



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

## **DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VARIEGADO DEL CHILE (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) EN MICHOACÁN.**

**MOISÉS CAMACHO TAPIA**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

**2015**

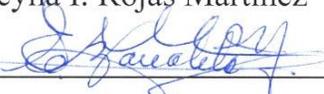
La presente tesis titulada: **DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VARIEGADO DEL CHILE (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) EN MICHOACÁN**, realizada por el alumno: Moisés Camacho Tapia bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA  
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_

  
Dra. Reyna I. Rojas Martínez

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dra. Emma Zavaleta Mejía

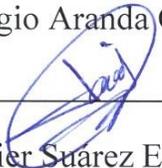
ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Ángel Rebollar Alviter

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Sergio Aranda Ocampo

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Javier Suárez Espinosa

Montecillo, Texcoco, Estado de México a junio de 2015

## RESUMEN

### DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VARIEGADO DEL CHILE (*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*) EN MICHOACÁN.

Moisés Camacho Tapia, DC.

Colegio de Postgraduados, 2015

La presente investigación se llevó a cabo con los siguientes objetivos: 1) Conocer la translocación de *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* (*CaLs*) en plantas de chile en cámaras de ambiente controlado, 2) conocer si la bacteria se transmite transováricamente en el insecto vector y 3) estudiar la dinámica espacio-temporal de *CaLs* en el cultivo de chile. Para estudiar la translocación de *CaLs* se probaron dos periodos de adquisición de la bacteria (4 y 24hrs) y dos temperaturas (17 y 21°C). Para el estudio de transmisión transovárica, en condiciones de invernadero se establecieron colonias en plantas sanas de chile y papa. Los resultados indicaron que a los 21 días posteriores de la inoculación, *CaLs* se detectó en todos los estratos de la planta cuando *B. cockerelli* adquirió la bacteria durante un periodo de 24 hr y cuando las plantas se mantuvieron a 21°C. No se detectó la presencia de *CaLs* en los individuos de las cuatro generaciones de *B. cockerelli* lo que indica que en las condiciones en las que se realizó la presente investigación no hubo transmisión transovárica. Para el estudio de la dinámica espacio-temporal; se evaluó la incidencia de la enfermedad con intervalos de dos semanas en los ciclos de julio-diciembre del 2012 y 2013; se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con el software Scientific Work Place

5.5 ©. En los cuadrantes se determinó si los datos tenían ajuste a una distribución binomial y  $\beta$ -binomial mediante el software BBD. El modelo que mejor describió el proceso de desarrollo de la epidemia fue el modelo logístico. La incidencia de CaLs se vio influenciada por la dinámica de *B. cockerelli*. En la mayoría de los casos la epidemia ajustó una distribución  $\beta$ -binomial. El índice de proximidad que describió la formación de los agregados fue Rook.

**Palabras clave:** *Candidatus* Liberibacter solanacearum, variegado de chile, translocación, epidemia, modelo logístico.

## ABSTRACT

SPATIO TEMPORAL DYNAMIC OF VARIEGATE PEPPER (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) IN MICHOACÁN.

Moisés Camacho Tapia, DC.

Colegio de Postgraduados, 2015

This research was conducted with the following objectives: 1) Determine the translocation of *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*CaLs*) in pepper plants in controlled environment chambers, 2) determine if the bacteria is transmitted transovarially in the insect vector and 3) study the spatio temporal dynamics *CaLs* in pepper. To study translocation of *CaLs* two acquisition periods of bacteria (4 and 24 hours) and two temperatures (17 and 21 ° C) they were tested. To study transovarial transmission, colonies were established in healthy pepper and potato plants under greenhouse conditions. The results showed that at 21 days after inoculation, *CaLs* was detected in all strata of the plant when the bacteria *B. cockerelli* acquired over a period of 24 hr and when the plants were kept at 21 °C. *CaLs* presence was no detected in individuals from four generations of *B. cockerelli* indicating that no transmission transovarial under the conditions in which this research was conducted. To study the spatio temporal dynamic; the incidence of the disease was evaluated at intervals of two weeks in cycles from July to December 2012 and 2013; the area under the curve of disease progress (AUDPC) was calculated in Scientific Work Place 5.5 ® software. In the quadrants was determined whether the data were fit to a  $\beta$ -binomial and binomial distribution

by BBD software. The model that best described the process of development of the epidemic was the logistic model. The incidence of *CaLs* was influenced by the dynamics of *B. cockerelli*. In most cases the epidemic fitted  $\beta$ - binomial distribution. The index of proximity described the formation of aggregates was Rook.

**Key words:** *Candidatus* *Liberibacter solanacearum*, variegated of pepper, translocation, epidemic, logistic model.

## **DEDICATORIA**

A mis padres

**Rufino Camacho Miranda**

**Martha Tapia Martínez**

A mi hermano

Rufino Camacho Tapia

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento para mis estudios de Doctorado en Ciencias en Fitopatología.

Colegio de Postgraduados y al Instituto de Fitosanidad por haberme brindado su hospitalidad.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez por sus valiosos comentarios que permitieron concluir esta investigación.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por su disposición y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Ángel Rebollar Alviter, por asesorarme y aportar valiosas sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo, además de apoyo en interpretación de datos obtenidos.

Al Dr. Javier Suarez Espinosa, por sus valiosas sugerencias en mi investigación y apoyo en análisis e interpretación de datos.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por su disposición y sugerencias que apoyaron a este trabajo.

A mis amigos, profesores y compañeros que hicieron agradable mi estancia en el Colegio de Postgraduados

## CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	iii
ABSTRACT.....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	vx
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
LITERATURA CITADA.....	24
<b>CAPÍTULO I. ASPECTOS BIOLÓGICOS, ECOLÓGICOS, EPIDEMIOLOGICOS Y MANEJO DE <i>Candidatus Liberibacter</i>.....</b>	<b>27</b>

RESUMEN.....	27
<i>Candidatus</i> Liberibacter.....	28
Aislamiento de <i>Candidatus</i> Liberibacter.....	29
<i>Candidatus</i> Liberibacter en distintos hospedantes.....	30
Factores climáticos.....	32
Respuesta del hospedante.....	33
Factores de virulencia.....	35
Manejo de <i>Candidatus</i> Liberibacter.....	37
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40
<b>CAPÍTULO II. TRANSLOCACIÓN DE <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum EN PLANTAS DE CHILE .....</b>	<b>48</b>

RESUMEN.....	48
INTRODUCCIÓN.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
Translocación de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> en plantas de chile.....	51
Colonias de <i>Bactericera cockerelli</i> .....	51
Fuente de inóculo de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> .....	52
Transmisión de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> .....	52
Detección de <i>Liberibacter</i> en las plantas inoculadas.....	54
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en individuos de cuatro generaciones de <i>Bactericera cockerelli</i> .....	55
Colecta y establecimiento de la colonia de <i>Bactericera cockerelli</i> .....	55
Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> en <i>B. cockerelli</i> .....	56

RESULTADOS.....	57
Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> en plantas de Chile.....	57
Translocación de <i>Liberibacter</i> .....	58
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en las cuatro generaciones de <i>B. cockerelli</i> .....	65
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	69
LITERATURA CITADA.....	70
<b>CAPÍTULO III. DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VARIEGADO DEL CHILE (<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>) EN MICHOACÁN...</b>	<b>74</b>
RESUMEN.....	74
INTRODUCCIÓN.....	75

MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
Ubicación de las parcelas y variables a evaluar.....	78
Poblaciones de <i>Bactericera cockerelli</i> .....	78
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en plantas sintomáticas.....	78
Incidencia.....	80
Análisis temporal de la epidemia.....	80
Análisis espacial de la epidemia.....	81
RESULTADOS.....	82
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	82
Dinámica poblacional de <i>Bactericera cockerelli</i> .....	82
Análisis temporal de la epidemia.....	83
Análisis espacial de la epidemia.....	86

DISCUSIÓN.....	96
CONCLUSIONES.....	101
LITERATURA CITADA.....	101

## INDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO II

CUADRO		PAG
1	Tratamientos establecidos para las pruebas de transmisión y movimiento de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en plantas de chile jalapeño, con un tiempo de transmisión de 7 días.....	53
2	Efecto del periodo de adquisición (4 y 24hrs) y las temperaturas (17 y 21°C) en la proporción de plantas de chile con <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum.....	61
3	Translocación de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en plantas de chile durante seis semanas bajo el tratamiento con temperatura 17°C y tiempo de adquisición de 4hrs.....	62
4	Translocación de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en plantas de chile durante seis semanas bajo el tratamiento con temperatura 21°C y tiempo de adquisición de 4hrs.....	63
5	Translocación de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en plantas de chile durante seis semanas bajo el tratamiento con temperatura	

	21°C y tiempo de adquisición de 24hrs en contraste con temperatura	65
	17°C y 24hrs de tiempo de adquisición.....	
6	Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en las generaciones de <i>B. cockerelli</i> de las colonias provenientes de Yurécuaro y Toluca.....	66

### CAPÍTULO III

1	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en Yurécuaro y Vista Hermosa, en los distintos cuadrantes evaluados (c1, c2, c3).....	85
2	Prueba de Wald para comparar las curvas de progreso de la epidemia Yurécuaro (Yu) con base en los parámetros $y_0=0.0031$ $rL=0.034$ y Vista Hermosa (Vis) $y_0=0.0208$ y $rL=0.0223$ , en los distintos cuadrantes (c1, c2, c3).....	86
3	Índices y pruebas de dispersión de los datos de incidencia del variegado del chile, causado por <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	87

4	Autocorrelación espacio-temporal de la incidencia de plantas con <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en los cuadrantes de Yurécuaro, con un patrón de proximidad de Rook en los distintos lag de tiempo y espacio.....	91
5	Autocorrelación espacio-temporal de la incidencia de plantas con <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en los cuadrantes de Vista Hermosa, con un patrón de proximidad de Rook en los distintos lag de tiempo y espacio.....	93
6	Tipo de agregación y proximidad en Yurécuaro en los distintos cuadrantes.....	94
	Tipo de agregación y proximidad en Vista Hermosa en los distintos cuadrantes. ....	95

## INDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

FIGURA		PAG
1	Productos de reamplificación por PCR obtenidos con los primers Lso 16/23s.1.- marcador de 100pb, 2) punto de transmisión, 3) peciolo, 4) hojas del primer tercio superior de la planta, 5) hojas del segundo tercio de la planta, 6) tallo, 7) raíz, 8) negativo agua libre de DNA asa y RNA asa.....	58
2	Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en los distintos estratos de acuerdo al progreso del tiempo y su comportamiento. A) Punto de transmisión (PT) T17-A4h/ PT T21-A4h; B) peciolo T17-A4h/peciolo T21-A4h; C) 2/3 superior T17-A4h/ 2/3 superior T21-A4h.....	59
3	Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en los distintos estratos de acuerdo al progreso del tiempo y su comportamiento en las diferentes temperaturas. A) 1/3 superior T17-A24h y 1/3 superior T21-A24h; B) peciolo T17-A24h y peciolo T21-A24h.....	60

### CAPÍTULO III

1	Dinámica de <i>Bactericera cockerelli</i> , en chile de la variedad Rivera del ciclo de cultivo del 2013. A) Yurécuaro, B) Vista Hermosa. ....	83
2	Progreso temporal de la incidencia del variegado de chile, causado por <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> y modelo logístico. A) Yurécuaro y B) Vista Hermosa en 3 y 2 cuadrantes, respectivamente, en chile de la variedad Rivera del ciclo de cultivo del 2013.....	84
3	Agregación en el cuadrante 1 de Yurécuaro, en los distintos días del trasplante (ddt), porcentaje de incidencia, índice de agregación y patrón de proximidad.....	88
4	Agregación en el cuadrante 2 de Vista Hermosa, en los distintos días del trasplante (ddt), porcentaje de incidencia, agregación y patrón de proximidad.....	89

5 Agregación en el cuadrante 3 de Vista Hermosa, en los distintos días del trasplante (ddt), porcentaje de incidencia, agregación y patrón de proximidad.....

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La epidemiología es el estudio de las epidemias en tiempo y espacio; la epidemia es la presencia de una enfermedad en una población de plantas. La enfermedad es el resultado de la interacción exitosa de tres componentes: patógeno, planta y ambiente. La enfermedad conocida como “variegado de chile” es el resultado de esa interacción (*Candidatus Liberibacter solanacearum*, chile, y las condiciones ambientales) (Madden *et al.*, 2007; Camacho-Tapia *et al.*, 2011).

*Candidatus Liberibacter* es una bacteria que se aloja en los tubos cribosos del floema; puede presentar formas redondas cuando termina el ciclo celular. Se transmite por semilla (Camacho-Tapia *et al.*, 2011) e insectos vectores, en los cuales se encuentra en la hemolinfa y las glándulas salivales (Jagoueix *et al.*, 1994; Ammar *et al.*, 2011); esta bacteria afecta a distintos cultivos como Rutáceas, Solanáceas, Apiáceas (Liefting *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2013). En Rutáceas se presentan; *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus* que son transmitidos por *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor *et al.*, 1967; Yamamoto *et al.*, 2006) y *Ca. L. africanus*, transmitido por *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan y Oberholzer, 1965). En Solanáceas y Apiáceas se encuentra *CaLs*, que es transmitido por *Bactericera cockerelli* y *Trioza apicalis* (Liefting *et al.*, 2008).

En el floema de las plantas de papa infectadas por *Ca. L. solanacearum* se encuentran agregaciones de componentes fenólicos, peroxidasas, oxidasas, polifenoles, quitinasas, liberación de aminoácidos, y azúcares (sacarosa, glucosa, y fructuosa) (Rashed *et al.*, 2013).

Esas respuestas aparecen entre la tercera y la quinta semana después de la infección. El incremento de la actividad reductiva de azúcares y aminoácidos contribuye al aumento del tono café al freír las papas, debido a que la formación de acrilamida ocurre con el uso de esos componentes como sustratos a temperatura de freído mediante la reacción de Maillard (Wallis *et al.*, 2014).

En cuanto a su respuesta fisiológica a la temperatura, se ha encontrado que el desarrollo de *CaLs* se ve afectado a 17°C o menos al igual que a temperaturas de 32°C o superior; de tal forma que hay reducción de los síntomas ocasionados por la bacteria. Por lo tanto, se reporta que el desarrollo óptimo de *Ca. L. solanacearum* se encuentra de 27°C a los 32°C. Esa sensibilidad de *Ca. L. solanacearum* al calor puede explicar la incidencia y la severidad de los síntomas de “Zebra Chip” en las áreas productoras. El desarrollo óptimo del psílido *Bactericera cockerelli* es a 27°C, una sola generación se puede completar en 3 a 5 semanas a esta temperatura, mientras que la oviposición, eclosión, desarrollo y sobrevivencia son retardados o reducidos a 32°C, y cesan a 35°C o más (List, 2009), por lo que se sugiere que hay una coevolución entre las especies de *CaLs* y su insecto vector relacionada con la sensibilidad a la temperatura y humedad relativa (Munyaneza *et al.*, 2012).

Estudios epidemiológicos en el patosistema *Ca. L. asiaticus*-cítricos indican que la epidemia es descrita por una distribución  $\beta$ -binomial. Esta distribución se ajusta a epidemias que tienden hacia la formación de agregados, en este caso originados por la diseminación de la bacteria mediante su insecto vector; Henne *et al.* (2012) indicaron que la incidencia del

“zebra chip” ocasionado por *Ca. L. solanacearum*, es descrita por una distribución  $\beta$ -binomial, que indica la presencia de agregaciones de plantas infectadas, a excepción de los casos donde la incidencia es menor a 0.20 % donde la tendencia es aleatoria. Esta característica de agregación en este tipo de epidemias se origina por los diferentes ciclos re-infectivos y dispersión por parte del insecto vector (Gottwald *et al.*, 1989; Madden y Hedges 1995; Gottwald *et al.*, 2007; Henne *et al.*, 2012). Nachappa *et al.* (2014) demostraron que las poblaciones de insectos portadores de *CaLs* tienden a disminuir por la cantidad de bacterias ubicadas en el aparato digestivo, que compiten con los simbiositos que tiene *B. cockerelli* como el caso de *Wolbachia sp.* ya que se afecta el incremento de su población al disminuir los niveles de fecundidad y supervivencia de psílidos con *CaLs*. Así mismo, indican que existe una correlación negativa de supervivencia de ninfas infectadas con *CaLs* que influye en los ciclos re-infectivos; en los cuales los adultos tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales de *B. cockerelli*.

