*, 2014; Ruíz-Padilla *et al.*, 2020), y aunque no se ha identificado el haplotipo de Lso de los individuos de *B. nigricornis* donde se ha detectado la presencia de la bacteria, y es de presuponer que el haplotipo de *B. nigricornis* sea el mismo. Los haplotipos detectados en zonas donde ZC constituye un problema son los haplotipos A y B, transmitidos por *B. cockerelli*, y aunque no existen estudios realizados sobre la patogenicidad

del haplotipo E en el cultivo de la patata, parece que su aparición en este cultivo constituye un riesgo menor.

Los factores relacionados con la aparición y propagación de ZC en las condiciones de estudio, como el haplotipo, el vector y su abundancia en el cultivo, o incluso las condiciones del cultivo, son diferentes a los referidos con la aparición de ZC en zonas donde constituye un problema económico y epidemiológico en el cultivo de la patata, lo que nos lleva a deducir que ZC en las condiciones estudiadas, así como su posible propagación, no parece un problema grave.

No obstante, y dadas las condiciones climáticas cambiantes y la consiguiente adaptación de los diferentes organismos a ellas, conviene proseguir con el monitoreo de esta enfermedad y sus vectores de transmisión que permitan la identificación de las especies y la detección de la bacteria en los individuos recogidos.

Capítulo 6: Referencias bibliográficas

- Aguilar, E., Sengoda, V. G., Bextine, B., McCue, K. F., & Munyaneza, J. E. (2013). First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" on Tobacco in Honduras. *Plant Disease*, 97(10), 1376-1377.
- Aidoo, O. F., Tanga, C. M., Mohamed, S. A., Rasowo, B. A., Khamis, F. M., Rwomushana, I., Kimani, J., Agyakwa, A.K., Daisy, S., Sétamou, M., Ekesi, S. & Borgemeister, C. (2019). Distribution, degree of damage and risk of spread of *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae) in Kenya. *Journal of Applied Entomology*, 143(8), 822-833.
- Ajene, I. J., Khamis, F., Ballo, S., Pietersen, G., van Asch, B., Seid, N., Azerefegne, F., Ekesi, S. & Mohamed, S. (2020a). Detection of Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Ethiopia: A New Haplotype and its Implication to the Proliferation of Huanglongbing. *Journal of Economic Entomology*, 113(4), 1640-1647.
- Ajene, I. J., Khamis, F. M., van Asch, B., Pietersen, G., Seid, N., Rwomushana, I., Ombura, F.L.O., Momanyi, G., Finyange, P., Rasowo, B.A., Tanga, C.M., Mohammed, S. & Ekesi, S. (2020b). Distribution of *Candidatus Liberibacter* species in Eastern Africa, and the First Report of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Kenya. *Scientific Reports*, 10(1).
- Alfaro-Fernandez, A., Cebrian, M. C., Villaescusa, F. J., Hermoso de Mendoza, A., Ferrandiz, J. C., Sanjuan, S., & Font, M. I. (2012a). First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Carrot in Mainland Spain. *Plant Disease*, 96(4), 582-582.
- Alfaro-Fernandez, A., Siverio, F., Cebrian, M. C., Villaescusa, F. J., & Font, M. I. (2012b). '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Associated with *Bactericera trigonica*-Affected Carrots in the Canary Islands. *Plant Disease*, 96(4), 581-582.
- Alfaro-Fernandez, A., Hernandez-Llopis, D., & Isabel Font, M. (2017). Haplotypes of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' identified in Umbeliferous crops in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 127-131.
- Alvarado, V. Y., Odokonyero, D., Duncan, O., Mirkov, T. E., & Scholthof, H. B. (2012). Molecular and Physiological Properties Associated with Zebra Complex Disease in Potatoes and Its Relation with *Candidatus Liberibacter* Contents in Psyllid Vectors. *Plos One*, 7(5).
- American Phytopathological Society. New variety of zebra chip disease threatens potato production in southwestern Oregon. *ScienceDaily*, 18 April 2019. (<http://www.sciencedaily.com/releases/2019/04/190418153644.htm>)

