



COLEGIO DE POSTGRUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

EPIDEMIOLOGÍA DEL VARIEGADO DEL CHILE

(*Capsicum annum* L.) EN LA REGIÓN DE

YURÉCUARO, MICHOACÁN.

MOISÉS CAMACHO TAPIA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis titulada: EPIDEMIOLOGÍA DEL VARIEGADO DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) EN LA REGIÓN DE YURECUARO, MICHOACAN, 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:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

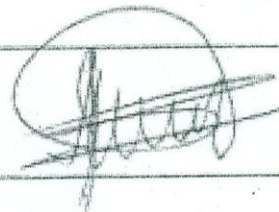
CONSEJERO:


Dra. Reyna I. Rojas Martínez

ASESOR:


Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESOR:


Dr. Ángel Rebollar Alviter

ASESOR:


Dr. Alfredo Carrillo Salazar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2010

RESUMEN

EPIDEMIOLOGÍA DEL VARIEGADO DEL CHILE (*Capsicum annum* L.) EN LA REGIÓN DE YURÉCUARO, MICHOACAN.

Moisés Camacho Tapia, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

En los municipios de Yurécuaro y Vista Hermosa, con el objetivo de determinar el comportamiento de la epidemia del variegado del chile asociada a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, se realizó un análisis espacio-temporal de dicha epidemia. Para confirmar la presencia de la bacteria, se colectaron muestras de chile con síntomas de clorosis, deformación de hojas, variegado y albinismo, además semillas de frutos de plantas en etapa de corte, también se colectó el insecto vector *Bactericera cockerelli* Sulc. Se realizó muestreo regional de diez parcelas de cultivo de chile en la etapa final para comparar la distribución espacial. Se realizaron mapas bidimensionales y tridimensionales, además se estimaron los índices de agregación usando los métodos de Morisita y Lloyd, y se obtuvo el tamaño óptimo de cuadrante por el método de Greig-Smith modificado Campbell y Madden. Para el análisis temporal, se realizó un ajuste por R^2 con los modelos epidemiológicos para tener un indicador del proceso biológico del desarrollo de la epidemia. El índice de agregación obtenido fue uniforme considerándose un tamaño óptimo del cuadrante de 64, la epidemia se ajustó al modelo logístico.

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

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGY OF VARIEGATED PEPPER (*Capsicum annuum* L.) IN THE REGION OF YURÉCUARO, MICHOACÁN

Moisés Camacho Tapia, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

In the Municipalities of Yurécuaro and Vista Hermosa, Michoacán, the research was conducted with the objective to determine the behavior of the epidemic of the variegated pepper associated with *Candidatus Liberibacter solanacearum*. A spatial-temporal analysis was conducted of the epidemic, to confirm the presence of the bacteria samples of pepper with symptoms of chlorosis, leaf deformation, variegation and albinism and seeds of fruits of plants in the harvesting stage was analysed, also was collected the insect vector *Bactericera cockerelli* Sulc, A regional sample of ten plots of pepper in the final stage was conducted to compare the spatial distribution. Bidimensional and tridimensional maps were made and the indexes of aggregation were estimated by the methods of Morisita and Lloyd and the optimum size of the quadrant were obtained using the method of Greig-Smith modified by Campbell and Madden. The temporal analysis of the epidemiological models was adjusted with R^2 to find an indicator of the biological process of the development of the epidemic. The aggregation index was uniform considering an optimal quadrant of 64. The epidemic was adjusted to a logistic model.

Key words: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, variegated pepper, epidemic, index of aggregation, 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 Maestría 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 su paciencia y 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. J. Alfredo Carrillo Salazar, por sus valiosas sugerencias que apoyaron la investigación.

A mis profesores de la especialidad de Fitopatología, por experiencias y conocimientos aportados.

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

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1 <i>Candidatus</i> Liberibacter	17
2.2 Aspectos epidemiológicos	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Ubicación de la zona de muestreo	22

3.2 Detección de <i>Candidatus Liberibacter</i>	23
3.2.1 Detección de <i>Ca. Liberibacter</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
4.3 Análisis espacio-temporal del variegado del chile intra-parcela.	25
3.4 Análisis regional del variegado del chile.	28
3.6 Dinámica de <i>Bactericera cockerelli</i>	30
3.7 Análisis de datos	31
IV. RESULTADOS	32
4.1 Detección de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> por PCR	32
4.2 Distribución espacio temporal intra-parcela	35
4.3 Análisis temporal de la epidemia	36
4.4 Análisis espacial de la epidemia	44
4.6 Distribución Regional	49
4.7 Uso de software para comparación de escala ordinal	54
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	60