Por otro lado, el conocimiento de la epidemiología de una enfermedad en el patosistema en campo proporciona un mejor entendimiento, ya sea en su tipo de agregación, el progreso en el tiempo-espacio, la duración de ésta, la incidencia y su severidad, que conduce al diseño de un manejo adecuado de la enfermedad (Madden *et al.*, 2007

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, E., V. G. Segonda, B. Bextine, K. F. McCue, J. E. Munyaneza. 2013. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on tobacco in Honduras. *Plant Dis.* 97:1376.
- Ammar, E.-D., R. G. Shatters Jr., D. G. Hall. 2011. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence *in situ* hybridization. *J. Phytopathol.* 159:726–734
- Camacho-Tapia, M., R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, M. G. Hernández-Deheza, J. A. Carrillo-Salazar, A. Rebollar-Alviter, D. L. Ochoa-Martínez. 2011. Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *J. Plant Pathol.* 93:331-335.
- Capoor, S. P., D. G. Rao, S. M. Visnawanath. 1967. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian J. Agric. Sci.* 37:572-576.
- Gottwald, T. R., B. Aubert, X.-Y. Zhao. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79:687-693.
- Gottwald, T. R., J. V. da Graça, R. B. Bassanezi. 2007. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Henne, D. C., F. Workneh, C. M. Rush. 2012. Spatial patterns and spread of potato zebra chip disease in the Texas Panhandle. *Plant Dis.* 96:948-956.

- Hughes, G., L. V. Madden. 1993. Using the beta-binomial distribution to describe aggregated patterns of disease incidence. *Phytopathology* 83:759-763.
- Jagoueix, S., J. M. Bové, M. Garnier. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bact.* 44:379-386.
- Liefting, L. W., Z. C. Perez-Egusquiza, G. R. G. Clover, J. A. D Anderson,. 2008. A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92:1474.
- List, G. M. 2009. The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *J. Econ. Ent.* 32:30-36.
- Madden, L. V., G. Hughes. 1995. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:529-564.
- Madden, L. V., G. Hughes, F. van den Bosch. 2007. *The Study of Plant Disease Epidemics.* APS Press, St. Paul, MN. 432p.
- McClellan, A. P. D., P. C. J. Oberholzer. 1965. Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8:297-298.
- Munyaneza, J. E., V. G. Sengoda, J. L. Buchman, T. W. Fisher. 2012. Effects of temperature on ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Dis.* 96:18-23.

- Nachappa, P., J. Levy; E. Pierson, C. Tamborindeguy. 2014. Correlation between “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection levels and fecundity in its psyllid vector. *J. Invertebr. Pathol.* 115:55-61.
- Rashed, A., C. M. Wallis, L. Paetzold, F. Workneh, C. M. Rush. 2013. Zebra chip disease and potato biochemistry: tuber physiological changes in response to ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ infection over time. *Phytopathology* 103:419-426.
- Wallis, C. M., A. Rashed, A. K. Wallingford, L. Paetzold, F. Workneh, C. M. Rush. 2014. Similarities and differences in physiological responses to ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ infection among different potato cultivars. *Phytopathology* 104:126-133.
- Yamamoto P. T., M. R. Felipe, L. F. Garbim, J. H. C. Coelho, N. L. Ximenes, E. C. Martins, A. P. R. Leite, M. C. Sousa, D. P. Abrahão, J. D. Braz. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. Page 96 In: Proc. Int. Huanglongbing-Greening Workshop. University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- Zadoks, J. C., R. D. Shein. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press. Oxford. 427p.

## CAPÍTULO I.

### ASPECTOS BIOLÓGICOS, ECOLÓGICOS, EPIDEMIOLÓGICOS Y MANEJO DE *Candidatus Liberibacter*.

Moisés Camacho-Tapia<sup>1</sup>, Reyna I. Rojas-Martínez<sup>1\*</sup> (Autor para correspondencia), Emma Zavaleta-Mejía<sup>1</sup>, Ángel Rebollar-Alviter<sup>2</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>1</sup>, Javier Suárez-Espinosa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230. <sup>2</sup>Centros Regionales Unidad Michoacán. Universidad Autónoma de Chapingo, Morelia, Michoacán. <sup>3</sup> Programa de Estadística, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México- Texcoco. Estado de México, México. C. P. 56230.

#### RESUMEN

Se proporciona una visión general de los aspectos biológicos, ecológicos, epidemiológicos y de manejo de *Candidatus Liberibacter*, bacteria de reciente introducción en México, la cual está asociada con enfermedades como: Huanglongbing de los cítricos, Zebra Chip y variegado de chile. En plantas afectadas con *Ca. Liberibacter* se presentan múltiples bolsas localizadas en el floema necrótico y dispersas a través del sistema vascular; la acumulación masiva de almidón, aberraciones en la actividad cambial, y formación excesiva de floema. Se sugiere que la necrosis del floema causa el bloqueo en la corriente y translocación de

nutrimentos, que conduce a los cambios anatómicos como; el moteado con amarillamiento, y amarillamiento de venas.

El control de *Ca. Liberibacter* se enfoca en disminuir las fuentes de inóculo, como el uso de plantas libres, remoción de árboles sintomáticos y el control químico del insecto vector para reducir la transmisión de la bacteria.

**Palabras clave:** *Candidatus Liberibacter*, insecto vector; fuentes de inóculo, control químico.

### ***Candidatus Liberibacter***

*Candidatus Liberibacter* es una bacteria filamentosa que se aloja en los tubos cribosos del floema; puede presentar formas redondas cuando termina el ciclo celular de la bacteria. Se transmite por insectos vectores, donde se encuentra en la hemolinfa y las glándulas salivales (Jagoueix et al., 1994); esta bacteria afecta a distintos cultivos como; Rutáceas, Solanáceas y Apiáceas (Aguilar et al., 2013; Liefting et al., 2008). Una forma de dispersión de la bacteria es mediante semilla infectada y que forma parte del inóculo primario en campo, e influencia la incidencia inicial de la enfermedad y el comportamiento de la epidemia en campo (Camacho-Tapia et al., 2011; Hilf, 2011).

Estudios filogenéticos de la región 16S rRNA, indican que *Ca. Liberibacter* pertenece a las  $\alpha$ -proteobacterias, y que está relacionada con géneros de bacterias del subgrupo  $\alpha$ -2 proteobacteria, como: *Bartonella*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Brucella*, y *Alfipia* (Jagoueix et al., 1994). Observaciones realizadas por microscopía electrónica de transmisión,

muestran que la bacteria tiene un diámetro de 0.2-0.3 $\mu$ m; posee una membrana característica de las bacterias gram negativas, además cuenta con una capa de peptidoglicano que apenas es visible y no tiene evidencia de flagelos o pili. El aislamiento en medio de *Ca. Liberibacter* es difícil, por lo que se imposibilita su caracterización bioquímica, y solo se mantiene como propuesta a género, *Liberibacter*, de *Liber* (corteza) y *bacter* (bacteria), de tal manera que se considera como *Candidatus Liberibacter*. Con base en la comparación de secuencias genéticas de los genes de proteínas ribosomales, se propusieron tres especies en Rutáceas: *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter asiaticus*, y *Ca. Liberibacter americanus*; y una cuarta especie, *Ca. Liberibacter solanacearum* detectada en solanáceas (Jagoueix et al., 1994; Liefting et al., 2008).

### **Aislamiento de *Candidatus Liberibacter***

Los primeros intentos para aislar liberibacter fueron mediante co-cultivos con una actinobacteria, relacionada con *Propionibacterium acnes*. Las colonias aparecían después de un largo tiempo, fueron difícil mantener la colonia libre y trasladarla de manera consecutiva a medio de cultivo nuevo (Davis et al., 2008). En un segundo estudio, se diseñó y evaluó un nuevo medio de cultivo llamado Liber A, obteniéndose un crecimiento irregular, y con un rango de tamaño de 0.1-0.3mm que se observó después de 3-4 días a 28°C. Las colonias no incrementaron su tamaño, y su viabilidad se perdió después de cuatro a cinco reaislamientos, de tal manera que la dificultad para aislarlo imposibilita las pruebas para su estudio bioquímico (Sechler et al., 2009). Parker et al. (2014), indicaron que al agregar jugo de toronja al medio de cultivo, brinda mayor viabilidad a la bacteria, de tal manera que si se

logra obtener en el sustrato de cultivo la mayor aproximación posible a las condiciones naturales en que ocurre la interacción con su hospedante, hace exitoso el aislamiento. La viabilidad de *Ca. L. asiaticus* aumenta en medios de cultivo con jugo de toronja, y disminuye en forma sinuosa con condiciones tales como pH más bajo, la presencia de azúcares, abundancia de elementos minerales y aminoácidos (Parker et al., 2014).

### ***Candidatus Liberibacter en distintos hospedantes***

Huanglongbing (HLB) o conocido como el “greening” de los cítricos, es una enfermedad de cítricos asociada con la infección por tres especies de  $\alpha$ -proteobacteria; *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter africanus* (Bové, 2006). Los síntomas de la enfermedad incluyen manchas moteadas y clorosis que puede llegar a confundirse con deficiencias nutrimentales, además de clorosis en los brotes jóvenes, achaparramiento, y reducción del follaje conforme progresa la enfermedad y en casos extremos, los árboles mueren por la infección (Gottwald et al., 2007).

El rendimiento en los árboles afectados es reducido y éstos pueden producir frutos pequeños y con calidad no aceptable, las variedades comerciales son las más susceptibles (Wang et al., 2009). *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus* son transmitidos por *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006) y *Ca. L. africanus* es transmitido por *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan y Oberholzer, 1965). En los Estados Unidos de América, *Ca. L. asiaticus* se identificó en Florida en el 2005 (Halbert 2005).

Por otro lado, existen evidencias de que la enfermedad conocida como Zebra chip en papa (*Solanum tuberosum*), se originó en el Norte de América y posteriormente se extendió a otros países productores del mundo. El patógeno asociado a esta enfermedad es *Ca. Liberibacter solanacearum*, la cual causa pérdidas económicas a la industria de papa en Estados Unidos de América. Zebra chip fue detectada en Saltillo, México en los 1990's, la cual se asoció primeramente con un fitoplasma (Secor et al., 2004), a principios del 2000 fue reportado en campos comerciales de papa en Pearsall y Valle de Rio Grande, Texas. Para el 2006, la enfermedad se dispersó a otras áreas productoras, como Arizona, Kansas, Colorado, California, Nevada y Nuevo México (Liefting et al., 2008, Munyaneza et al., 2007b). En el 2008, en Auckland, Nueva Zelanda en papa se presentaron los síntomas como: ápices cloróticos, moteado general en hojas, enrizado de las venas medias, achaparramiento de las plantas y en algunos casos deformación de tubérculos, reducción de la producción decoloración en patrón de rayas en los tubérculos crudos y oscurecimientos de estos cuando se fríen (Liefting et al., 2008; Munyaneza et al., 2007a).

*Ca. L. solanacearum* se detectó en el psílido de la zanahoria (*Trioza apicalis*) y en plantaciones infestadas por este psílido en Finlandia. *T. apicalis* es una plaga importante en el norte y centro de Europa, donde puede causar hasta un 100% de pérdidas. En el 2009 se detectó *Ca. L. solanacearum* como patógeno en el cultivo de chile en el sur de Sinaloa; los síntomas de las plantas fueron semejantes al “yellow psilid” que se presenta en papa, aunque también mostraron entrenudos cortos y crecimientos apicales cloróticos (Munyaneza et al., 2009), Camacho-Tapia et al. (2011) demostraron que esta bacteria es responsable del

variegado del chile observado en plantaciones comerciales de esta solanácea en la región de Yurécuaro Michoacán, además de que se puede transmitir por semilla . En el 2013, se reportó *Ca. L. solanacearum* en tabaco en Honduras (Aguilar et al., 2013), mientras que en el 2014 se reportó en el cultivo de chile en ese mismo país (Munyaneza y Segonda 2014). Nuevas especies de liberibacter se reportan, como el caso de *Ca. Liberibacter europaeus* que se detectó como endófito en pera y en el psílido de la pera (*Cacopsylla pyri*) en Italia (Raddadi et al., 2010).

### **Factores climáticos**

La temperatura tiene un efecto significativo en el desarrollo de liberibacter asociada a HLB y a los síntomas de la enfermedad. *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus* se reporta son sensibles al calor, mientras que *Ca. L. asiaticus* aparentemente lo tolera. La sensibilidad del patógeno al calor puede explicar la distribución geográfica de estas especies de liberibacter y sus insectos vectores. *Ca. L. africanus* es influenciado por el calor, de tal manera el desarrollo de los síntomas ocurre de 30 -32°C, *T. erytrae* se presenta en climas frescos y también es sensible a las temperaturas altas combinadas con la baja humedad relativa. En contraste, *Ca. L. asiaticus* es tolerante al calor, los síntomas se desarrollan en condiciones de humedad baja y temperaturas arriba de los 35 °C, que son las temperaturas que tolera *D. citri* (Bové, 2006; Lopes et al., 2009). Estudios realizados en México, indican que el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) es más susceptible a *Ca. Liberibacter asiaticus* con respecto a limón persa (*C. latifolia*) y naranja dulce (*C. sinensis*); además, las características organolépticas se ven afectadas. En arboles de limón persa afectados por *Ca. Liberibacter*

asiaticus, la producción se centra en ramas de crecimiento secundario y la parte externa del dosel del árbol (Esquivel-Chávez et al., 2012).

*Ca. L. solanacearum* a 17°C o menos se ve afectado, pero esto no previene el desarrollo de liberibacter en la planta; mientras que a temperaturas de 32°C o superior, se inhibe la bacteria y también los síntomas ocasionados por ésta. Por lo tanto, se reporta que el desarrollo óptimo de *Ca. L. solanacearum* se encuentra de 27°C – 32°C. Esa sensibilidad de *Ca. L. solanacearum* al calor, puede explicar la incidencia y la severidad en las áreas productoras. El desarrollo óptimo del psílido *Bactericera cockerelli* es a 27°C, mientras que la oviposición, eclosión, desarrollo y sobrevivencia son retardados o reducidos a 32°C, y cesan a 35°C o más (List, 2009). Una sola generación se puede completar en 3-5 semanas según las condiciones de temperaturas, mismas condiciones que son favorables a *Ca. L. solanacearum* y el desarrollo de los síntomas de “Zebra Chip”, por lo que se cree que hay una coevolución entre las especies de liberibacter y su insecto vector para la sensibilidad a la temperatura y humedad relativa (Munyanza et al., 2012).

### **Respuesta del hospedante**

*Candidatus Liberibacter*, está restringido a los elementos cribosos del floema del hospedante, y en las glándulas salivales del insecto vector. En el floema de las plantas infectadas por *Ca. L. solanacearum* se encuentran agregaciones de componentes fenólicos, peroxidasas, oxidasas, polifenoles, quitinasas, liberación de aminoácidos, y azúcares (sacarosa, glucosa, y fructuosa) (Rashed et al., 2013). Esas respuestas aparecen entre la tercera y la quinta semana

después de la infección. El incremento de la actividad reductiva de azúcares y aminoácidos podría contribuir al aumento del tono café al freír las papas, porque la formación de acrilamida ocurre con el uso de esos componentes como sustratos a temperatura de freído mediante la reacción de Maillard (Wallis et al., 2014).

Muestras colectadas de diferentes regiones productoras de cítricos con problemas de HLB, revelan que hay aberraciones anatómicas asociadas con la enfermedad. La microcopia de luz, muestra múltiples bolsas localizadas en el floema necrótico y dispersas a través del sistema vascular; la acumulación masiva de almidón, aberraciones en la actividad cambial, y formación excesiva de floema (Schneider, 1967). La necrosis del floema podría causar el bloqueo en la corriente y translocación de nutrimentos, que conduce a los cambios anatómicos como; el moteado con amarillamiento, y amarillamiento de venas. Uno de los cambios más notables del floema de hojas de árboles infectados, es el abultamiento de la lamela media entre las paredes celulares que rodean los tubos cribosos, además en las hojas sintomáticas viejas, se presentan colapsos de las células del floema que se encuentran cerca del xilema (Folimonova y Achor, 2010). Se ha reportado una relación de aumento de incidencia de HLB en huertos de cítricos con la presencia de *Phytophthora nicotianae*, que afecta a las raíces fibrosas, que cuando sólo está presente *Ca. L. asiaticus*. (Ann et al., 2004; Graham et al., 2011). La detección de *Ca. L. asiaticus* en la raíces de cítricos, indica que esta es capaz de circular y multiplicarse en el tejido de la raíz, y al parecer causa daños a las raíces, antes de la interrupción del floema de las hojas (Graham et al., 2013).