- Antolínez, C. A., Fereres, A., & Moreno, A. (2016). Sex-specific probing behaviour of the carrot psyllid *Bactericera trigonica* and its implication in the transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3), 627-637.
- Antolínez, C. A., Fereres, A., & Moreno, A. (2017). Risk assessment of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' transmission by the psyllids *Bactericera trigonica* and *B. tremblayi* from Apiaceae crops to potato. *Scientific Reports*, 7.
- Antolínez, C. A., Moreno, A., Ontiveros, I., Pla, S., Plaza, M., Sanjuan, S., Palomo, J.L., Sjölund, M.J., Sumner-Kalkun, J.C., Arnsdorf, Y.M., Jefries, C.J., Ouvrard, D & Fereres, A. (2019). Seasonal Abundance of Psyllid Species on Carrots and Potato Crops in Spain. *Insects*, 10(9), 14.
- Asensio-S.-Manzanera, M. C., Santiago-Calvo, Y., Ruano-Rosa, D., Vacas-Izquierdo, R., Flores-Pérez, D. (2019a). Evolución de las poblaciones de *Bactericera tremblayi* (Wagner, 1961) (Hemiptera: Psylloidea) en cultivos hortícolas de Castilla y León y su posible relación con los síntomas aparecidos. Presentación en panel. *XI Congreso Nacional de Entomología Aplicada*. Madrid, 4-8 noviembre de 2019.
- Asensio-S.Manzanera, M. C., Santiago-Calvo, Y., Ruano-Rosa, D., Vacas-Izquierdo, R., Flores-Pérez, D. (2019b). Evolución de las poblaciones de *Bactericera trigonica* Hodkinson (Hemiptera: Psylloidea) en zanahoria y su relación con los daños causados. *XI Congreso Nacional de Entomología Aplicada de la SEEA*. Madrid, 4-8 noviembre de 2019.
- Ashmole, N. P., & Ashmole, M. J. (1988). Insect Dispersal on Tenerife, Canary Islands: High Altitude Fallout and Seaward Drift. *Arctic and Alpine Research*, 20(1), 1-12.
- Avila, C. A., Marconi, T. G., Vilorio, Z., Kurpis, J., & Del Rio, S. Y. (2019). *Bactericera cockerelli* resistance in the wild tomato *Solanum habrochaites* is polygenic and influenced by the presence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Scientific Reports*, 9.
- Bastin, S., Roldan-Pinto, A., Siverio de la Rosa, F., Hernández-Suárez, E. (2015). Caracterización morfológica y parámetros biológicos de *Bactericera trigonica* (Hodkinson, 1981) y *Bactericera tremblayi* (Wagner, 1961). "*IX Congreso Nacional de Entomología Aplicada. XV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada*". Valencia, 19-23 octubre de 2015.
- Ben Othmen, S., Moran, F. E., Navarro, I., Barbe, S., Martínez, C., Marco-Noales, E., Chermiti, B. & López, M.M. (2018). '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotypes D and E in carrot plants and seeds in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 100(2), 197-207.

- Ben Othmen, S., Abbes, K., El Imem, M., Ouvrard, D., Rapisarda, C., & Chermiti, B. (2019). *Bactericera trigonica* and *B. nigricornis* (Hemiptera: Psylloidea) in Tunisia as potential vectors of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' on Apiaceae. *Oriental Insects*, 53(4), 497-509.
- Berry, N., S. Thompson, N. Taylor, P. Wright, F. Shah, M. Walker, S. Beard, N. Jorgensen, R. Butler, S. Thompson, I. Scott, and A.R. Pitman. (2011). The impact of *Ca. Liberibacter* infected seed tubers on potato production in New Zealand, pp. 178–182. In *Proceedings of the 11th Annual Zebra Chip Reporting Session*, ed. F. Workneh, A Rashed, and C.M. Rush. Dallas, TX (November 6–9, 2011).
- Bertolini, E., Teresani, G. R., Loiseau, M., Tanaka, F. A. O., Barbe, S., Martinez, C., Gentit, P., López, M.M. & Cambra, M. (2015). Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrot seeds. *Plant Pathology*, 64(2), 276-285.
- Blackmer, J.L. & Cañas, L.A. (2005). Visual cues enhance the response of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) to volatiles from host plants. *Environ. Entomol.* 34: 1524–1533.
- Bove, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37.
- Buchman, J. L., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., & Munyaneza, J. E. (2012). Zebra Chip Progression: From Inoculation of Potato Plants with *Liberibacter* to Development of Disease Symptoms in Tubers. *American Journal of Potato Research*, 89(2), 159-168.
- 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(6), 865-869.
- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martinez, R. I., Zavaleta-Mejia, E., Hernandez-Deheza, M. G., Carrillo-Salazar, J. A., Rebollar-Alviter, A., & Ochoa-Martinez, D. L. (2011). Aetiology of chili pepper variegation from Yurecuaro, México. *Journal of Plant Pathology*, 93(2), 331-335.
- Cameron, P. J., Surrey, M. R., Wigley, P. J., Anderson, J. A. D., Hartnett, D. E., & Wallace, A. R. (2009). Seasonality of *Bactericera cockerelli* in potatoes (*Solanum tuberosum*) in South Auckland, New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37(4), 295-301.
- Casquet, J., Thebaud, C., & Gillespie, R. G. (2012). Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 136-141.

- Caudillo, R. K. B. (2010). Descripción morfológica, biología y susceptibilidad de *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera:Eulophidae), parasitoide de *Bactericera cockerelli* (Sulc)(Hemiptera: triozidae), a diferentes insecticidas. M.S. thesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico.
- Conci, C., Rapisarda, C., & Tamanini, L. (1996). Annotated catalogue of the Italian Psylloidea (Insecta Homoptera).
- Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León (2019). Anuario de Estadística Agraria (<https://agriculturaganaderia.jcyl.es/web/es/estadistica-informacion-agraria/anuario-2019.html>)
- Cooper, W. R., Sengoda, V. G. & J. E. Munyaneza (2014) Localization of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' (Rhizobiales: Rhizobiaceae) in *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 107, 204-210.
- Cooper, W. R., Horton, D. R., Miliczky, E., Wohleb, C. H., & Waters, T. D. (2019). The Weed Link in Zebra Chip Epidemiology: Suitability of Non-crop Solanaceae and Convolvulaceae to Potato Psyllid and "Candidatus Liberibacter Solanacearum". *American Journal of Potato Research*, 96(3), 262-271.
- Cranshaw, W. S. (1994). The potato (tomato) psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc), as a pest of potatoes. *Advances in potato pest biology and management*, 83-95.
- Cranshaw, W. S. (2001). Diseases caused by insect toxin: psyllid yellows. *Compendium of potato diseases*, 73-74.
- Cranshaw WS, Hein G. (2004). High Plains IPM Guide.Potato XXII. Potato Psyllid. <http://scarab.msu.montana.edu/HpIPMSearch/Docs/potatopsyllidpotato.pdf> [accessed 25 March 2009, updated 12 April 2004].
- Crosslin, J. M., & Munyaneza, J. E. (2009). Evidence that the Zebra Chip Disease and the Putative Causal Agent Can be Maintained in Potatoes by Grafting and In Vitro. *American Journal of Potato Research*, 86(3), 183-187.
- Crosslin, J. M., Hamm, P. B., Eggers, J. E., Rondon, S. I., Sengoda, V. G., & Munyaneza, J. E. (2012a). First Report of Zebra Chip Disease and "Candidatus Liberibacter solanacearum" on Potatoes in Oregon and Washington State. *Plant Disease*, 96(3), 452-453.
- Crosslin, J. M., Olsen, N., & Nolte, P. (2012b). First report of zebra chip disease and "Candidatus Liberibacter solanacearum" on potatoes in Idaho. *Plant Disease*, 96(3), 453-453.