Durante la alimentación de la savia, *B. cockerelli* portador de *Ca. L. solanacearum*, puede inocular plantas sanas donde se multiplica el patógeno y se extiende sistémicamente a través del hospedante. El conocimiento del mecanismo preciso de inoculación y la eficiencia de transmisión del patógeno por *B. cockerelli*, pueden usarse para realizar predicciones de la epidemia, y desarrollar estrategias de manejo integrado de la enfermedad (Rashed et al., 2012). Cuando liberibacter se distribuye en toda la planta, la cantidad de bacteria adquirida por *B. cockerelli* no es influenciada por el sitio de alimentación del insecto; sin embargo, si liberibacter no está completamente distribuida, los insectos muestran tendencia para adquirir altas cantidades de patógeno cuando se alimentan en distintas áreas de las plantas, o cuando se alimentan del tallo (Rashed et al., 2012). El número de insectos vectores puede afectar el tiempo que toma la expresión de los síntomas, debido a la diferencia inicial del inóculo inyectado; aunque después de la multiplicación bacteriana y el movimiento sistémico dentro del hospedante, la enfermedad incrementa en la misma tasa. 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 del patógeno en *B. cockerelli* (Rashed et al., 2012). Rashed et al. (2014), indican que no hay una etapa fisiológica en papa donde sea más susceptible a *Ca. L. solanacearum*; la incidencia está relacionada al movimiento del insecto vector, y la severidad de los síntomas es independiente del título de la bacteria.

### **Factores de virulencia**

A pesar de que *Ca. L. americanus* tiene una membrana exterior intacta, la mayoría de los genes necesarios para biosíntesis de lipopolisacárido (LPS) que se encuentran en *Ca. L.*

asiaticus y *Ca. L. solanacearum*, están ausentes, junto con *lpxA* y *lpxB*, *lpxC*, que están involucrados en los primeros pasos de biosíntesis de lípidos. La falta de LPS en las bacterias gram negativas es muy raro, pero las funciones de barrera por los LPS se pueden compensar por la producción de otras bases de lípidos en la membrana externa. *Ca. L. americanus* y *Ca. L. solanacearum* parecen tener mayor capacidad metabólica para algunos aminoácidos y vitaminas; *Ca. L. solanacearum* tiene la vía completa para la producción de arginina y la glutamina de la ornitina, los genes para la síntesis de glutamina a partir del glutamato están presentes en los genomas de las liberibacter (Wulff et al., 2014). Los síntomas de amarillamientos genéricos y decaimiento, que a menudo se confunden fácilmente con deficiencias nutrimentales, se deben a la acumulación de almidón que indica una alteración del transporte del floema (Nelson, 2013).

En el genoma de *Ca. L. asiaticus* se encontró dos bacteriófagos llamados SC1 y SC2. SC1 parece ser activado cuando *Ca. L. asiaticus*, infecta a los cítricos, SC2 aparentemente es una forma degenerada de SC1 que carece de genes de lisis y lleva la mayoría de los genes que pueden ser importantes en la conversión lisogénica; es decir, aquellos que se expresan en la bacteria y alteran su fisiología, ya sea incrementando su virulencia y patogenicidad, y que son los que originan la aparición de nuevos haplotipos y formas de la enfermedad. SC2 se replica como un plásmido de exclusión cuando se hospeda en *Ca. L. asiaticus* infectivo en plantas y psílidos. SC1 y SC2 se clasifican en la familia *Podoviridae* que pertenece al orden *Caudovirales* (Zhang et al., 2011a).

Estudios indican que *B. cockerelli*, además de portar *Ca. L. solanacearum*, cuenta con tres bacterias intracelulares procarióticas (simbiontes) que se asocian con el insecto; el primario o simbionte obligado (*Carsonella rudii*) (Thao et al., 2006) y dos simbiontes facultativos, un simbionte secundario (S) y dos cepas diferentes de *Wolbachia* (Nachappa et al., 2011). Esos simbiontes son heredables y se transmiten de madre a la progenie (Nachappa et al., 2012). El simbionte primario influye en el proceso biológico fundamental en el insecto con el hospedante y es requerido para la sobrevivencia y desarrollo del psílido, y también simbiontes facultativos que le influyen ecológicamente; por ejemplo *Wolbachia* spp. pueden manipular la reproducción en el insecto y provee de hembras infectadas que tienen una ventaja reproductiva en comparación con las hembras no infectadas; esto incrementa la dispersión de *Wolbachia* spp., además de que proporciona un incremento de insectos y que aumenta el porcentaje de vectores para la transmisión de liberibacter en solanáceas (Nachappa et al., 2012).

### **Manejo de *Candidatus Liberibacter***

Las medidas para el control del “zebra chip”; dependen de la detección temprana y el control del insecto vector (Ravindran et al., 2011). Debido a la ausencia de resistencia genética, se considera la aplicación de insecticidas para disminuir la presencia del insecto vector, por ejemplo el tiametoxan y abacmetina (Gottwald et al., 2009, Lin y Gudmestad, 2013). Hoffman et al., (2013), indican que la termoterapia puede controlar HLB; los primeros reportes de estas prácticas fueron en China, donde se eliminó a liberibacter de varetas y plántulas de semillas, después de que el material se expuso en aire caliente a 49-50°C por 50-

60 min (Lo et al., 1981; Lo, 1983). Sumergir las plántulas de cítricos infectadas por liberibacter en agua caliente a 47-50°C durante 6 min causa un estrés por el calor y puede inducir respuestas de defensa a las plantas que las ayuda a combatir la infección (Hoffman et al., 2013).

El control de *Ca. Liberibacter* se enfoca en reducir las fuentes de inóculo, como el uso de plantas libres, remoción de árboles sintomáticos y con el control químico del insecto vector para reducir la transmisión de la bacteria. En los años 1970's se evaluó el uso de tetraciclina mediante inyecciones directas en el tronco de árboles de cítricos que estaban afectados por HLB en el Sur de África, China e Indonesia, que resultó en una reducción de los síntomas en los árboles tratados, esa práctica se descontinuo debido a que la tetraciclina sólo tiene efecto bacteriostático, de tal manera que se necesitan aplicaciones cada año; además, después de muchas inyecciones, se manifiesta fitotoxicidad en los arboles inyectados. La combinación de penicilina G y estreptomicia tiene un efecto antimicrobial contra *Ca. L. asiaticus* que si se realizara las aplicaciones individuales de esos antibióticos. La penicilina potasio G se asimila rápidamente por las plantas y es relativamente menos fitotóxico. El principal mecanismo de acción de la estreptomicina, está vinculado al ribosoma 30S de la bacteria; cambia su forma e inhibe la síntesis de proteínas y provoca una lectura errónea del mRNA. Según Zhang et al., (2011b), ese mismo tratamiento también puede ser viable para el control de *Ca. L. solanacearum*.

De acuerdo a estudios epidemiológicos, se observa que *Ca. L. solanacearum* tiene un ajuste a distribución  $\beta$  binomial, que indica la presencia de agregaciones de plantas infectadas, a

excepción de los casos donde la incidencia es menor a 0.20 % y la tendencia indicaría distribución aleatoria. Este tipo de agregaciones se debe a los diferentes ciclos re infectivos y distribución por parte del insecto vector (Henne et al., 2012; Madden y Hedges 1995). Se indica que las poblaciones de insectos portadores de liberibacter tienden a disminuir por la cantidad de bacterias ubicadas en el aparato digestivo, ya que de alguna manera se reduce el incremento de su población; se reporta que existe una correlación negativa de sobrevivencia de ninfas infectivas al liberibacter y que influencia los ciclos re infectivos: los adultos tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales de *B. cockerelli* (Nachappa et al., 2014).

## CONCLUSIONES

*Candidatus Liberibacter*, es de importancia económica en la mayoría de los cultivares que se ha detectado; conocer los aspectos biológicos, ecológicos y su epidemiología, provee de un mejor entendimiento sobre su relación en el patosistema donde se encuentra. Los insectos vectores de *Ca. Liberibacter* han coevolucionado según las condiciones climáticas óptimas para su desarrollo; además estas bacterias evolucionan y pueden presentar variaciones genéticas, como las que se identificaron de los haplotipos de *Ca. L. solanacearum*, donde la severidad es influenciada por esas variaciones de la bacteria. Es necesario un control del insecto vector, pues es la forma de diseminación más común en las especies de *Liberibacter*, aunque también la transmisión por semilla es de impacto, la introducción del patógeno desde etapa de plántulas, forma fuente de inóculo primario y afecta la formación de los focos de infección y la incidencia de plantas enfermas en campo.

## REFERENCIAS

- Aguilar, E., Segonda, V. G., Bextine, B., McCue, K. F., Munyaneza, J. E. (2013). First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on Tobacco in Honduras. *Plant Disease* 97,1376.
- Ann, P. J., Ko, W-H., Su, H-J. (2004). Interaction between *Likubinbacterium* and *Phytophthora parasitica* in citrus hosts. *European Journal Plant Pathology* 110,1-6.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century old disease of citrus. *Journal Plant Pathology* 88,7-37.
- Camacho-Tapia M., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Hernández-Deheza, M. G., Carrillo-Salazar, J. A., Rebollar-Alviter, A., Ochoa-Martínez, D. L. (2011). Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *Journal Plant Pathology* 93,331-335.
- Capoor, S. P., Rao, D. G., Visnawanath, S. M. (1967). *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal Agricultural Science* 37,572-576.
- Davis, M. J., Mondal, S. N., Chen, H., Rogers, M. E., Brlansky, R. H. (2008). Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Disease* 92,1547-1550.

- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramirez, M. A., Flores-Sánchez, J. L., López Arroyo, I. (2012). Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46,769-782.
- Folimonova, S. Y., Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100,949-958.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V., Bassanezi, R. B. (2007). Citrus huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. Online publication. DOI: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Graham, J., Ireby, M., Taylor, J. (2011). Phytophthora damage to roots: A potential contributor to decline of HLB affected trees. *Citrus Industry* 92, 20-23.
- Graham, J. H., Johnson, E. G., Gottwald, T. R., Ireby, M. S. (2013). Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 97,1195-1199.
- Halbert, S. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. In T. R. Gottwald & J. H. Graham (Eds.), *Proc. 2nd Int. Workshop* Florida Dept. Agric. Consumer Services, Div. Plant Industry ( pp: 50). Gainesville, FL.

- Henne, D. C., Workneh, F., Rush, C. M. (2012). Spatial patterns and spread of potato zebra chip disease in the Texas Panhandle. *Plant Disease* 96,948-956.
- Hilf, M. E. (2011). Colonization of citrus seed coats by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’: Implications for seed transmission of the bacterium. *Phytopathology* 101,1242-1250.
- Hoffman, M. T., Doud, M. S., Williams, L., Zhang, M. Q., Ding, F., Stover, E., Hall, D., Zhang, S., Jones, L., Gooch, M., Fleites, L., Dixon, W., Gabriel, D., Duan, Y-P. (2013). Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* 13,15-22.
- Jagoueix, S., Bové, J. M., Garnier, M. (1994). The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal Systematic Bacteriology* 44,379-386.
- Liefting, L. W., Perez-Egusquiza, Z. C., Clover, G. R. G., Anderson, J. A. D. (2008). A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92,1474.
- Lin, H., Gudmestad, N. C. (2013). Aspects of pathogen genomics, diversity, epidemiology, vector dynamics, and disease management for a newly emerged disease of potato: Zebra chip. *Phytopathology* 103,524-537.

- List, G. M. (2009). The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Journal Economic Entomology* 32,30-36.
- Lo, X., Lo, D., Tang, W. (1981). Studies on the thermotherapy of citrus yellow shoot disease. *Acta Phytophylacica Sinica* 8,47-51.
- Lo, X. (1983). Studies on the sterilization effect of the intermittent hot water treatment on citrus budwood and nursling infected with citrus yellow shoot. *Journal Science China Agriculture University* 1,97-102.
- Lopes, S. A., Frare, G. F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N. G., Ayres, A. J., Martin, D. R., Bove, J. M. (2009). Liberibacter associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. *Plant Disease* 93,257-262.
- McClellan, A. P. D., Oberholzer, P. C. J. (1965). Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *South African Journal Agricultural Science* 8,297-298.
- Madden, L. V., Hughes, G. (1995). Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. *Annual Review Phytopathology* 33,529-564.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Upton, J. E. (2007a). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal Economic Entomology* 100,656-663.

- Munyanza, J. E., Goolsby, J. A., Crosslin, J. M., Upton, J. E. (2007b). Further evidence that zebra chip potato disease in the Lower Rio Grande Valley of Texas is associated with *Bactericera cockerelli*. *Subtropical Plant Science Journal* 59,30-37.
- Munyanza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzon Tiznado, J. A., Cardenas Valenzuela, O. G. (2009). First report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in pepper plants in México. *Plant Disease* 93,10-76.
- Munyanza, J. E., Sengoda, V. G., Buchman, J. L., Fisher, T. W. (2012). Effects of temperature on ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease* 96,18-23.
- Munyanza, J. E., Segonda, V. G. (2014). First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on pepper in Honduras. *Plant Disease* 98,154.
- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., Tamborindoguy, C. (2011). Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Current Microbiology* 62,1510-1520.
- Nachappa, P., Shapiro, A. A., Tamborindoguy, C. (2012). Effect of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), on tomato. *Phytopathology* 102,41-46.

- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., Tamborindeguy C. (2014). Correlation between ‘‘Candidatus Liberibacter solanacearum’’ infection levels and fecundity in its psyllid vector. *Journal Invertebrate Pathology* 115,55-61.
- Nelson, W. R., Munyaneza, J. E., McCue, K. F., Bové, J. M. (2013). The Pangaeian origin of ‘Candidatus Liberibacter’ species. *Journal Plant Pathology* 95,455-461.
- Parker, J. K., Wisotsky, S. R., Johnson, E. G., Hijaz, F. M., Killiny, N., Hilf, M. E., De La Fuente, L. (2014). Viability of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ prolonged by addition of citrus juice to culture medium. *Phytopathology* 104,15-26.
- Raddadi, N., Gonella, E., Camerota, C., Pizzinat, A., Tedeschi, R., Crotti, E., Mandrioli, M., Bianco, P. A., Daffonchio, D., Alma, A. (2010). ‘Candidatus Liberibacter europaeus’ sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environmental Microbiology* 13,414-426.
- 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* 102,1079-1085.
- 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* 103,419-426.

- 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* 98,24-31.
- Sechler, A., Schuenzel, E. L., Cooke, P., Donnua, S., Thaveechai, N., Postnikova, E., Stone, A. L., Schneider, W. L., Damsteegt, V. D., Schaad, N. W. (2009). Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with huanglong-bing. *Phytopathology* 99,480-486.
- Secor, G. A., Rivera-Varas, V. V. (2004). Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Revista Latinoamericana de la Papa* 1,1-8.
- Schneider, H. (1967). Phloem necrosis associated with the greening disease of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Phytopathology* 57,829.
- Thao, M. L., Moran, N. A., Abbot, P., Brennan, E. B., Burckhardt, D. H., Baumann, P. (2000). Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Applied Environmental Microbiology* 66,2898-2905.
- Wang, N., Li, W., Irey, M., Albrigo, G., Bo, K., Kim, J. S. (2009). Citrus huanglongbing. *Tree and Forestry Science Biotechnology* 3,66-72.
- Yamamoto, P. T., Felipe, M. R., Garbim, L. F., Coelho, J. H. C., Ximenes, N. L., Martins, E. C., Leite, A. P. R., Sousa, M. C., Abrahão, D. P., Braz, J. D. (2006). *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): Vector of the bacterium *Candidatus*

- Liberibacter americanus. In Proc. Int. Huanglongbing-Greening Workshop ( p.p. 96).  
University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- 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* 104,126-133.
- Wulff, N.A., Zhang, S., Setubal, J. C., Almeida, N. F., Martins, E. C., Harakawa, R., Kumar, D., Rangel, L. T., Foissac, X., Bové, J. M., Gabriel, D. W. (2014). The complete genome sequence of “*Candidatus Liberibacter americanus*” associated with citrus huanglongbing. *Molecular Plant Microbe-Interaction* 27,163-176.
- Zhang, S., Flores-Cruz, Z., Zhou, L., Kang, B. H., Fleites, L. A., Gooch, M. D., Wulff, N. A., Davis, M. J., Duan, Y. P., Gabriel, D. W. (2011a). *Ca. Liberibacter asiaticus*’ carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 24,458-468.
- Zhang, M. Q., Powell, C. A., Zhou, L. J., He, Z. L., Stover, E., Duan, Y. P. (2011b). Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in plant. *Phytopathology* 101,1097-1103.

## CAPÍTULO II

### TRANSLOCACIÓN DE *Candidatus Liberibacter solanacearum* EN PLANTAS DE CHILE

#### RESUMEN

La bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*CaLs*) afecta a chile (*Capsicum annuum*), coloniza los tubos cribosos del floema obstruyendo el flujo de nutrimentos en la planta y es transmitida por el insecto vector *Bactericera cockerelli*. Para lograr el manejo del patosistema chile-*Ca. Liberibacter solanacearum*-*Bactericera cockerelli*, es necesario entender el desarrollo de la epidemia, formas de transmisión de la bacteria y la dinámica del movimiento de ésta dentro del vector y del hospedante, entre otros. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Conocer la translocación de *CaLs* en plantas de chile en cámaras de ambiente controlado y 2) si la bacteria se transmite transováricamente en el insecto vector. Para el primer objetivo se estableció un ensayo en el que se probaron dos periodos de adquisición de la bacteria (4 y 24hrs) y dos temperaturas (17 y 21°C). Para el estudio de transmisión transovárica, en condiciones de invernadero se establecieron colonias en plantas sanas de chile y papa; con insectos colectados de plantas de chile con síntomas de *Ca. Liberibacter solanacearum* en Yurécuaro, Michoacán y de papa con síntomas de *Ca. Liberibacter solanacearum* en Toluca, Estado de México. De cada una de las colonias se tomaron entre 50-100 insectos de cada generación (cuatro en total) para detectar en cada

individuo mediante PCR la presencia de la bacteria y determinar la proporción de insectos portadores de *CaLs*. Los resultados indicaron que a los 21 días posteriores de la inoculación, *CaLs* se detectó en todos los estratos de la planta cuando *B. cockerelli* adquirió la bacteria durante un periodo de 24 hr y cuando las plantas se mantuvieron a 21°C. No se detectó la presencia de *CaLs* en los individuos de las cuatro generaciones de *B. cockerelli* lo que indica que en las condiciones en las que se realizó la presente investigación no hubo transmisión transovárica.

**Palabras clave:** *Candidatus Liberibacter solanacearum*, *Bactericera cockerelli*, translocación, transmisión transovárica.

## INTRODUCCIÓN

*Candidatus Liberibacter* afecta a distintos cultivos dentro de las familias Rutáceas, Solanáceas y Apiáceas (Liefting *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2014). La bacteria se aloja en los tubos cribosos del floema y presenta formas redondas cuando termina su ciclo celular. En Rutáceas se ha demostrado que *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus* son transmitidas por *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor *et al.*, 1967; Yamamoto *et al.*, 2006), mientras que *Ca. L. africanus* es transmitida por *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan y Oberholzer, 1965); en Solanáceas y Apiáceas se encuentra *Ca. Liberibacter solanacearum*, que es transmitida por *Bactericera cockerelli* y *Trioza apicalis*; en ambos vectores, la bacteria se aloja en la hemolinfa y en las glándulas salivales de los insectos (Ammar *et al.*, 2011).

*CaLs* afecta a chile (*Capsicum annuum*) e induce síntomas como: clorosis, disminución del tamaño del ápice de la hoja, deformación de las hojas, reducción de tamaño de las flores, además de variegado, acortamiento de entrenudos y disminución del rendimiento (Camacho-Tapia *et al.*, 2011). *CaLs* se distribuye en el floema de la planta infectada en los elementos de tubo criboso y obstruye el flujo de nutrimentos en la planta; en presencia de la bacteria, hay acumulación de almidón y tejido secundario del floema que no es funcional, además de acumulación de compuestos fenólicos, peroxidasas, oxidasas, polifenoles, quitinasas, liberación de aminoácidos y azúcares (sacarosa, glucosa y fructuosa) (Rashed *et al.*, 2013).

Estudios de translocación de *CaLs* indican que cuando se distribuye en toda la planta, no importa de qué parte se alimente *B. cockerelli* siempre adquirirá la bacteria; sin embargo, cuando la bacteria no se distribuye en toda la planta, se presentan altas densidades en tallo y peciolo (Rashed *et al.*, 2012). Se ha determinado que el movimiento de la bacteria en el floema es a partir del área de infección hacia la raíz, y después hacia la parte superior de la planta, comportamiento similar al que sucede con los virus del floema (Levy *et al.*, 2011). Entre mayor sea el número de insectos vectores presentes en la planta, los síntomas aparecen más rápidamente por diferencia de cantidad de inóculo inicial (Rashed *et al.*, 2012). En el patosistema de papa, Rashed *et al.* (2014) observaron que no hay una etapa fisiológica de la planta donde sea más susceptible a la infección por *CaLs*; que la incidencia está relacionada al movimiento del insecto vector, y que la severidad de los síntomas es independiente del título de la bacteria en la planta. Hansen *et al.* (2008), indicaron que en los psílidos de papa

existe una transmisión de la bacteria del tipo transovárica; en el caso de patosistema *B. cockerelli*-chile no se tienen estudios sobre ese tipo de transmisión. Se reporta que existe una correlación negativa de sobrevivencia de ninfas infectadas con *CaLs*, por tanto los adultos tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales de *B. cockerelli* (Nachappa *et al.*, 2014). Respecto a la eficiencia de las poblaciones de *B. cockerelli* portadoras de *CaLs*, se menciona que el porcentaje es variable y va desde 0.4-13.3% (Hamm *et al.*, 2011)

Para lograr el manejo del patosistema chile-*Ca. Liberibacter solanacearum*-*Bactericera cockerelli*, es de fundamental importancia entender el desarrollo de la epidemia, para lo cual es necesario contar con información básica como lo es la transmisión por semilla e insecto y la dinámica del movimiento de la bacteria dentro del hospedante. Por lo anterior los objetivos de este trabajo fueron conocer cómo se transloca *CaLs* en plantas de Chile y, si en *Bactericera cockerelli* la transmisión de *CaLs* es transovárica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Translocación de *Ca. Liberibacter solanacearum* en plantas de Chile

**Colonias de *Bactericera cockerelli*.** Plantas de jitomate infestadas con el psílido *B. cockerelli* se mantuvieron en invernadero tres meses. Las plantas se establecieron en tezontle fertilizadas con solución Steiner y se mantuvieron en una caja de madera cubierta con malla

anti áfidos. Mediante PCR se confirmó que tanto el insecto como planta estuvieran libres de *CaLs*. Después, la colonia de psílidos se pasó a plantas de chile jalapeño variedad Centella.

**Fuente de inóculo de *Ca. Liberibacter solanacearum*.** En Yurécuaro, Michoacán se colectaron plantas de chile jalapeño de la variedad “Rivera” con síntomas de *CaLs* y se mantuvieron en invernadero.

**Transmisión de *Ca. Liberibacter solanacearum*.** Se prepararon trampas pequeñas con cilindros de plástico de 2cm de largo x 1.5 cm de diámetro, las cuales se cubrieron con tela de organza solamente en la parte distal, mientras que la parte proximal a la hoja no se cubrió. Los cilindros se sujetaron a la hoja de la planta con un pasador para cabello.

Los insectos se colectaron con un succionador a partir de las colonias establecidas en invernadero y se mantuvieron a una temperatura de aproximadamente 4°C. Para la adquisición de la bacteria por el insecto, se colocaron 10 individuos por trampa y se depositaron en plantas confirmadas mediante PCR con *CaLs* provenientes de Yurécuaro. Posteriormente cada trampa se fijó sobre la primera hoja madura del ápice de plantas sanas. Se probaron dos periodos de adquisición: 4hrs (A4h) y 24hrs (A24h), dos temperaturas: 17°C (T17) y 21°C (T21) y un testigo; por consiguiente se tuvieron cinco tratamientos: T17-A4h, T17-A24h, T21-A4h, T21-A24h y testigo: Este último consistió en colocar insectos libres de la bacteria en plantas a la temperatura de 21°C durante 7 días. Se hicieron seis repeticiones, cada planta fue una repetición (Cuadro 1). En cada tratamiento los insectos permanecieron alimentándose durante 7 días y se retiraron al término de este lapso. En cada repetición de

los tratamientos se utilizaron los mismos insectos; es decir, el grupo de insectos utilizados en la primera planta de cada tratamiento, fue retirado junto con la trampa y se depositó en la segunda planta y así sucesivamente. El experimento se repitió una vez y en cada ocasión se tuvieron tres repeticiones Cada tratamiento se evaluó durante seis semanas y se consideró como unidad muestral una planta (Figura 2). La variable respuesta fue detección de la bacteria en la planta según el área muestreada: del sitio de transmisión, del peciolo de la hoja, de las hojas del tercio superior y medio de la planta, tallo y raíz. La comparación del efecto de los tratamientos se hizo mediante la regresión logística con el paquete estadístico SAS v.9<sup>®</sup>.

Cuadro 1.- Tratamientos establecidos para las pruebas de transmisión y movimiento de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de chile jalapeño, con un tiempo de transmisión de 7 días.

Tratamiento	Plantas (repeticiones)	Insectos por Planta	T °C	Tiempo adquisición
T17-A4h	6	10	17	4 h
T17-A24h	6	10	17	24 h
T21-A4h	6	10	21	4 h
T21-24h	6	10	21	24h

Testigo <sup>z</sup>	6	10	21	-----
----------------------	---	----	----	-------

---

<sup>z</sup> Consistió en plantas expuestas a *Bactericera cockerelli* libre de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

**Detección de Liberibacter en las plantas inoculadas.** Semanalmente se extrajo DNA de tejido colectado de los diferentes estratos de la planta de cada uno de los tratamientos. Aproximadamente 300mg de tejido de cada estrato se maceró por separado en un mortero estéril con nitrógeno líquido, el macerado se homogenizó con buffer de extracción (100mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl, 10mM β-mercaptoetanol) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se añadió 35 µL de SDS 20% y 50 µL CTAB, después se incubó en “Baño María” a 65°C por 5 min. Después, se agregaron 130 µL de acetato de potasio a 5M y se mantuvo en hielo por 5 min; se añadieron 700µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se mezcló y se centrifugó a 15 000 x g por 10 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5mL, se agregaron 640 µL de alcohol isopropílico y 60µL de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y se puso a precipitar el DNA a -20°C por 10 min. Después se centrifugó 15 000 x g por 10 min, y se desechó el sobrenadante; la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% a 15 000 x g por 5 min. Se dejó secar durante 20 min en papel secante y se resuspendió con 200 µL de agua libre de DNAsa y RNAsa (TEKNOVA ®).

Para la PCR punto final se utilizaron los primers Lso16/23 F (5' AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG3') y Lso 16/23 R(5' GGTACCTCCCATATCGC3'), que

amplifican un producto de 383pb entre la región 16 S y 23 S de los genes rRNA (Ravindran *et al.*, 2011). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 µL, buffer de PCR 1x, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.8 µM de cada primer, 1U DNA polimerasa Bio TecMol® y 100ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Techne 512® (USA), con una desnaturalización inicial de 94°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1 min; y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron verificados por electroforesis en agarosa al 0.7% con buffer de corrida TBE 0.5 X con el uso de 5µL del producto de PCR, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó en un transiluminador Gel-Doc mod 2000 (BIORAD).

#### **Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en individuos de cuatro generaciones de *Bactericera cockerelli***

##### **Colecta y establecimiento de la colonia de *Bactericera cockerelli*.**

Se establecieron dos colonias de psílidos de *Bactericera cockerelli*, una a partir de psílidos colectados de plantas con síntomas de *CaLs* en Yurécuaro, Michoacán en el ciclo de cultivo de chile de 2013, y otra de psílidos colectados de plantas sintomáticas de zebra chip de papa provenientes de Toluca, Estado de México. Estos insectos inicialmente se mantuvieron en las plantas hospedantes de origen (chile y papa). Posteriormente ambas colonias permanecieron en las plantas de chile jalapeño de la variedad Centella bajo condiciones de invernadero dentro de jaulas de madera de 1m<sup>3</sup> y cubiertas con tela de organza. Ese sistema se ha utilizado para incrementar la población de insectos, y se ha

implementado de forma convencional en el estudio del patosistema de *Ca*Ls sin mostrar influencia en los hábitos alimenticios de *B. cockerelli*.

Para detectar la proporción de insectos portadores de la bacteria, de cada colonia de *B. cockerelli* se tomó una muestra de 50 insectos de las primeras dos generaciones de psíidos, y conforme se incrementó la densidad de insectos se muestrearon 100 de cada generación. Los insectos se colectaron con un succionador de insectos, y se mantuvieron en alcohol 75% hasta su análisis para determinar si eran portadores de la bacteria.

#### **Detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*.**

Para la extracción de DNA de los insectos, éstos se depositaron en papel secante hasta la evaporación del etanol. Cada insecto se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y se maceró con nitrógeno líquido en un homogeneizador automatizado (Virtis®). Después, se le añadieron 200µL de buffer de extracción (Tris 0.1 M pH 8, EDTA 10mM, 2% SDS, 0.2mg/mL de proteinasa K), y se mantuvo en “Baño María” a 38°C durante 10 min. Después se agregaron 30 µL de CTAB 10% y 70 µL de NaCl 5M y se mantuvo a 65°C durante 10 min, se adicionaron 100µL de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo durante 5min; se añadieron 400µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13 000 x g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5mL y se le agregó 300 µL de isopropanol frío y 60µL de acetato de sodio 3M pH 5.8, y se mezcló tres veces por inversión. La muestra se incubó -80°C por 5 min. Se centrifugó a 13 000 x g durante 10 min, se desechó el sobrenadante y con 500 µL de etanol al 70% se lavó a 13 000

x g durante 5 min. Se desechó el etanol y se puso a secar la pastilla durante 20 min, posteriormente se re suspendió en 40µL de agua destilada libre de DNAsa.

La detección por PCR se realizó con los primers Clipo F (5'TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT3') y OI2c R (5' GCCTCGCGACTTCGCAAC CCAT3'), que amplifican un fragmento de 1060 pb (Liefiting *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 µL con las mismas condiciones anteriormente descritas.

## RESULTADOS

**Detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* en plantas de Chile.** Al visualizar los productos de PCR en el gel de agarosa, se observó una deficiencia en la amplificación; por lo que se procedió a realizar una reamplificación y en los productos obtenidos se tuvo una mayor intensidad de la banda (Figura 1).

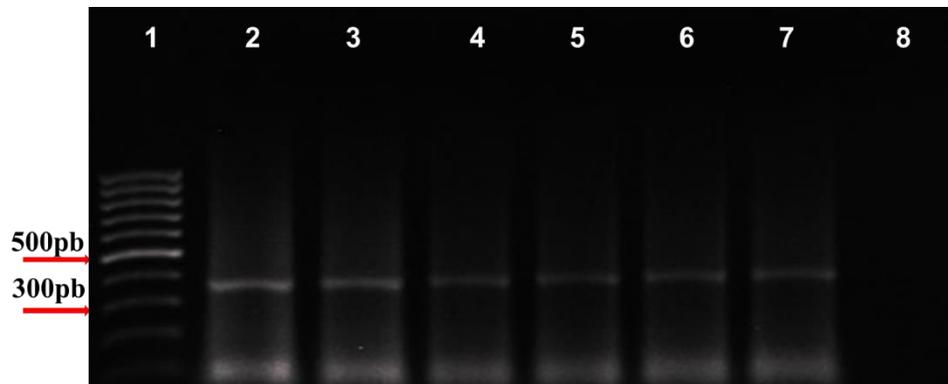


Figura 1.- Productos de reamplificación por PCR obtenidos con los primers Lso 16/23s.1.- marcador de 100pb, 2) punto de transmisión, 3) peciolo, 4) hojas del primer tercio superior de la planta, 5) hojas del segundo tercio de la planta, 6) tallo, 7) raíz, 8) negativo agua libre de DNA asa y RNA asa.

### **Translocación de Liberibacter**

No obstante que la translocación de Liberibacter presentó tres tipos de comportamiento (Figura 2), el efecto de la temperatura (T17-A4h y T21-A4h) no es significativo en la distribución de la bacteria en las plantas. Para el caso del comportamiento 1 (Figura2, A) el valor de  $P=0.0913$ , para el 2 (Figura2, B),  $P=0.8101$  y para el 3 (Figura 2, C),  $P=1.0$ .