- Davidson, M. M., Teulon, D. A. J., Scott, I. A. W., & Workman, P. (2008). A review of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*); a new pest of potato in New Zealand. *Crop & Food Research Confidential Report* (2231), 14.
- Das, A. K., Rao, C. N., & Singh, S. (2007). Presence of citrus greening (Huanglongbing) disease and its psyllid vector in the North-Eastern region of India confirmed by PCR technique. *Current Science*, 92(12), 1759-1763.
- Djaman, K., Higgins, C., Begay, S., Koudahe, K., Allen, S., Lombard, K., & O'Neill, M. (2019). Seasonal Occurrence of Potato Psyllid (*Bactericera Cockerelli*) and Risk of Zebra Chip Pathogen (*Candidatus Liberibacter Solanacearum*) in Northwestern New Mexico. *Insects*, 11(1).
- Dwelle, R. B. (2003). Potato growth and development (pp. 9-11). *Potato Production Systems*. J. G. Stark and S. L. Love, eds. University of Idaho Agricultural Communications, Moscow, ID.
- EPPO (2012) First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ on carrots and celery in Spain, in association with *Bactericera trigonica*. *EPPO Reporting Service – Pests and Diseases*, 6, 4–5.
- EPPO (2020). PM 7/143 (1) ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ Bulletin OEPP/EPPO *Bulletin* 50, 49–68.
- Eurostat (2020). Potatoes and sugar beet. In: *Agriculture, forestry and fishery statistics- 2018 edition*. Available at: (https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_crops#Potatoes_and_sugar_beet) (Accessed 24/07/2021).
- FAO, 2008. Año internacional de la papa. (<https://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/cultivo.html>).
- FAO, 2011. Guía para el estudio de la composición de alimentos. (<http://efaidnbmnnnibpccglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.fao.org%2F3%2Fap802s%2Fap802s.pdf&clen=2977600>)
- FAO, FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2019). Índices de producción de cultivos. (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>)
- Fathi, S. A. A., Nouri-Ganbalani, G., & Asghari, A. (2008). Ovipositional behavior, fecundity, development and population density of potato psyllid, *Bactericera* sp. (Hom.: Psyllidae) on four potato cultivars (<https://repository.uma.ac.ir/id/eprint/8072/>).

- Fathi, S. A. A. (2011). Population density and life-history parameters of the psyllid *Bactericera nigricornis* (Forster) on four commercial cultivars of potato. *Crop Protection*, 30(7), 844-848.
- Ferguson, G., & Shipp, L. (2002). New pests in Ontario greenhouse vegetables. *New pests in Ontario greenhouse vegetables.*, 25(1), 69-72.
- Font, I., Abad, P., Albiñana, M., Espino, A. I., Dally, E. L., Davis, R. E., & Jorda, C. (1999). Amarilleos y enrojecimientos en zanahoria: una enfermedad a diagnóstico. *Bol. San. Veg. Plagas*, 25: 405-415.
- Fife, A. N., Cruzado, K., Rashed, A., Novy, R. G., & Wenninger, E. J. (2020). Potato Psyllid (Hemiptera: Triozidae) Behavior on Three Potato Genotypes With Tolerance to *Candidatus Liberibacter solanacearum*. *Journal of Insect Science*, 20(2), 15.
- Gatehouse, A. G. (1997). Behavior and ecological genetics of wind-borne migration by insects. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 475-502.
- Gill, G. (2006). Tomato psyllid detected in New Zealand. *Biosecurity* (69), 10-11.
- Greenway, G.A. & Rondon, S. (2018). Economic impacts of zebra chip in Idaho, Oregon and Washington. *American Journal of Potato Research* 95: 362-36.
- Grimm, K. D. S., Mustafa, T., Cooper, W. R., & Munyaneza, J. E. (2018). Role of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' and *Bactericera cockerelli* Haplotypes in Zebra Chip Incidence and Symptom Severity. *American Journal of Potato Research*, 95(6), 709-719.
- Gao, F., Jifon, J., Yang, X., & Liu, T.-X. (2009). Zebra chip disease incidence on potato is influenced by timing of potato psyllid infestation, but not by the host plants on which they were reared. *Insect Science*, 16(5), 399-408.
- Goolsby, J. A., Adamczyk, J., Bextine, B., Lin, D., Munyaneza, J. E., & Bester, G. (2007a). Development of an IPM program for management of the potato psyllid to reduce incidence of zebra chip disorder in potatoes. *Subtropical Plant Science*, 59, 85-94.
- Goolsby, J. A., Bextine, B., Munyaneza, J. E., Setamou, M., Adamczyk, J., & Bester, G. (2007b). Seasonal abundance of sharpshooters, leafhoppers, and psyllids associated with potatoes affected by zebra chip disorder. *Subtropical Plant Science*, 59, 15-23.
- Goolsby, J. A., Adamczyk, J. J., Crosslin, J. M., Troxclair, N. N., Anciso, J. R., Bester, G. G., Bradshaw, J. D., Bynum, E. D., Carpio, L. A., Henne, D. C., Joshi, A., Munyaneza, J. E., Porter, P., Sloderbeck, P. E., Supak, J. R., Rush, C. M., Willett, F. J., Zechmann, B. J. & Zens, B. A. (2012). Seasonal Population Dynamics of the Potato Psyllid (Hemiptera: Triozidae) and Its Associated Pathogen "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in