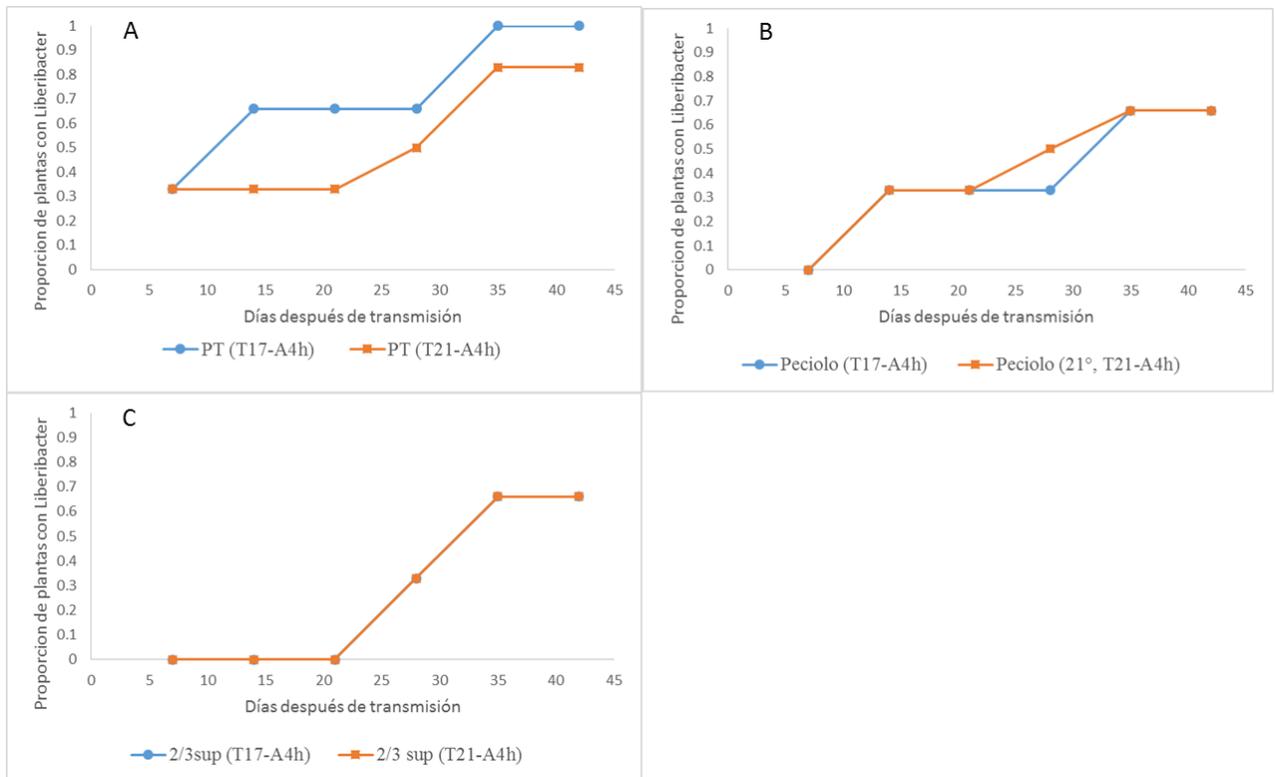


Figura 2.- Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los distintos estratos de acuerdo al progreso del tiempo y su comportamiento. A) Punto de transmisión (PT) T17-A4h/ PT T21-A4h; B) peciolo T17-A4h/peciolo T21-A4h; C) 2/3 superior T17-A4h/ 2/3 superior T21-A4h.

En todos los estratos cuando el tiempo de adquisición fue de 24h, el efecto de la temperatura (T17-A24h y T21-A24h) no es significativo en la proporción de plantas con *Liberibacter* (Cuadro 2). Cabe mencionar que para A24h la translocación es más rápida que en el caso A4h, observándose una proporción del 100% de las plantas con *Liberibacter* a partir de los 12 y 21 días (Figura 3).

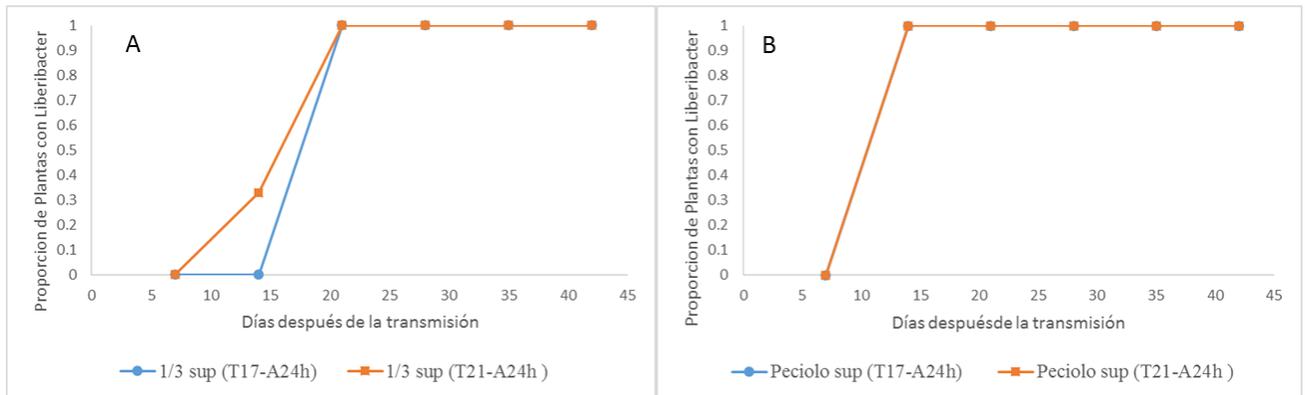


Figura 3.- Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los distintos estratos de acuerdo al progreso del tiempo y su comportamiento en las diferentes temperaturas. A) 1/3 superior T17-A24h y 1/3 superior T21-A24h; B) peciolo T17-A24h y peciolo T21-A24h.

El efecto del tiempo de adquisición T17-A4h vs T17-A24h en la proporción de plantas con *Liberibacter* fue significativo al 0.05 en todos los estratos (Cuadro 2), siendo el tiempo de adquisición de 24hrs el que presenta un mayor número de plantas positivas al *Liberibacter*. Similarmente al comparar el efecto del tiempo de adquisición cuando la temperatura es de 21°C (T21-A4h vs T21-A24h), éstos fueron significativos al 0.05 (Cuadro 2). Cabe mencionar que en ambos casos para el estrato del peciolo la comparación requirió del uso del paquete estadístico R®. Lo anterior debido a que los datos presentaron un problema para su análisis conocido como “casi separación”, lo cual presenta un arreglo en los datos observados de tal forma que los paquetes tradicionales como el SAS no pueden determinar si existen o no diferencia significativas. El nuevo paquete estadístico R incluye un análisis de datos bajo estas circunstancias (logistf). La importancia a nivel biológico es que con esta herramienta

podemos concluir con un nivel de confianza si el efecto del tiempo de adquisición en la translocación es significativo.

Cuadro 2.- Efecto del periodo de adquisición (4 y 24hrs) y las temperaturas (17 y 21°C) en la proporción de plantas de chile con *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Estrato	Valores de P			
	17vs21 4h <sup>†</sup>	17vs21 24h <sup>¶</sup>	17°C 4h vs24 h <sup>§</sup>	21°C 4h vs24 h <sup>Ⓟ</sup>
PT	0.0913ns	1.0000ns	0.0003* <sup>α</sup>	>0.0001* <sup>α</sup>
Pecíolo	0.8101ns	1.0000ns	0.0003*	0.0005*
1/3 sup	0.8005ns	0.6092ns	0.0028*	0.0013*
2/3 planta	1.0000ns	0.6092ns	0.0013*	0.0003*
Tallo	0.8077ns	0.8005ns	0.0108*	0.0106*
Raíz	0.4569ns	1.0000ns	0.0056*	0.0353*

<sup>†</sup>T17-A4h vs T21-A4h; <sup>¶</sup> T17-A24 vs T21-A24h; <sup>§</sup> T17-A4h vs T17-A24h; <sup>Ⓟ</sup> T21-A4h vs T21-A24h; ns, valores de P no significativos; \* Valores de P que indican diferencias significativas con  $\alpha=0.05$ ; <sup>α</sup>Datos que presentaron casi separación, que fueron analizados mediante la función logistf del software R ®; PT, punto de transmisión.

De acuerdo con los resultados de PCR obtenidos, en las primeras semanas se detectó la presencia de la bacteria en todas las plantas en el sitio de alimentación del insecto (punto de transmisión). Estos resultados sugieren que el tiempo de adquisición es factor importante para que el insecto adquiriera la bacteria y podría afectar el inóculo inicial en la translocación de ésta, afectando positivamente el desarrollo de la epidemia (Cuadro 3-6).

Cuadro 3.- Translocación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de Chile durante seis semanas bajo el tratamiento con temperatura 17°C y tiempo de adquisición de 4hrs.

Días	Síntomas	Proporción de plantas con Liberibacter (%)					
		PT	Pecíolo	1/3 sup	2/3 sup	Tallo	Raíz
7	-	33.3	0	0	0	0	0
14	-	66.6	33.3	0	0	0	0
21	+	66.6	33.3	16.6	0	0	0
28	+	66.6	33.3	33.3	33.3	66.6	0
35	+	100	66.6	66.6	66.6	0.83	100
42	+	100	66.6	66.6	66.6	66.6	100

-, muestras negativas; +, muestras positivas; PT, punto de transmisión.

Los resultados obtenidos muestran que la translocación de *Liberibacter* fue de forma basipétala; es decir, que va del punto de transmisión a la raíz. La translocación de *Liberibacter* a toda la planta ocurrió en la quinta y cuarta semana con los tratamientos T17-A4h y T21-A4h respectivamente (Cuadro 3 y 4), mientras que la translocación se presentó en la tercera semana con los tratamientos T17-A24h y T21-A24h. Cabe mencionar que a los 35 días se detectó la bacteria en la raíz en el 100% de las plantas, mientras que en los otros estratos (peciolo, 1/3 sup, 2/3 sup y tallo) solo se detectó *Liberibacter* en el 66% de las planta (Cuadro 3). Para el caso del tratamiento T21-A4h, la translocación fue similar al tratamiento T21-A4h (Cuadro 3).

Cuadro 4.- Translocación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de chile durante seis semanas bajo el tratamiento con temperatura 21°C y tiempo de adquisición de 4hrs.

Días	Síntomas	Proporción de plantas con <i>Liberibacter</i> (%)					
		PT	Peciolo	1/3 sup	2/3 sup	Tallo	Raíz
7	-	33.3	0	0	0	0	0
14	-	33.3	33.3	0	0	0	0
21	+	33.3	33.3	33.3	0	0	0
28	+	50.0	50.0	33.3	33.3	66.6	66.6

35	+	83.3	66.6	66.6	66.6	50.0	100.0
42	+	83.3	66.6	66.6	66.6	83.3	100.0

---

-, muestras negativas; +, muestras positivas; PT, punto de transmisión.

Para el caso del efecto de los tratamientos T17-A24h y T21-A24h en la proporción de plantas con la bacteria, se encontró que no existen diferencias significativas. En las plantas con los tratamientos mencionados, la translocación de la bacteria se observó en toda la planta y en el 100% de las mismas a los 21 días (Cuadro 5). Cabe mencionar que en el caso del tratamiento T21-A24h se observó presencia de la bacteria desde los 14 días en los estratos desde el sitio de transmisión hasta el tallo (Cuadro 5). Liberibacter no se detectó en las plantas que fueron expuestas a los insectos libres de la bacteria y no presentó algún tipo de síntomas.

Cuadro 5.- Translocación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de Chile durante seis semanas bajo el tratamiento con temperatura 21°C y tiempo de adquisición de 24hrs en contraste con temperatura 17°C y 24hrs de tiempo de adquisición.

Días	Síntomas	Proporción de plantas con Liberibacter (%)					
		PT	Pecíolo	1/3 sup	2/3 sup	Tallo	Raíz
7	-	100	0	0	0	0	0
14	-	100	100	100 <b>(33.3)</b>	100 <b>(33.3)</b>	100 <b>(33.3)</b>	0
21	+	100	100	100	100	100	100
28	+	100	100	100	100	100	100
35	+	100	100	100	100	100	100
42	+	100	100	100	100	100	100

-, muestras negativas; +, muestras positivas; valores en negritas indican proporción de Liberibacter en T17-A24h

#### **Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en las cuatro generaciones de *B. cockerelli*.**

En la colonia de psíidos proveniente de Yurécuaro, la bacteria se detectó hasta la segunda generación, mientras que en la colonia proveniente de Toluca, la bacteria se detectó

hasta la tercera generación (Cuadro 6). En la evaluación inicial, la colonia proveniente de Yurécuaro tuvo mayor porcentaje de psílicos portadores en comparación con la colonia proveniente de Toluca.

Cuadro 6.- Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en las generaciones de *B. cockerelli* de las colonias provenientes de Yurécuaro y Toluca.

Generaciones <i>B. cockerelli</i>	Yurécuaro		Toluca	
	No.de psílicos	% Liberibacter	No. de psílicos	% Liberibacter
1	50	8	50	4
2	50	2	50	2
3	100	0	100	1
4			100	0

## DISCUSIÓN

En el estudio de translocación, la detección por PCR de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas presentó en algunos casos una intensidad baja, que se reflejó con una fluorescencia mínima de la banda del amplicón; lo anterior posiblemente debido a que *B. cockerelli* transmitió la bacteria en una concentración baja. En este contexto, Rashed *et al.* (2014) evidenciaron que la concentración inicial de la bacteria está sujeta a la cantidad de inóculo adquirido por el insecto vector, y por el porcentaje de insectos portadores de la bacteria.

Las temperaturas de 17°C y 21°C no afectaron significativamente la transmisión ni la translocación de la bacteria, lo cual indica que ésta se desarrolla en un rango amplio de temperaturas; lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Munyaneza *et al.* (2012) quienes observaron que el desarrollo de *Liberibacter* en papa disminuye en temperaturas debajo de 17°C y arriba de 32°C. En nuestros resultados, aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, algunas gráficas mostraron diferencias visibles, esto se pudo deber a las variaciones biológicas naturales del experimento y no a las temperaturas evaluadas. El tiempo de adquisición de la bacteria por el psílido tuvo un efecto significativo en la translocación de esta, siendo el de 24hr el mejor. Ese comportamiento se podría deber a que cuando se exponen los grupos de insectos para adquirir la bacteria en 4hrs, muchos de ellos no se alimentan de la planta, y algunos buscan salir; por lo tanto el porcentaje de insectos infectivos es bajo y la cantidad de inóculo es menor. El tratamiento T21-A24h presentó una translocación de la bacteria desde el punto de transmisión hasta el tallo a los

14 días, y se detectó en toda la planta a los 21 días; lo anterior indica que el tiempo de adquisición de la bacteria es un factor muy importante para la velocidad de la translocación de la bacteria en la planta. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los de Levy *et al.* (2011), quienes encontraron que en tomate la translocación se presenta a los 21 días y los síntomas se observan a los 56 días, mientras que en papa reportan que los síntomas se observaron a los 21 y 28 días después de la transmisión por *B. cockerelli*; estas variaciones pueden deberse a las respuestas de defensa de las plantas, principalmente a la acumulación de almidones y compuestos fenólicos en el floema, los cuales influyen en la translocación de la bacteria. La información obtenida sobre translocación de la bacteria en Chile, nos indicó que ésta no se ve influenciada por las temperaturas evaluadas; por lo que probablemente la epidemia de variegado de Chile en campo no mostraría variación en su desarrollo cuando está en un rango de temperatura de 17-21°C.

Los resultados que obtuvimos indican que en ocasiones la translocación de la bacteria se presenta antes en la raíz que en otros estratos. Lo anterior puede ser explicado por la dirección del flujo de floema; esto coincide con los estudios de Graham *et al.* (2013), los cuales indican que *Candidatus Liberibacter asiaticus* en cítricos llega a la raíz incluso antes de presentarse síntomas en toda la planta. Los virus limitados al floema presentan un comportamiento similar; es decir, se translocan de acuerdo al flujo de nutrientes en las plantas, al igual que los fitoplasmas (Leisner *et al.*, 1992; Mas y Pallas, 1996; Gonzalez-Bernal *et al.*, 2008).

Al evaluar la transmisión transovárica de *Liberibacter* en *B. cockerelli*, se observó que a través de las generaciones la proporción de insectos con la bacteria disminuyó, esto podría sugerir que al menos en este experimento no hubo transmisión transovárica. Levy *et al.* (2014) reportaron que hay una correlación negativa de sobrevivencia de ninfas infectivas con *Liberibacter* que influye en los ciclos de reinfección, y a su vez esto podría reducir el porcentaje de psílicos portadores de la bacteria.

## CONCLUSIONES

La temperatura no tuvo efecto significativo en la translocación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en las plantas de Chile.

El tiempo de adquisición de *Ca. Liberibacter solanacearum* por el insecto vector *Bactericera cockerelli* influye en la translocación de la bacteria, siendo 24hrs el mejor tiempo para asegurar que el psílido adquiriera *Liberibacter*.