- Potatoes in the Southern Great Plains of North America. *Journal of Economic Entomology*, 105(4), 1268-1276.
- Gottwald, T. R., Da Graça, J. V., & Bassanezi, R. B. (2007). Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 8(1), 31.
- Haapalainen, M. (2014). Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 172-198.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Rastas, M., Wang, J., Hannukkala, A., Pirhonen, M., & Nissinen, A. I. (2018a). Carrot Pathogen '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Haplotype C Detected in Symptomless Potato Plants in Finland. *Potato Research*, 61(1), 31-50.
- Haapalainen, M., Wang, J., Latvala, S., Lehtonen, M. T., Pirhonen, M., & Nissinen, A. I. (2018b). Genetic Variation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Haplotype C and Identification of a Novel Haplotype from *Trioza urticae* and Stinging Nettle. *Phytopathology*, 108(8), 925-934.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Wickström, A., Wang, J., Pirhonen, M., & Nissinen, A. I. (2020). A novel haplotype of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' found in Apiaceae and Polygonaceae family plants. *European Journal of Plant Pathology*, 156(2), 413-423.
- Hajri, A., Loiseau, M., Cousseau-Suhard, P., Renaudin, I., & Gentit, P. (2017). Genetic Characterization of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" Haplotypes Associated with Apiaceous Crops in France. *Plant Disease*, PDIS-11-16-1686-RE.
- Halbert, S. E., & Manjunath, K. L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida entomologist*, 87(3), 330-353.
- Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R., & Paine, T. D. (2008). A new huanglongbing species, "*Candidatus Liberibacter psyllauros*," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5862-5865.
- Harrison, K., Tamborindéguy, C., Scheuring, D.C., Herrera, A.M., Silva, A., Badillo-Vargas, I.E., Miller, J.C., Levy, J.G (2019). Differences in Zebra Chip Severity between "*Candidatus Liberibacter Solanacearum*' Haplotypes in Texas. *American Journal of Potato Research*, 96(1), 86-93.
- Henne, D. C., Workneh, F., Wen, A., Price, J. aA., Pasche, J. S., Gudmestad, N. C., & Rush, C. M. (2010a). Characterization and Epidemiological Significance of Potato Plants Grown from Seed Tubers Affected by Zebra Chip Disease. *Plant Disease*, 94(6), 659-665.

- Henne, D. C., Paetzold, L., Workneh, F. and Rush, C. M. (2010b). Evaluation of Potato Psyllid Cold Tolerance, Overwintering Survival, Sticky Trap Sampling and Effects of *Liberibacter* on Potato Psyllid Alternate Host Plants. *Proceedings of the 10th annual 2010 Zebra Chip reporting session*, 149-153.
- Hernandez-Deheza, M. G., Rojas-Martinez, R. I., Rivera-Pena, A., Zavaleta-Mejia, E., Ochoa-Martinez, D. L., & Carrillo-Salazar, A. (2018). Resistance in potato to two haplotypes of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Journal of Plant Pathology*, 100(2), 191-196.
- Hodkinson, I. D. (1974). The biology of the Psylloidea (Homoptera): a review. *Bulletin of entomological research*, 64(2), 325-338.
- Hodkinson, I. D. (1981). Status and taxonomy of the *Trioza (Bactericera) nigricornis* Forster complex (Homoptera: Triozidae). *Bulletin of Entomological Research*, 71(4), 671-679.
- Hodkinson, I. (2009). Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History*, 43(1-2), 65-179.
- Hung, T. H., Hung, S. C., Chen, C. N., Hsu, M. H., & Su, H. J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. *Plant Pathology*, 53(1), 96-102.
- Irwin, M. E. (1980). Sampling Aphids in Soybean Fields. In M. Kogan & D. C. Herzog (Eds.), *Sampling Methods in Soybean Entomology* (pp. 239-259). New York, NY: Springer New York.
- Jackson, B. C., Goolsby, J., Wzykowski, A., Vitovsky, N., & Bextine, B. (2009). Analysis of genetic relationships between potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) populations in the United States, Mexico and Guatemala using ITS2 and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) data. *Subtropical Plant Science*, 61, 1-5.
- Jerinić-Prodanović, D. R. (2006). Distribution, biology and harmfulness of jumping plant-louse *Bactericera tremblayi* Wagner (Homoptera, Triozidae) in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 21(1), 31-38.
- Jagoueix, S., Bove, J.M., & Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 379-386.
- Kazemi, M. H., & Jafarlou, M. (2008). Laboratory Investigation of the Biology of *Bactericera tremblayi* Wag. (Homoptera: Triozidae) a New Pest in Onion Fields of Iran. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 3.

- Klimaszewski, S. M. (1975). Psyllodea, Koliszki (Insecta: Homoptera). *Fauna Pol.* 3, 1–295.
- Knowlton, G. F., & Thomas, W. L. (1934). Host plants of the potato psyllid. *Journal of Economic Entomology*, 27(2).
- Kogan, M. (1998). Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 243-270.
- Kristoffersen, L., & Anderbrant, O. (2007). Carrot psyllid (*Trioza apicalis*) winter habitats - insights in shelter plant preference and migratory capacity. *Journal of Applied Entomology*, 131(3), 174-178.
- Levy, J., Ravindran, A., Gross, D., Tamborindéguy, C., & Pierson, E. (2011). Trans location of 'Candidatus Liberibacter solanacearum', the Zebra Chip Pathogen, in Potato and Tomato. *Phytopathology*, 101(11), 1285-1291.
- Li, W., Abad, J. A., French-Monar, R. D., Rascoe, J., Wen, A., Gudmestad, N. C., Secor, G.A., Lee, I.M., Duan, Y. & Levy, L. (2009). Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in potato plants with zebra chip. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1), 59-65.
- Liefting, L. W., Ward, L. I., Shiller, J. B., & Clover, G. R. G. (2008a). A New *Candidatus Liberibacter* Species in *Solanum betaceum* (Tamarillo) and *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) in New Zealand. *Plant Disease*, 92(11), 1588-1588.
- Liefting, L. W., Perez-Egusquiza, Z. C., Clover, G. R. G., & Anderson, J. A. D. (2008b). A new 'Candidatus Liberibacter' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease*, 92(10), 1474-1474.
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., & Clover, G. R. G. (2009a). A new "Candidatus Liberibacter" species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant disease*, 93(3), 208-214.
- Liefting, L. W., Weir, B. S., Pennycook, S. R., & Clover, G. R. G. (2009b). 'Candidatus Liberibacter solanacearum', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2274-2276.
- Lin, H., Glynn, J. M., & Civerolo, E. L. (2011a). Complete genome sequence analyses and functional predictions for 'Ca. L. solanacearum', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *Phytopathology*, 101(6), S105-S105.
- Lin, H., Lou, B, Glynn, J.M., Doddapaneni, H., Civerolo, E.L., Chen, C., Duan, Y., Zhou, L., Vahling, CM. (2011b). The Complete Genome Sequence of 'Candidatus Liberibacter solanacearum', the Bacterium Associated with Potato Zebra Chip Disease. *Plos One*, 6(4).

- Lin, H., Islam, M. S., Bai, Y., Wen, A., Lan, S., Gudmestad, N. C., & Civerolo, E. L. (2012). Genetic diversity of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' strains in the United States and Mexico revealed by simple sequence repeat markers. *European Journal of Plant Pathology*, 132(2), 297-308.
- Loiseau, M., Gamier, S., Boirin, V., Merieau, M., Leguay, A., Renaudin, I., Renvoise, J.P. & Gentit, P. (2014). First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Carrot in France. *Plant Disease*, 98(6), 839-839.
- Malumphy, C., Ostrauskas, H., & Pye, D. (2009). Contribution to the knowledge of jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) of Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*, 19(2), 128-131.
- Mauck, K. E., Sun, P., Meduri, V. & Hansen, A. K. (2019). New *Ca. Liberibacter psyllauros* haplotype resurrected from a 49-year-old specimen of *Solanum umbelliferum*: a native host of the psyllid vector. *Scientific Reports*, 9.
- Mendoza-Herrera, A., Levy, J., Harrison, K., Yao, J., Ibanez, F., & Tamborindeguy, C. (2018). Infection by '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotypes A and B in *Solanum lycopersicum* 'Moneymaker'. *Plant Disease*, 102(10), 2009-2015.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2015). Guía de Gestión Integrada de Plagas, patata. (https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.mapa.gob.es%2Fes%2Fagricultura%2Ftemas%2Fsanidad-vegetal%2Fguiadepatata_tcm30-57961.pdf&clen=54961116&chunk=true)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2017). Plan de contingencia de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lso) y sus vectores. 16 p. Available in: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/organismos-nocivos> (Accessed 17/10/2021).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2019). Anuario de Estadística Agraria. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>
- Monger, W. A., & Jeffries, C. J. (2016). First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in parsley (*Petroselinum crispum*) seed. *New Disease Reports*, 34, 31-31.
- Mora, V., Ramasamy, M., Damaj, M. B., Irigoyen, S., Ancona, V., Ibanez, F., Avila, C.A. & Mandadi, K. K. (2021). Potato Zebra Chip: An Overview of the Disease, Control Strategies, and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 2064.