*Ca. Liberibacter solanacearum* se translocó en raíz antes de moverse en toda la planta. La translocación de *Ca. Liberibacter solanacearum* fue a los 21 días en los tratamientos que tuvieron un tiempo de adquisición de 24hrs, al igual que la presencia de los síntomas en plantas de Chile, mientras que con un tiempo de adquisición de 4hrs la translocación ocurrió después de los 28 días.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, E., V. G. Segonda, B. Bextine, K. F. McCue, J. E. Munyaneza. 2013. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on tobacco in Honduras. *Plant Dis.* 97:1376.
- Ammar, E.-D., R. G. Shatters Jr., D. G. Hall. 2011. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence *in situ* hybridization. *J. Phytopathol.* 159:726–734
- Camacho-Tapia, M., R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, M. G. Hernández-Deheza, J. A. Carrillo-Salazar, A. Rebollar-Alviter, D. L. Ochoa-Martínez. 2011. Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *J. Plant Pathol.* 93:331-335.
- Capoor, S. P., D. G. Rao, S. M. Visnawanath. 1967. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian J. Agric. Sci.* 37:572-576.
- Gosalvez-Bernal, B., A. Genoves, J. A. Navarro, V. Pallas, M. A. Sanches-Pina. 2008. Distribution and pathway for phloem-dependent movement of Melon necrotic spot virus in melon plants. *Mol. Plant Pathol.* 9:447-461.
- Graham, J. H., E. G. Johnson, T. R. Gottwald, M. S. Irey. 2013. Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Dis.* 97:1195-1199.
- Hamm, P. B., S. I. Rondon, J. M. Crosslin, J. E. Munyaneza. 2011. A new threat in the Columbia Basin of Oregon and Wanshington: zebra chip, pp.1-5- *In* F. Workneh, A.

Rashed C. M. Rush (Eds.). Proceedings of the 11<sup>th</sup> Annual Zebra Chip Reporting Session, 6-9 November 2011, San Antonio, TX.

Hansen, A. K., J. T. Trumble, R. Stouthamer, T. D. Paine. 2008. A new Huanglongbing (HLB) species, '*Candidatus Liberibacter psyllaurosus*', found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Appl. Environ. Microbiol. 74:5862-5865.

Liefting, L. W., Z. C. Perez-Egusquiza, G. R. G. Clover, J. A. D. Anderson. 2008. A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. Plant Dis. 92:1474.

Leisner, R. M., R. Turgeon, S. H. Howell. 1992. Long distance movement of cauliflower mosaic virus in infected turnip plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:41-47.

Levy, J., A. Ravindran, D. Gross, C. Tamborindéguy, E. Pierson. 2011. Translocation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the zebra chip pathogen, in potato and tomato. Phytopathology. 101:1285-1291.

Mas, P., V. Pallas. 1996. Long-distance movement of cherry leaf roll virus in infected tobacco plants. J. Gen. Virol. 77:531-540.

McClellan, A. P. D., P. C. J. Oberholzer. 1965. Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. S. Afr. J. Agric. Sci. 8:297-298.

- Munyaneza, J. E., V. G. Sengoda, J. L. Buchman, T. W. Fisher. 2012. Effects of temperature on ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Dis.* 96:18-23.
- Nachappa, P., J. Levy, E. Pierson, C. Tamborindeguy. 2014. Correlation between ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ infection levels and fecundity in its psyllid vector. *J Invertebr Pathol.* 115:55-61.
- Rashed, A., T. D. Nash, L. Paetzold, F. Workneh, C. M. Rush. 2012. Transmission efficiency of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and potato zebra chip disease progress in relation to pathogen titer, vector numbers, and feeding sites. *Phytopathology* 102:1079-1085.
- Rashed, A., C. M. Wallis, L. Paetzold, F. Workneh, C. M. Rush. 2013. Zebra chip disease and potato biochemistry: Tuber physiological changes in response to ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ infection over time. *Phytopathology.* 103:419-426.
- Rashed, A., F. Workneh, L. Paetzold, J. Gray, C. M. Rush. 2014. Zebra chip disease development in relation to plant age and time of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ infection. *Plant Dis.* 98:24-31.
- Ravindran, A., J. Levy, E. Pierson, D. Gross. 2011. Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’. *Plant Dis.* DOI: 10.1094/PDIS-05-11-0386.

Secor, G. A., V. V. Rivera, J. A. Abad, I. M. Lee, G. R. G.Clover, L. W.Liefting, X. Li, S.

H. De Boer. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with the zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Dis.* 93:574-583.

Yamamoto, P. T., M. R. Felipe, L. F. Garbim, J. H. C. Coelho, N. L. Ximenes, E. C. Martins,

A. P. R. Leite, M. C. Sousa, D. P. Abrahão, J. D. Braz. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. Page 96 In: Proc. Int. Huanglongbing-Greening Workshop. University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

## CAPÍTULO III

### DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VARIEGADO DEL CHILE

#### (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) EN MICHOACÁN

#### RESUMEN

El variegado del chile es ocasionado por *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*CaLs*) que se transmite por *Bactericera cockerelli* y mediante semilla infectada, la cual representa parte del inóculo primario, e influencia la incidencia inicial de la enfermedad y comportamiento de la epidemia en campo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica espacio-temporal de *CaLs* en el cultivo de chile. Se seleccionaron dos parcelas de chile jalapeño de la variedad “Rivera”, una en Vista Hermosa y otra en Yurécuaro, Michoacán. Se evaluó la incidencia de la enfermedad con intervalos de dos semanas en los ciclos de julio-diciembre del 2012 y 2013; se construyeron curvas de progreso de la epidemia y se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con el software Scientific Work Place 5.5 ®. Se elaboraron mapas de superficie con el software Surfer ® v.6. en cada tiempo de muestreo. En los cuadrantes se determinó si los datos tenían ajuste a una distribución binomial y  $\beta$ -binomial mediante el software BBD (Madden y Hedges 1994). Se determinó la formación de los agregados de las plantas con *CaLs*, y se evaluó el índice de proximidad que se calculó con el programa STAUTO (Reynolds y Madden, 1988). El modelo que mejor describió el proceso de desarrollo de la epidemia fue el modelo logístico; al comparar el

ABCPE no se encontraron diferencias significativas entre las parcelas evaluadas. La incidencia de *CaLs* se vio influenciada por la dinámica de *B. cockerelli*. En la mayoría de los casos la epidemia ajustó una distribución  $\beta$ -binomial. El índice de proximidad que describió la formación de los agregados fue Rook.

**Palabras clave:** *Candidatus Liberibacter solanacearum*, epidemia, modelo logístico

## INTRODUCCIÓN

La epidemiología es el estudio de las epidemias en tiempo y espacio; la epidemia es la presencia de una enfermedad en una población de plantas. La enfermedad es el resultado de la interacción exitosa de tres componentes: patógeno, planta y ambiente. La enfermedad conocida como “variegado de chile” es el resultado de esa interacción (*Candidatus Liberibacter solanacearum*, chile, y las condiciones ambientales) (Madden *et al.*, 2007; Camacho-Tapia *et al.*, 2011).

*Candidatus Liberibacter* es una bacteria que se aloja en los tubos cribosos del floema; puede presentar formas redondas cuando termina el ciclo celular. Se transmite por semilla (Camacho-Tapia *et al.*, 2011) e insectos vectores, en los cuales se encuentra en la hemolinfa y las glándulas salivales (Jagoueix *et al.*, 1994; Ammar *et al.*, 2011); esta bacteria afecta a distintos cultivos como Rutáceas, Solanáceas, Apiáceas (Liefting *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2013). En Rutáceas se presentan; *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus* que son transmitidos por *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor *et al.*, 1967; Yamamoto *et al.*, 2006) y *Ca. L.*

africanus, transmitido por *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan y Oberholzer, 1965). En Solanáceas y Apiáceas se encuentra *CaLs*, que es transmitido por *Bactericera cockerelli* y *Trioza apicalis* (Liefting *et al.*, 2008).

En el floema de las plantas de papa infectadas por *Ca. L. solanacearum* se encuentran agregaciones de componentes fenólicos, peroxidasas, oxidasas, polifenoles, quitinasas, liberación de aminoácidos, y azúcares (sacarosa, glucosa, y fructuosa) (Rashed *et al.*, 2013). Esas respuestas aparecen entre la tercera y la quinta semana después de la infección. El incremento de la actividad reductiva de azúcares y aminoácidos contribuye al aumento del tono café al freír las papas, debido a que la formación de acrilamida ocurre con el uso de esos componentes como sustratos a temperatura de freído mediante la reacción de Maillard (Wallis *et al.*, 2014).

En cuanto a su respuesta fisiológica a la temperatura, se ha encontrado que el desarrollo de *CaLs* se ve afectado a 17°C o menos al igual que a temperaturas de 32°C o superior; de tal forma que hay reducción de los síntomas ocasionados por la bacteria. Por lo tanto, se reporta que el desarrollo óptimo de *Ca. L. solanacearum* se encuentra de 27°C a los 32°C. Esa sensibilidad de *Ca. L. solanacearum* al calor puede explicar la incidencia y la severidad de los síntomas de “Zebra Chip” en las áreas productoras. El desarrollo óptimo del psílido *Bactericera cockerelli* es a 27°C, una sola generación se puede completar en 3 a 5 semanas a esta temperatura, mientras que la oviposición, eclosión, desarrollo y sobrevivencia son retardados o reducidos a 32°C, y cesan a 35°C o más (List, 2009), por lo que se sugiere

que hay una coevolución entre las especies de *CaLs* y su insecto vector relacionada con la sensibilidad a la temperatura y humedad relativa (Munyaneza *et al.*, 2012).

Estudios epidemiológicos en el patosistema *Ca. L. asiaticus*-cítricos indican que la epidemia es descrita por una distribución  $\beta$ -binomial. Esta distribución se ajusta a epidemias que tienden hacia la formación de agregados, en este caso originados por la diseminación de la bacteria mediante su insecto vector; Henne *et al.* (2012) indicaron que la incidencia del “zebra chip” ocasionado por *Ca. L. solanacearum*, es descrita por una distribución  $\beta$ -binomial, que indica la presencia de agregaciones de plantas infectadas, a excepción de los casos donde la incidencia es menor a 0.20 % donde la tendencia es aleatoria. Esta característica de agregación en este tipo de epidemias se origina por los diferentes ciclos re-infectivos y dispersión por parte del insecto vector (Gottwald *et al.*, 1989; Madden y Hedges 1995; Gottwald *et al.*, 2007; Henne *et al.*, 2012). Nachappa *et al.* (2014) demostraron que las poblaciones de insectos portadores de *CaLs* tienden a disminuir por la cantidad de bacterias ubicadas en el aparato digestivo, que compiten con los simbiontes que tiene *B. cockerelli* como el caso de *Wolbachia sp.* ya que se afecta el incremento de su población al disminuir los niveles de fecundidad y supervivencia de psílidos con *CaLs*. Así mismo, indican que existe una correlación negativa de supervivencia de ninfas infectadas con *CaLs* que influye en los ciclos re-infectivos; en los cuales los adultos tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales de *B. cockerelli*.

Por otro lado, el conocimiento de la epidemiología de una enfermedad en el patosistema en campo proporciona un mejor entendimiento, ya sea en su tipo de agregación,

el progreso en el tiempo-espacio, la duración de ésta, la incidencia y su severidad, que conduce al diseño de un manejo adecuado de la enfermedad (Madden *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue conocer la dinámica espacio-temporal del variegado del chile, causado por *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación de las parcelas y variables a evaluar.** En los meses de julio-diciembre de 2012 y 2013, se seleccionaron áreas con cultivo de chile jalapeño de la variedad “Rivera”, con la presencia de *CaLs* en dos parcelas: una en Vista Hermosa y otra en Yurécuaro, Michoacán, . En Vista Hermosa, el cultivo se estableció en la tercera semana de julio mientras que en Yurécuaro en la tercera semana de agosto. En las parcelas se establecieron 3 cuadrantes que consistieron de 20 hileras en las que se contó 20 plantas a una separación de 40cm de forma unidireccional, lo que dio un total de 400 plantas por cuadrante

**Poblaciones de *Bactericera cockerelli*.** Para determinar las fluctuaciones poblacionales de *B. cockerelli*, se realizó un muestreo con una charola cubierta de aceite vegetal, sobre la cual se golpearon 10 plantas de manera consecutiva en uno de los cuadrantes. El muestreo del insecto se realizó en los mismos tiempos de evaluación de la incidencia de la enfermedad.

**Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas sintomáticas.** Para comprobar si los síntomas evaluados en las parcelas experimentales se debían a *CaLs*,

se tomaron muestras de hojas de las plantas con síntomas de variegado, albinismo, escaldadura, nervadura clorótica y deformación de lámina y se extrajo el DNA. Se maceró aproximadamente 300mg de tejido en un mortero estéril con nitrógeno líquido y se homogenizó con buffer de extracción (100mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl, 10mM  $\beta$ -mercaptoetanol) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se añadió 35  $\mu$ L de SDS 20% y 50  $\mu$ L CTAB, y se incubó en “Baño María” a 65°C por 5 min. Después, se agregaron 130  $\mu$ L de acetato de potasio a 5M y se mantuvo en hielo por 5 min; se añadieron 700 $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se mezcló y se centrifugó a 15 000 x g por 10 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo de micro centrífuga de 1.5mL, se agregaron 640  $\mu$ L de alcohol isopropílico y 60 $\mu$ L de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y se puso a precipitar el DNA a -20°C por 10 min. Después se centrifugó 15 000 x g por 10 min, y se desechó el sobrenadante; la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% a 15 000 x g por 5 min. Se dejó secar durante 20 min en papel secante y se resuspendió con 200  $\mu$ L de agua libre de DNAsa y RNAsa (TEKNOVA ®).

Para la PCR se utilizaron los primers Lso16/23 F (5' AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG3') y Lso 16/23 R(5' GGTACCTCCCATATCGC3'), que amplifican un producto de 383pb entre la región 16 S y 23 S de los genes rRNA (Ravindran *et al.*, 2011). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25  $\mu$ L, buffer de PCR 1x, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.8  $\mu$ M de cada primer, 1U DNA polimerasa Bio TecMol ® y 100ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Techne 512® (USA), con una desnaturalización inicial de 94°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1 min; y

una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron verificados por electroforesis en agarosa al 0.7% con buffer de corrida TBE 0.5 X con el uso de 5µL del producto de PCR, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó en un transiluminador Gel-Doc mod 2000 (BIORAD)

**Incidencia.** Se evaluó la incidencia de la enfermedad (proporción de plantas sintomáticas) a intervalos de dos semanas durante los meses de julio a diciembre del 2012 y 2013; los datos se registraron en un libro de campo donde se especificó fecha, sitio experimental y observaciones ( registro de la presencia del insecto vector *B. cockerelli*, plantas muertas, presencia de algún factor climático).

**Análisis temporal de la epidemia.** Con los datos de incidencia de cada uno de los cuadrantes, se construyeron curvas de progreso de la enfermedad. Los modelos epidemiológicos que se probaron fueron: Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz, usando el paquete Curve Expert 2.0. Se utilizaron dos metodologías para la comparación de las curvas de progreso de la epidemia: 1) Prueba de t, para lo cual se requirió el cálculo del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de cada cuadrante mediante el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990), usando el software Scientific Work Place 5.5 ®. MachKichan Software Inc. 2) Prueba de Wald, la cual requiere de la estimación de los parámetros de la curva de progreso de la epidemia para cada cuadrante de las parcelas. Para obtener los valores de estimadores de la epidemia ( $y_0$  y  $rL$ ), y la matriz de covarianza, se utilizó la regresión no lineal con SAS ® v. 9 y los cálculos necesarios para la prueba de Wald se realizaron con el software R®.

**Análisis espacial de la epidemia.** Con los datos de incidencia de cada cuadrante se realizó una exploración visual del comportamiento espacial de la epidemia, elaborando mapas de superficie con el software Surfer ® v.6 (Golden Software, USA) en cada tiempo de muestreo.

Para determinar qué tipo de dispersión espacial presentó la epidemia, se utilizaron dos pruebas de bondad de ajuste. Si la distribución binomial tiene un buen ajuste entonces la epidemia se presenta en forma aleatoria, y si es  $\beta$ -binomial entonces la epidemia se presenta en agregados (Madden y Huges 1994; Madden *et al.*, 2007). Cada cuadrante de 400 plantas se dividió en 25 sub-cuadrantes con 16 plantas, a esos sub-cuadrantes se les contabilizó la incidencia de la enfermedad y se realizó el análisis con el software BBD y SAS v.9 ®. Para determinar cómo se conformaron las agregaciones de las plantas enfermas se evaluó el índice de proximidad, el cual se calculó con el programa STAUTO (Reynolds y Madden, 1988; Reynolds *et al.*, 1988); para ello, se realizó un análisis preliminar con las observaciones de los cuadrantes transformados con la función logit, y con los análisis estadísticos de los autocorrelogramas en tres intervalos (lag) espaciales y temporales donde se evaluaron los patrones de proximidad (rook, bishop, queen, square). La identificación del modelo de proximidad se basó en los valores de  $z$  de autocorrelación y los patrones observados en el autocorrelograma y con la significancia de  $P= 0.05$ ,  $P=0.01$  y  $P= 0.001$ .

## RESULTADOS

**Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.** Los resultados del análisis realizado a las plantas sintomáticas, observadas en los cuadrantes mostrando síntomas de variegado, albinismo y escaldadura, fueron positivas para la bacteria *Ca.L.s*; de tal manera que las observaciones realizadas se hicieron con la certeza de evaluar la epidemia originada a partir de infecciones de este patógeno. Los datos de incidencia obtenidos de las parcelas ubicadas en Yurécuaro y Vista Hermosa en el año 2012, indicaron que la enfermedad no progresó en comparación con la epidemia presentada en el 2013, obteniéndose sólo el 4% de incidencia en la etapa de producción; de tal manera que para este estudio se utilizaron los datos del 2013 con la finalidad de poder realizar los análisis de la epidemia.