- 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 of Economic Entomology*, 100, 656–663.
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzon-Tiznado, J. A., & Cardenas-Valenzuela, O. G. (2009a). First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in Pepper Plants in Mexico. *Plant Disease*, 93(10), 1076-1076.
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzon-Tiznado, J. A., & Cardenas-Valenzuela, O. G. (2009b). First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in Tomato Plants in Mexico. *Plant Disease*, 93(10), 1076-1076.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., & Buchman, J. L. (2009c). Seasonal Occurrence and Abundance of the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli*, in South Central Washington. *American Journal of Potato Research*, 86(6), 513-518.
- Munyaneza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V.G, Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. (2010a). Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with psyllid-affected carrots in Europe. *Phytopathology*, 100(6), S88-S88
- Munyaneza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. (2010b). Association of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" with the Psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1060-1070.
- Munyaneza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. (2010c). First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" Associated with Psyllid-Affected Carrots in Europe. *Plant Disease*, 94(5), 639-639.
- Munyaneza, J. E. (2010d). Emerging Leafhopper-Transmitted Phytoplasma Diseases of Potato. *Southwestern Entomologist*, 35(3), 451-456.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Buchman, J. L., & Sengoda, V. G. (2010e). Susceptibility of different potato plant growth stages to purple top disease. *American Journal of Potato Research*, 87(1), 60-66.
- Munyaneza, J. E., Lemmetty, A., Nissinen, A. I., Sengoda, V. G., & Fisher, T. W. (2011). Molecular detection of aster yellows phytoplasma and *Candidatus Liberibacter Solanacearum* in carrots affected by the psyllid *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Finland. *Journal of Plant Pathology*, 697-700.
- Munyaneza J.E. (2012a). Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research*, 89, 329–350.

- Munyaneza J.E., Sengoada V.G., Buchman J.L., Fisher T.W. (2012b) Effects of temperature on 'Candidatus Liberibacter solanacearum' and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease*, 96, 18–23.
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Stegmark, R., Arvidsson, A. K., Anderbrant, O., Yuvaraj, J. K., Ramert, B. & Nissinen, A. (2012c). First Report of "Candidatus Liberibacter solanacearum" Associated with Psyllid-Affected Carrots in Sweden. *Plant Disease*, 96(3), 453-453.
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Sundheim, L., & Meadow, R. (2012d). First Report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* associated with Psyllid-Affected Carrots in Norway. *Plant Disease*, 96(3), 454-454.
- Munyaneza, J. E. & D. C. Henne. (2013). Leafhopper and Psyllid Pests of Potato. In *Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management*, eds. P. Giordanengo, C. Vincent & A. Alyokhin, 65-102. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Munyaneza, J. (2015). Zebra Chip Disease, *Candidatus Liberibacter*, and Potato Psyllid: A Global Threat to the Potato Industry. *American Journal of Potato Research*, 92.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4325.
- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., & Tamborindeguy, C. (2014). Correlation between "Candidatus Liberibacter solanacearum" infection levels and fecundity in its psyllid vector. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115, 55-61.
- Navarre, D. A., Shakya, R., Holden, J., & Crosslin, J. M. (2009). LC-MS Analysis of Phenolic Compounds in Tubers Showing Zebra Chip Symptoms. *American Journal of Potato*
- Nelson, W. R., Fisher, T. W., & Munyaneza, J. E. (2011). Haplotypes of *Candidatus Liberibacter solanacearum* suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 5-12.
- Nelson, W. R., Sengoda, V. G., Alfaro-Fernandez, A. O., Font, M. I., Crosslin, J. M., & Munyaneza, J. E. (2013). A new haplotype of "Candidatus Liberibacter solanacearum" identified in the Mediterranean region. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 633-639.
- Nissinen, A., Kristoffersen, L., & Anderbrant, O. (2008). Physiological state of female and light intensity affect the host-plant selection of carrot psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera : Triozidae). *European Journal of Entomology*, 105(2), 227-232.

- Nissinen, A. I., Haapalainen, M., Jauhiainen, L., Lindman, M., & Pirhonen, M. (2014). Different symptoms in carrots caused by male and female carrot psyllid feeding and infection by *Candidatus Liberibacter solanacearum*. *Plant Pathology*, 63(4), 812-820.
- Nissinen, A. I., Haapalainen, M., Ojanen, H., Pirhonen, M., & Jauhiainen, L. (2020). Spreading of *Trioza apicalis* and development of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" infection on carrot in the field conditions. *Annals of Applied Biology*, 168(1), 39-50.
- Novy, R. G., Whitworth, J., Alvarez, J., Trumble, J. T., Butler, C. D., Buchman, J. L., & Munyaneza, J. E. (2010). Unique tri-species germplasm with multiple insect resistances and its use in breeding for resistance to resistance to psyllid/ZC. 2010 *Zebra Chip Reporting Session*, 103.
- Observatorio de plagas y enfermedades agrícolas de Castilla y León, 2021. *Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León*. (<https://plagas.itacyl.es/patata>)
- Ouvrard, D., & Burckhardt, D. (2012). First record of the onion psyllid *Bactericera tremblayi* (Wagner, 1961) in France (Insecta: Hemiptera: Sternorrhyncha: Psylloidea), new symptoms on leek crops and reassessment of the *Bactericera nigricornis*-group distribution. *EPPO Bulletin*, 42(3), 585-590.
- Ouvrard, D. (2021) Psyllist - The World Psylloidea Database. (<http://www.hemiptera-databases.com/psyllist> - searched on 26 July 2021)
- Ossiannilsson, F. (1992). The Psylloidea (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark (Vol. 26). Brill.
- Palomo J.L., B. E., Martín-Robles M.J. Teresani G., López M.M. Cambra, M. (2014). Detección en patata en España de un haplotipo de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' no descrito en solanaceas. (Vol. 7). *Resúmenes del Congr la Soc Española Fitopatología*.
- Patata de siembra en España, 2021. (<https://patatadesiembra.es/produccion-de-semilla-de-patata-certificada-en-espana>)
- Percy, D. M., Page, R. D. M., & Cronk, Q. C. B. (2004). Plant-Insect Interactions: Double-Dating Associated Insect and Plant Lineages Reveals Asynchronous Radiations. *Systematic Biology*, 53(1), 120-127.
- 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(3), 389-398.
- Pletsch, D. J. (1947). The potato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. *Bull. Mont. agric. Exp. Stn.*, 446.