**Dinámica poblacional de *Bactericera cockerelli*.** *B. cockerelli* se presentó en Vista Hermosa a los 94 ddt, mientras que en Yurécuaro a los 92 ddt. Se observó un incremento en la incidencia de la enfermedad (Figura 1) con la presencia del insecto, encontrándose una correlación de 0.88 ( $P= 0.04$ ) en el cuadrante 1, de 0.879 ( $P=0.05$ ) en el cuadrante 2 y cuadrante 3 de 0.853 ( $P=0.066$ ), en Yurécuaro. Mientras que en Vista Hermosa se encontró una correlación de 0.778 ( $P=0.121$ ) y 0.787 ( $P=0.114$ ) en el cuadrante 1 y 2 respectivamente

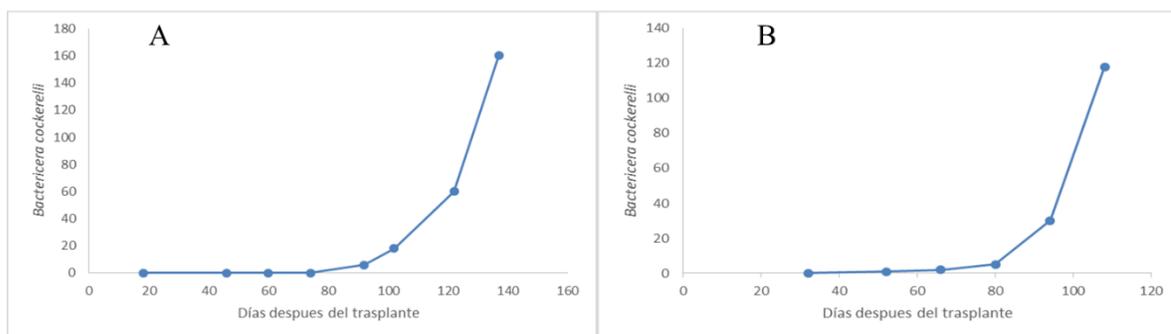


Figura. 1- Dinámica de *Bactericera cockerelli*, en Chile de la variedad Rivera del ciclo de cultivo del 2013. A) Yurécuaro, B) Vista Hermosa.

**Análisis temporal de la epidemia.** El modelo logístico ( $y = 1 / (1 + ((1-y_0)/y_0) * \exp(-rL*t))$ ), fue el que mejor describió la epidemia en las dos parcelas evaluadas. En Yurécuaro se tuvieron como parámetros  $y_0=0.0031$  y  $rL=0.034$ , lo que indica que la intensidad inicial de la enfermedad fue de 0.0031 al tiempo 0, y que ésta se incrementó a una velocidad de 0.034% por día, obteniéndose una incidencia final de 24 % de acuerdo al modelo. En Vista Hermosa los parámetros fueron  $y_0=0.0208$  y  $rL=0.0223$ , evidenciando que la intensidad inicial de la enfermedad en esa parcela fue de 0.0208 al tiempo 0, mientras que su incremento por día fue del 0.0223%; aquí el modelo indicó que al final del cultivo la incidencia final fue de 15%. En ambas parcelas, el término del cultivo no permitió el desarrollo de la epidemia. El modelo obtenido nos permite realizar pronósticos; al realizarlos nos indicó que si el cultivo se hubiera mantenido en campo hasta los 180 ddt, se podría observar una incidencia final del 50%. Al respecto, uno de los cuadrantes de la localidad de Vista Hermosa, el cuadrante 1, se perdió debido al exceso de lluvia en la temporada que favoreció enfermedades originadas por

patógenos de la raíz, de tal manera que sólo se usaron los cuadrantes 2 y 3 para comparación con Yurécuaro.

El análisis visual de las gráficas de incidencias indicó que el comportamiento de la epidemia en Yurécuaro y Vista Hermosa fue similar en ambos casos; es decir, mostraron un mismo tipo de curva de progreso de la epidemia (Figura 2). La evidencia estadística indica que el área bajo las curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) entre Yurécuaro y Vista Hermosa no fue significativamente diferente ( $t=0.87$ ,  $P=0.545$ ), (Cuadro 1).

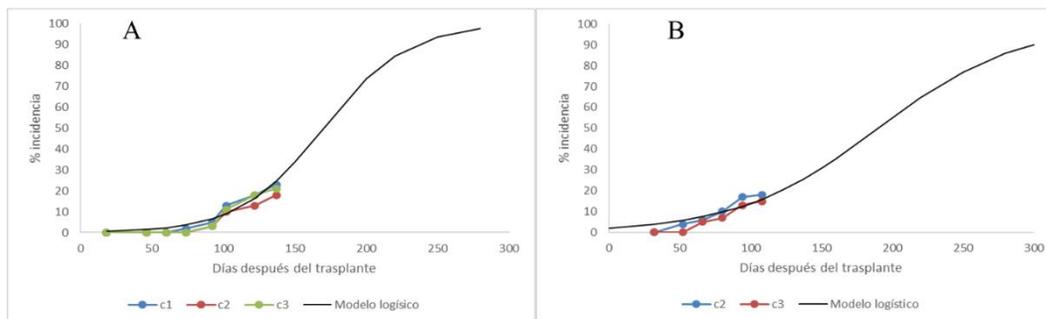


Figura 2.- Progreso temporal de la incidencia del variegado de chile, causado por *Candidatus Liberibacter solanacearum* y modelo logístico. A) Yurécuaro y B) Vista Hermosa en 3 y 2 cuadrantes, respectivamente, en chile de la variedad Rivera del ciclo de cultivo del 2013.

Cuadro 1.- Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en Yurécuaro y Vista Hermosa, en los distintos cuadrantes evaluados (c1, c2, c3).

Cuadrante	Yurécuaro ( %•día)	Vista Hermosa (%•día)
c1	805.33	
c2	593.99	704.36
c3	715.72	494.89

Al comparar curvas de progreso de la enfermedad entre localidades y cuadrantes usando la prueba de Wald, se encontró que no hubo diferencias significativas (Cuadro 2). El valor del cuantil de prueba de  $X^2$  fue:  $X^2_{(0.05,1)}=3.841$ .

Cuadro 2.- Prueba de Wald para comparar las curvas de progreso de la epidemia Yurécuaro (Yu) con base en los parámetros  $y_0=0.0031$   $rL=0.034$  y Vista Hermosa (Vis)  $y_0=0.0208$  y  $rL=0.0223$ , en los distintos cuadrantes (c1, c2, c3).

Cuadrantes	Valor de $X^2$
Yu c1/Yu c2	<0.0001
Yu c1/Yu c3	0.0999
Yu c2/Yu c3	0.0907
Vis c2/Vis c3	0.0030
Yu c1/Vis c2	<0.0001
Yu c1/Vis c3	0.0032
Yu c2/Vis c2	0.0002
Yu c2/Vis c3	0.0023
Yu c3/Vis c2	0.0579
Yu c3/Vis c3	0.0407

**Análisis espacial de la epidemia.** La dispersión espacial de la epidemia en el tiempo presentó tres tipos de comportamientos: 1) Agregados: la distribución  $\beta$ -binomial tuvo un buen ajuste a los datos de incidencia de la enfermedad de los cuadrantes 1 y 2 de Yurécuaro,

y cuadrante 2 de Vista Hermosa (Figura 3); 2) Aleatorio-Agregados: en el cuadrante 2 de Vista Hermosa, la distribución binomial tuvo un buen ajuste en las primeras evaluaciones presentando plantas con *Ca*Ls de forma aleatoria, sin embargo al transcurrir el ciclo del cultivo, se empezaron a formar los agregados (Figura 4); 3) Aleatorio: la distribución binomial presentó un buen ajuste a la incidencia del cuadrante 3 de Yurécuaro y Vista Hermosa (Figura 5) (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Índices y pruebas de dispersión de los datos de incidencia del variegado del chile, causado por *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Parcelas	Parámetros		Distribución $\beta$ -binomial			Distribución Binomial			Índice de dispersión		
	P	$\theta$	X <sup>2</sup>	GL	Prob	X <sup>2</sup>	GL	Prob	D	X <sup>2</sup>	Prob.
Yu c1	0.23	<0.01	0.6	1	0.44	0.7	2	0.71	1.1	26.6	0.32
Yu c2	0.18	0.16	0.1	1	0.77	1.9	1	0.17	3.2	76.5	<0.01
Yu c3	0.21	0.14	ND	ND	ND	6.4	2	0.04	2.9	70.7	<0.01
Vis c2	0.15	0.11	0.4	1	0.51	11.6	2	<0.00	2.6	61.3	<0.01

Vis c3    0.15    0.06    ND    ND    ND    1.8    2    0.39    2.0    48.0    <0.01

$X^2$  Valor de estadístico de prueba chi-cuadrado, P,  $\Theta$ , parámetros obtenidos mediante el software BBD; GL, grados de libertad; Prob, valor de P; N.D. no determinado.

En todos los casos se observó que las primeras plantas con síntomas aparecen en las orillas, las cuales son focos de infección que posteriormente conforman los grupos de plantas enfermas.

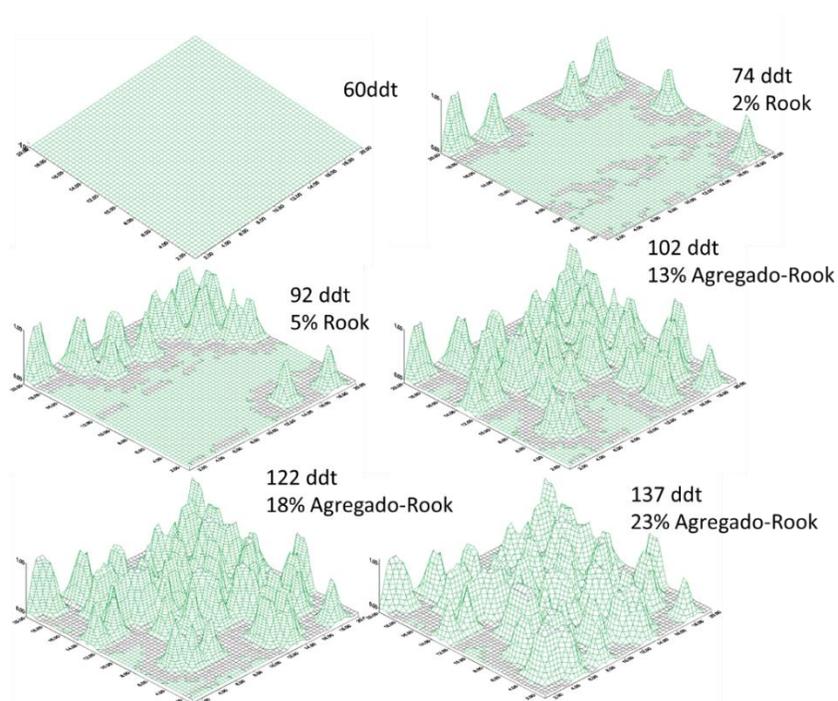


Figura 3.- Agregación en el cuadrante 1 de Yurécuaro, en los distintos días del trasplante (ddt), porcentaje de incidencia, índice de agregación y patrón de proximidad.

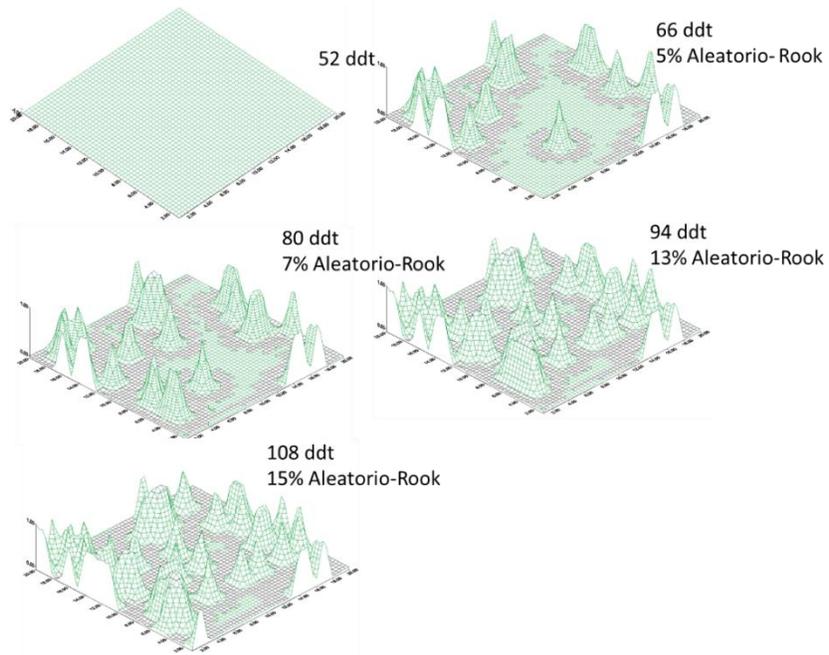


Figura 4.- Agregación en el cuadrante 2 de Vista Hermosa, en los distintos días del trasplante (ddt), porcentaje de incidencia, agregación y patrón de proximidad.

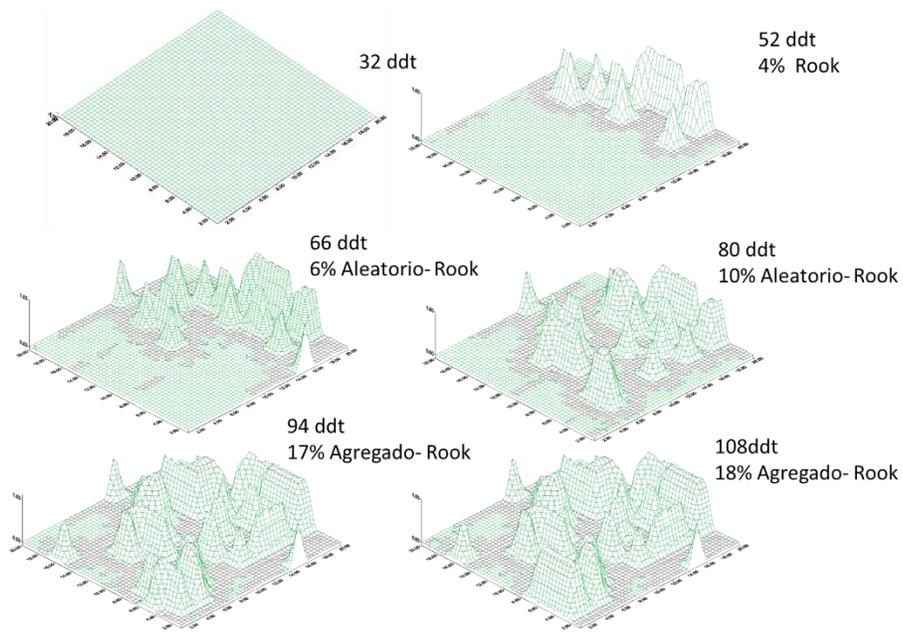


Figura 5.- Agregación en el cuadrante 3 de Vista Hermosa, en los distintos días del trasplante (ddt), porcentaje de incidencia, agregación y patrón de proximidad.

Al realizar la autocorrelación espacial se observó un patrón de proximidad en “Rook”, en todos los tiempos de evaluación, lo cual indicó que la dispersión de las plantas enfermas fue en línea recta, y que de esa forma se conformaron las plantas hasta resultar los agregados (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Autocorrelación espacio-temporal de la incidencia de plantas con *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los cuadrantes de Yurécuaro, con un patrón de proximidad de Rook en los distintos lag de tiempo y espacio.

Autocorrelación				
Lag espacial Yurécuaro c1				
Lag temporal	0	1	2	3
1	0.8410***	0.1397*	-0.0177	0.1094
2	0.5805***	0.0182	-0.1297	0.0134
3	0.2459***	-0.1289	-0.216	-0.1206
Lag espacial Yurécuaro c2				
Lag temporal	0	1	2	3
1	0.8400***	0.3799***	0.2218***	0.1877**
2	0.5858***	0.2676***	0.1153	0.1206
3	0.1492*	-0.037	-0.08	-0.087
Lag espacial Yurécuaro c3				

Lag temporal	0	1	2	3
1	0.8355***	0.2957***	0.2753***	0.1734**
2	0.5079***	0.0955	0.0927	0.0261
3	0.0645	-0.1305	-0.1298	-0.1583*

\*, \*\*, \*\*\*. Valores de la autocorrelación del estadístico de prueba que fueron significativos,  $P=0.05$ ,  $P=0.01$ ,  $P=0.001$ , respectivamente.

En los autocorrelogramas se puede apreciar que en los primeros lag tanto espaciales como temporales, los valores de autocorrelación son altamente significativos con  $P=0.001$ , y conforme se evalúan los demás lag; los valores de autocorrelación disminuyen. En todos los cuadrantes se observó un mismo tipo de proximidad (Rook); es decir, el contagio de CaLs se dio en forma vertical y horizontal; incluso en aquellos cuadrantes que presentaron un patrón de agregación aleatorio. Observamos que las plantas sintomáticas se empiezan a distribuir en línea recta, y al progresar la epidemia se presentan los agregados (Cuadro 4-6).

Cuadro 5.- Autocorrelación espacio-temporal de la incidencia de plantas con *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los cuadrantes de Vista Hermosa, con un patrón de proximidad de Rook en los distintos lag de tiempo y espacio.

Autocorrelación				
Lag espacial Vista Hermosa c2				
Lag temporal	0	1	2	3
1	0.8555***	0.5372***	0.2987***	0.2038***
2	0.6087***	0.3283***	0.1577*	0.1464*
3	0.4286***	0.2048**	0.1154	0.1284
Lag espacial Vista Hermosa c3				
Lag temporal	0	1	2	3
1	0.8236***	0.1920**	0.1548**	0.1384*
2	0.6005***	0.1172	0.085	0.0481
3	0.3122***	-0.0142	0.0129	-0.0462

\*, \*\*, \*\*\*. Valores de la autocorrelación del estadístico de prueba que fueron significativos,  $P=0.05$ ,  $P=0.01$ ,  $P=0.001$ , respectivamente.

Cuadro 6.- Tipo de agregación y proximidad en Yurécuaro en los distintos cuadrantes.

Ddt	Cuadrante 1		Cuadrante 2		Cuadrante 3	
	Agregación	Proximidad	Agregación	Proximidad	Agregación	Proximidad
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
46	ND	ND	ND	ND	ND	ND
60	ND	ND	ND	ND	ND	ND
74	ND	Rook	ND	ND	ND	ND
92	ND	Rook	ND	Rook	ND	Rook
102	Agregado	Rook	Aleatorio	Rook	Aleatorio	Rook
122	Agregado	Rook	Agregado	Rook	Aleatorio	Rook
137	Agregado	Rook	Agregado	Rook	Aleatorio	Rook

ND, valor de agregación o proximidad no determinado por insuficiencia de datos, debido a que aún no se presentaba la enfermedad.

En Vista Hermosa en el cuadrante 2, se presentó un índice de dispersión aleatorio a partir de los 66 ddt, y con conforme transcurrió la epidemia, se presentaron los agregados a partir de los 94 ddt; esto es un comportamiento que está sujeto a la transmisión de la bacterias por un insecto vector; primero se establecen los focos de infección y a partir de ahí se desarrolla la dispersión hacia las plantas circundantes (Cuadro 7).

Cuadro 7.- Tipo de agregación y proximidad en Vista Hermosa en los distintos cuadrantes.

ddt	Cuadrante 2		Cuadrante 3	
	Agregación	Proximidad	Agregación	Proximidad
32	ND	ND	ND	ND
52	ND	Rook	ND	Rook
66	Aleatorio	Rook	ND	Rook
80	Aleatorio	Rook	Aleatorio	Rook
94	Agregado	Rook	Aleatorio	Rook

---

ND, agregación o proximidad no determinado por insuficiencia de datos, debido a que aún no se presentaba la enfermedad.

## DISCUSIÓN

Los resultados de la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* por PCR usando los primers 16/23 Lso, confirmaron la presencia de la bacteria en las plantas con síntomas de variegado, reducción de crecimiento y deformación de hojas en los ciclos de cultivo 2012 y 2013.

La incidencia al final del 2012 fue de 4% mientras que en el 2013 se tuvo como incidencia final el 23%. Dicha diferencia podría relacionarse con la presencia de haplotipos de *CaLs* en Chile, ya que otros estudios de *CaLs* han mostrado diferencia de la epidemia por la presencia de haplotipos (Lin *et al.*, 2012). En el patosistema *Ca. L. solanacearum*-papa se ha encontrado que las diferencias entre epidemias están sujetas a la presencia de haplotipos, de tal manera que una variación genética de la bacteria en campo, resulta en un incremento de la incidencia e incluso de la severidad de los síntomas (Lin and Gudmestad, 2013).

En un estudio previo en Michoacán (Camacho-Tapia *et al.*, 2014), en el 2012 se encontró que hubo 70% de presencia de haplotipo A y 30% del haplotipo B, mientras que en el 2013 el 100% de las muestras procesadas de los cuadrantes evaluados en Michoacán,

presentaron el haplotipo A. En este estudio se observó mayor presencia del haplotipo A en plantas sintomáticas; esto sugiere que la presencia de haplotipos de la bacteria son un factor importante que influye en el comportamiento de la epidemia, de tal forma que se ve afectada la incidencia y su distribución espacial en campo, además de los ciclos de reinfección por *B. cockerelli* al influenciarse la supervivencia de este insecto.

Por otro lado, en el 2012 hubo mayor presencia de *B. cockerelli* con un máximo de 473 insectos en un muestreo, de los cuales sólo el 9% portaba la bacteria; mientras que en 2013, la máxima cantidad de insectos capturados fue de 160, y el 21 % de ellos tenían la bacteria; esto concuerda con lo reportado por Hamm *et al.* (2011), quienes encontraron que las poblaciones de *B. cockerelli* suelen tener un porcentaje variable de insectos portadores de CaLs, que va desde 0.4-13.3%; lo anterior podría deberse al sitio de alimentación en plantas donde la bacteria aún no se ha translocado en todo el sistema vascular. Levy *et al.* (2011) indicaron que hay una correlación negativa en la capacidad de supervivencia de *B. cockerelli* con CaLs (Nachappa *et al.*, 2014).

El análisis del progreso de la epidemia indicó que la misma se describe por el modelo logístico. Este modelo describe epidemias de tipo policíclicas, es decir con múltiples ciclos de infección. En el caso de la epidemia de CaLs, la transmisión mediante *B. cockerelli* producen múltiples ciclos de reinfección y por ello genera ese mismo comportamiento (Lin and Gudmestad, 2013). En las dos parcelas se tuvo una intensidad inicial de la enfermedad

( $y_0$ ) al tiempo cero de 0.003-0.02, lo cual indica que había una proporción baja de inóculo inicial en el campo. Lo anterior sugiere la posible presencia de *CaLs* en la semilla, por lo que el uso de semilla certificada libre de *CaLs* podría contribuir significativamente a reducir el progreso espacio-temporal de la epidemia. La tasa de incremento de la enfermedad fue baja (0.02-0.03), probablemente debido a que en campo los productores realizan aplicaciones de plaguicidas para controlar otras plagas que son de importancia para el Chile y que monitorean desde antes de la llegada de *B. cockerelli*; por lo tanto, cuando llega el psílido es afectado por esas aplicaciones de químicos y su población se ve disminuida, lo cual coincide con lo que indican Madden *et al.*, (2007) en relación a que la tasa de incremento de la enfermedad disminuye si aplicamos un sistema de control para reducir las reinfecciones, además del incremento del tiempo entre el inicio de la infección y la producción de focos de infección.

En el patosistema estudiado en esta investigación, la reducción de  $rL$  dio como resultado que las incidencias no fueran superiores al 23% al momento de la cosecha. Si el cultivo se hubiera dejado más tiempo en campo, de acuerdo al modelo ajustado por ejemplo 180 ddt, la incidencia esperada sería del 50%. No obstante, los tiempos que se mantiene un cultivo en campo varían según el desarrollo del mismo, y de la demanda del producto en el mercado.

Otro factor importante que influye en la epidemia es el tiempo de translocación, ya que este puede ser variable. Nosotros encontramos que *CaLs* se transloca en Chile en 21 días (Capítulo 2). Otros estudios de este tipo han mostrado que en jitomate la translocación es más consistente en comparación con papa, esto es debido a un incremento de la producción

de compuestos fenólicos, y almidones que limitan el establecimiento de la bacteria y lo que conduce a una disminución de la distribución de la epidemia (Levy *et al.*, 2011; Rashed *et al.*, 2013).

Al igual que en este estudio, Gottwald *et al.* (2007) encontraron que la epidemia de *Ca. Liberibacter asiaticus* se describe por el modelo logístico, debido a que su transmisión está influenciada por *Diaphorina citri*.

En la comparación de las curvas de progreso de la enfermedad a través de las tasas de incremento de la enfermedad (rL), el ABCPE y la prueba de Wald, no se encontraron diferencias significativas. Esto indica que el progreso de la epidemia sigue un mismo patrón; aunque la duración observada de estas fue distinta.

El tiempo a inicio de la epidemia es un factor importante; en este estudio se observó que la enfermedad se presenta entre los 50-70 días después del trasplante, mientras que la duración de la epidemia varía según el tiempo que se deje el cultivo en campo. En otras solanáceas como papa y jitomate, los síntomas se pueden presentar después de los 21 a 56 días de que se ha transmitido la bacteria (Levy *et al.*, 2011).

En la mayoría de los cuadrantes se observó que se presentan agregados y que estos evolucionaron a partir de plantas enfermas con distribución aleatoria. Nosotros observamos que en algunos casos los agregados se presentaron desde la primera evaluación, pero en otro caso, como el cuadrante 2 de Vista Hermosa, se mantuvo una distribución aleatoria; esto podría deberse a la variación en el porcentaje de insectos portadores de la bacteria, así como

la eficiencia en la transmisión. Con respecto a lo anterior, Hamm *et al.* (2011) encontraron que hay una variación de psílicos portadores de *CaLs* que va desde 0.4-13.3%, y que eso puede afectar la diseminación de la bacteria a partir de los focos de infección, además de resultar en distribución aleatoria. De igual forma, en un estudio de distribución espacial con la enfermedad de Zebra Chip, Henne *et al.* (2012) observaron que se forman agregados; pero cuando la infección por *B. cockerelli* es muy baja, la incidencia obtenida es menor de 0.2% y solo se presentan plantas sintomáticas de manera aleatoria. En esta investigación encontramos que los agregados se desarrollaron a partir de una dirección de contagio que fue de manera vertical en el surco, lo cual pudo ser identificado a través del índice de proximidad de Rook; mientras que cuando el dosel de la planta se desarrolló permitiendo el contagio entre surcos, la dirección de las plantas enfermas fue de forma horizontal.

La información obtenida proporciona el conocimiento para establecer un manejo integrado del variegado del chile. En este estudio se observó que la incidencia de la enfermedad se presenta antes de la llegada del insecto vector, lo que resalta la importancia de dar énfasis en la detección oportuna de semilla infectada para evitar la introducción de variedades contaminadas con la bacteria. Se observó que *B. cockerelli* está involucrado en el desarrollo de la epidemia en campo, de tal manera que es importante no descuidar el control del insecto. Considerando que los síntomas se empiezan a presentar aproximadamente a los 50-70 ddt, que implica entre los meses de octubre y noviembre; una manera de evadir la enfermedad es implementar fechas más tempranas del trasplante, además también considerar el uso de variedades precoces.

## CONCLUSIONES

El modelo que mejor describió el progreso temporal del variegado del chile fue el modelo logístico.

*Candidatus Liberibacter solanacearum* en el cultivo de chile formó agregados en la mayoría de los cuadrantes estudiados; éstos en algunos casos iniciaron con una distribución aleatoria de plantas sintomáticas y posteriormente tendieron a la agregación.

La formación de agregados tiene un patrón de proximidad de Rook, indicando una dispersión inicial lineal.

## LITERATURA CITADA

Aguilar, E., V. G. Segonda, B. Bextine, K. F. McCue, J. E. Munyaneza. 2013. First report of

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on tobacco in Honduras. *Plant Dis.* 97:1376.

Ammar, E.-D., R. G. Shatters Jr., D. G. Hall. 2011. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using

fluorescence *in situ* hybridization. *J. Phytopathol.* 159:726–734

- Camacho-Tapia, M., R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, M. G. Hernández-Deheza, J. A. Carrillo-Salazar, A. Rebollar-Alviter, D. L. Ochoa-Martínez. 2011. Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *J. Plant Pathol.* 93:331-335.
- Camacho-Tapia, M., R. I. Rojas-Martínez, J. Levy, E. Zavaleta-Mejía. 2014. Presencia de los haplotipos a y b de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en México. XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF).
- Campbell, C. L., L.V. Madden. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons Inc. New York. 532p
- Capoor, S. P., D. G. Rao, S. M. Visnawanath. 1967. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian J. Agric. Sci.* 37:572-576.
- Gottwald, T. R., B. Aubert, X.-Y. Zhao. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79:687-693.
- Gottwald, T. R., J. V. da Graça, R. B. Bassanezi. 2007. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Hamm, P. B., S. I. Rondon, J. M. Crosslin, J. E. Munyaneza. 2011. A new threat in the Columbia Basin of Oregon and Wanshington: zebra chip, pp.1-5- *In* F. Workneh, A.

- Rashed, C. M. Rush (Eds.). Proceedings of the 11<sup>th</sup> Annual Zebra Chip Reporting Session, 6-9 November 2011, San Antonio, TX.
- Henne, D. C., F. Workneh, C. M. Rush. 2012. Spatial patterns and spread of potato zebra chip disease in the Texas Panhandle. *Plant Dis.* 96:948-956.
- Hughes, G., L. V. Madden. 1993. Using the beta-binomial distribution to describe aggregated patterns of disease incidence. *Phytopathology* 83:759-763.
- Jagoueix, S., J. M. Bové, M. Garnier. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bact.* 44:379-386.
- Levy, J., A. Ravindran, D. Gross, C. Tamborindoguy, E. Pierson. 2011. Translocation of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’, the Zebra Chip pathogen, in potato and tomato. *Phytopathology* 101:1285-1291.
- Liefting, L. W., Z. C. Perez-Egusquiza, G. R. G. Clover, J. A. D Anderson,. 2008. A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92:1474.
- Lin, H., M. S. Islam, Y. Bai, A. Wen, S. Lan, N. C. Gudmestad, E. L. Civerolo. 2012. Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ strains in the United States and Mexico revealed by simple sequence repeat markers. *Eur. J. Plant Pathol.* 132:297-308.

- Lin, H., N. C. Gudmestad. 2013. Aspects of pathogen genomics, diversity, epidemiology, vector dynamics, and disease management for a newly emerged disease of potato: Zebra chip. *Phytopathology* 103:524-537.
- List, G. M. 2009. The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *J. Econ. Ent.* 32:30-36.
- Madden, L. V., G. Hughes. 1994. BBD – Computer software for fitting the beta-binomial distribution to disease incidence data. *Plant Dis.* 78:536-540.
- Madden, L. V., G. Hughes. 1995. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:529-564.
- Madden, L. V., G. Hughes, F. van den Bosch. 2007. *The Study of Plant Disease Epidemics*. APS Press, St. Paul, MN. 432p.
- McClellan, A. P. D., P. C. J. Oberholzer. 1965. Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8:297-298.
- Munyaneza, J. E., V. G. Sengoda, J. L. Buchman, T. W. Fisher. 2012. Effects of temperature on ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Dis.* 96:18-23.
- Nachappa, P., J. Levy; E. Pierson, C. Tamborindoguy. 2014. Correlation between “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection levels and fecundity in its psyllid vector. *J. Invertebr. Pathol.* 115:55-61.

- Rashed, A., C. M. Wallis, L. Paetzold, F. Workneh, C. M. Rush. 2013. Zebra chip disease and potato biochemistry: tuber physiological changes in response to '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' infection over time. *Phytopathology* 103:419-426.
- Ravindran, A., J. Levy, E. Pierson, D. Gross. 2011. Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Plant Dis.* DOI: 10.1094/PDIS-05-11-0386.
- Reynolds, K. M., L. V. Madden. 1988. Analysis of epidemic using spatio-temporal autocorrelation. *Phytopathology* 78:240-246.
- Reynolds, K. M., L.V. Madden, M. A. Ellis. 1988. Spatio-temporal analysis of epidemic development of leather rot of strawberry. *Phytopathology* 78:246-252.
- Wallis, C. M., A. Rashed, A. K. Wallingford, L. Paetzold, F. Workneh, C. M. Rush. 2014. Similarities and differences in physiological responses to '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' infection among different potato cultivars. *Phytopathology* 104:126-133.
- Yamamoto P. T., M. R. Felipe, L. F. Garbim, J. H. C. Coelho, N. L. Ximenes, E. C. Martins, A. P. R. Leite, M. C. Sousa, D. P. Abrahão, J. D. Braz. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. Page 96 In: Proc. Int. Huanglongbing-Greening Workshop. University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Zadoks, J. C., R. D. Shein. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press. Oxford. 427p.