- Rashed, A., Nash, T. D., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2012). Transmission Efficiency of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' and Potato Zebra Chip Disease Progress in Relation to Pathogen Titer, Vector Numbers, and Feeding Sites. *Phytopathology*, 102(11), 1079-1085.
- Rashed, A., Wallis, C. M., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2013). Zebra Chip Disease and Potato Biochemistry: Tuber Physiological Changes in Response to '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Infection Over Time. *Phytopathology*, 103(5), 419-426.
- Rashed, A., Workneh, F., Paetzold, L., Gray, J., & Rush, C. M. (2014). Zebra Chip Disease Development in Relation to Plant Age and Time of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Infection. *Plant Disease*, 98(1), 24-31.
- Rashidi, M., Novy, R. G., Wallis, C. M., & Rashed, A. (2017). Characterization of host plant resistance to zebra chip disease from species-derived potato genotypes and the identification of new sources of zebra chip resistance. *Plos One*, 12(8).
- Reuter, O. M. (1908). Charakteristik und Entwicklungsgeschichte der Hemipteren-Fauna (Heteroptera, Auchenorrhyncha und Psyllidae) der palaearktischen Coniferen (Vol. 36): Druckerei der Finnischen Litteratur-Gesellschaft.
- Ruíz de Azua, E., 2009. Biología del gusano de alambre (*Agriotes* spp.) en la llanada alavesa y desarrollo de estrategias de control integrado y en el cultivo de la patata. *Tesis Doctoral presentada en la Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea*.
- Ruíz-Padilla, A., Redondo, C., Asensio, A., Garita-Cambrónero, J., Martínez, C., Pérez-Padilla, V., Marquínez, R., Collar, L., García-Méndez, E., Alfaro-Fernández, A., Asensio-S-Manzanera, M., Palomo, J.L., Siverio, F., De León, L. & Cubero, J. (2020). Assessment of Multilocus Sequence Analysis (MLSA) for Identification of *Candidatus Liberibacter Solanacearum* from Different Host Plants in Spain. *Microorganisms*, 8(9), 1446.
- Rygg, T. 1977: Biological Investigations on the carrot psyllid *Trioza apicalis* Förster (Homoptera, Triozidae); *Norwegian Plant Protection Institute, Division of Entomology*, 1432 As-NLH, Report No. 76
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, 3(3), 430-439.
- Schaefer, H. A. (1949). Biologische und ökologische Beobachtungen an Psylliden (Hemiptera). *Verh. naturf. Ges. Basel*, 60, 25-41.

- Secor, G. A., Rivera, V. V., Abad, J. A., Lee, I. M., Clover, G. R. G., Liefting, L. W., Li, X., De Boer, S. H. (2009). Association of *Candidatus Liberibacter solanacearum* with Zebra Chip Disease of Potato Established by Graft and Psyllid Transmission, Electron Microscopy, and PCR. *Plant Disease*, 93(6), 574-583.
- Sengoda, V. G., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Buchman, J. L., & Pappu, H. R. (2010). Phenotypic and Etiological Differences Between Psyllid Yellows and Zebra Chip Diseases of Potato. *American Journal of Potato Research*, 87(1), 41-49.
- Sengoda, V. G., Buchman, J. L., Henne, D. C., Pappu, H. R., & Munyaneza, J. E. (2013). "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" Titer Over Time in *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae) After Acquisition from Infected Potato and Tomato Plants. *Journal of Economic Entomology*, 106(5), 1964-1972.
- Sengoda, V. G., Cooper, W. R., Swisher, K. D., Henne, D. C., & Munyaneza, J. E. (2014). Latent Period and Transmission of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" by the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae). *Plos One*, 9(3).
- Shimwela, M. M., Narouei-Khandan, H. A., Halbert, S. E., Keremane, M. L., Minsavage, G. V., Timilsina, S., Massawe, D.P., Jones, J.B. & van Bruggen, A. H. C. (2016). First occurrence of *Diaphorina citri* in East Africa, characterization of the *Ca. Liberibacter* species causing huanglongbing (HLB) in Tanzania, and potential further spread of *D. citri* and HLB in Africa and Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 146(2), 349-368.
- Soliman, T., Mourits, M. C. M., Lansink, A. G. J. M. O., & van der Werf, W. (2013). Economic justification for quarantine status - the case study of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in the European Union. *Plant Pathology*, 62(5), 1106-1113.
- Swisher Grimm, K. D., & Garczynski, S. F. (2019). Identification of a New Haplotype of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in *Solanum tuberosum*. *Plant Disease*, 103(3), 468-474.
- Sociedad Española de Fitopatología (2010). Patógenos de plantas descritos en España. *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino*, 2010.
- Tahzima, R., Maes, M., Achbani, E. H., Swisher, K. D., Munyaneza, J. E., & De Jonghe, K. (2014). First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' on Carrot in Africa. *Plant Disease*, 98(10), 1426-1426.
- Tahzima, R., Massart, S., Achbani, E. H., Munyaneza, J. E., & Ouvrard, D. (2017). First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Associated with the Psyllid *Bactericera trigonica* Hodkinson on Carrots in Northern Africa. *Plant Disease*, 101(1), 242-243.

- Tanaka, F. A. O., Coletta-Filho, H. c. D., Alves, K. C. S., Spinelli, M. O., Machado, M. A., & Kitajima, E. W. (2007). Detection of the "*Candidatus Liberibacter americanus*" in phloem vessels of experimentally infected *Catantop roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatologia Brasileira*, 32(6), 519-519.
- Tatineni, S., Sagaram, U. S., Gowda, S., Robertson, C. J., Dawson, W. O., Iwanami, T., & Wang, N. (2008). In planta distribution of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology*, 98(5), 592-599.
- Teixeira D.C., Saillard C., Couture C., Martins E.C., Wulff N.A., Eveillard-Jagoueix S., Yamamoto P.T., Ayres A.J., Bové J.M. (2008b) Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22, 139–150.
- Teresani, G. R., Bertolini, E., Alfaro-Fernandez, A., Martinez, C., Ossamu Tanaka, F. A., Kitajima, E. W., Rosello, M., Sanjuan, S., Ferrándiz, J.C., López, M.M., Cambra, M. & Font, M.I. (2014). Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with a Vegetative Disorder of Celery in Spain and Development of a Real-Time PCR Method for Its Detection. *Phytopathology*, 104(8), 804-811.
- Teresani, G., Hernandez, E., Bertolini, E., Siverio, F., Marroquin, C., Molina, J., De Mendoza, A.H. & Cambra, M. (2015). Search for potential vectors of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*': population dynamics in host crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(1).
- Teulon, D., Workman, P. J., Thomas, K. L., & Nielsen, M.-C. (2009). *Bactericera cockerelli*: incursion, dispersal and current distribution on vegetable crops in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 62, 136-144.
- Teixeira, D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., and Bové, J.M. (2005). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Disease*, 89(1), 107-107.
- Thomas, K. L., Jones, D. C., Kumarasinghe, L. B., Richmond, J. E., Gill, G. S. C., & Bullians, M. S. (2011). Investigation into the entry pathway for tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli*. *New Zealand Plant Protection*, 64, 259-268.

- Thomas, J. E., Geering, A. D. W., & Maynard, G. (2018). Detection of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato on Norfolk Island, Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 13(1).
- Tiilikkala K., Ketola J., S-L. Taivalmaa. (1996). Monitoring and threshold value for control of the carrot psyllid. *Integrated Control in Field Vegetable Crops. IOBC wprs Bulletin* 19/11/: 18-24.
- Tuthill, L. D. (1945). Contributions to the knowledge of the Psyllidae of Mexico (continued). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 18(1), 1-29.
- Valterova, I., Nehlin, G., & BorgKarlson, A. K. (1997). Host plant chemistry and preferences in egg-laying *Trioza apicalis* (Homoptera, Psylloidea). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(6), 477-491.
- Wallis, R. L. (1951). Potato psyllid selection of host plants. *Journal of Economic Entomology*, 44(5), 815-817.
- Wallis, R. L. (1955). Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. *USDA Technical Bulletin*, 1107(25.).
- Wallis, C. M., Chen, J., & Civerolo, E. L. (2012). Zebra chip-diseased potato tubers are characterized by increased levels of host phenolics, amino acids, and defense-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 66-72.
- Wallis, C. M., Rashed, A., Wallingford, A. K., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2014). Similarities and Differences in Physiological Responses to '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Infection Among Different Potato Cultivars. *Phytopathology*, 104(2), 126-133.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S. & Sharma, H.C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7, 1306–1320.
- Wen, A., Mallik, I., Alvarado, V. Y., Pasche, J. S., Wang, X., Li, W., Levy, L., Lin, H., Scholthof, H.B., Mirkov, T.E., Rush, C.M. & Gudmestad, N. C. (2009). Detection, Distribution, and Genetic Variability of '*Candidatus Liberibacter*' Species Associated with Zebra Complex Disease of Potato in North America. *Plant Disease*, 93(11), 1102-1115.
- White, T. C. R. (1970). Some aspects of the life history, host selection, dispersal and oviposition of adult *Cardiaspina densitexta* (Homoptera: Psyllidae). *Australian Journal of Zoology*, 18(1), 105-117.

Yao, J., Saenkham, P., Levy, J.G., Ibanez, F., Noroy, C., Mendoza, A., Huot, O.B., Meyer, D.F., & Tamborindéguy, C. (2016). Interactions “*Candidatus* Liberibacter solanacearum”—*Bactericera cockerelli*: Haplotype Effect on Vector Fitness and Gene Expression Analyses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6.