VII. LITERATURA CITADA	61
VIII. ANEXO	67
9.1.- Modelos de análisis temporal de la epidemia en la parcela 2 Javier Rico.	68

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PAG
1	Localización de las parcelas muestreadas.	23
2	Conversión de escala ordinal a punto medio de daño en porcentaje.	27
3	Localización de las parcelas de muestreo regional.	29
4	Semillas procesadas para <i>Ca. Liberibacter</i> .	34
5	Incidencia del insecto vector en las parcelas muestreadas.	37
6	Modelo logístico para incidencia y severidad de los cuadrantes de la parcela 2 en Yurécuaro, Michoacán.	40
7	Estimación de área bajo la curva e incidencia y severidad final en las parcelas evaluadas.	42
8	Índices de agregación para cuadrante 1	45
9	Índices de agregación para cuadrante 2	46
10	Índices de agregación para cuadrante 3	47

11	Índice de agregación para parcelas de muestreo regional.	53
12	Porcentaje de clorosis estimado en las clases evaluadas.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG
1	Geoposición de las parcelas para el estudio de distribución regional.	30
2	Síntomas asociados a <i>Ca. Liberibacter</i> en plantas de chile en Yurécuaro Mich, 2009.	32
3	Reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores OA2 y OI2c en plantas de <i>Capsicum annuum</i> L. con diferentes síntomas.	32
4	Reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores OA2 y OI2c en semillas de chile e insectos.	34
5	Mapa bidimensional y tridimensional donde se observa la distribución de la enfermedad en la evaluación de 14 de noviembre del 2009: a) parcela 2, b) parcela 5.	35
6	Incidencia de plantas con síntomas asociados a <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> en las parcelas de los productores.	37

7	Graficas de incidencia del variegado y la dinamica poblacional de <i>B. cockerelli</i> en las parcelas de: a)Javier Rico, b) Salvador Hernández.	38
8	Gráficas de severidad de la enfermedad de acuerdo a la conversión de punto medio de la escala ordinal establecida en campo.	39
9	Análisis de correlación para parcela 2 donde hubo progreso de la enfermedad.	43
10	Mapas bi y tridimensionles del cuadrante 1 de la parcela donde hubo mayor incidencia de la enfermedad.	48
11	Mapas realizados del muestreo regional en las 10 parcelas evaluadas.	50
12	Estimación del porcentaje clorótico de plantas clasificadas de acuerdo a la escala arbitraria establecida en campo.	51

I. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las cinco hortalizas más importantes a nivel mundial. Por su gran diversidad de usos el cultivo de chile se ha extendido a todo el territorio nacional, desde altitudes a nivel del mar hasta los 2500 msnm, el rendimiento del país en el año del 2009 fue de 155, 282 ton (FAOSTAT, 2009).

En el 2009 las exportaciones mexicanas de pimienta fueron de 89, 110 t (SIAP 2010) y la demanda en el mercado nacional es creciente debido a su alto contenido de vitaminas A y C, y de carotenos que son compuestos con propiedades antioxidantes (Nuez *et al.*, 1996).

Los principales estados productores de chile en México, son: Aguascalientes, Puebla, Baja California Sur, Quintana Roo, Campeche, San Luis Potosí, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Sonora, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo, Veracruz, Jalisco, Yucatán, Michoacán, Zacatecas y Oaxaca. En el 2009, la superficie sembrada de chile verde en Michoacán, fue 446 ha obteniéndose un rendimiento de 11,689 t de esa superficie (SIAP, 2010).

Entre las enfermedades que afectan a este cultivo se encuentran: Oidiopsis (*Leveillula taurica*), podredumbre gris (*Botritis cinerea*), podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), marchitez (*Phytophthora capsici*, *Pythium* sp., *Fusarium* sp.), mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*), peca del tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), virus mosaico del pepino (*Cucumber Mosaic Virus*), virus de la manchas ligeras del pimienta (*Pepper Mild Mottle Virus*) y las causadas por bacterias limitadas al floema que se

caracterizan por inducir necrosis del floema, “amarillamientos” (clorosis foliar), enanismo, falta de vigor y muerte de plantas (Fletcher y Wayadande, 2009).

Recientemente Hansen *et al.*, (2008) detectaron la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllauros* en plantas de papa y jitomate. Estudios posteriores determinaron que el psilido *Bactericera cockerelli* (Sulc.) es el vector de *Ca. Liberibacter psyllauros* y *Ca. Liberibacter solanacearum*. En ese mismo año en Nueva Zelanda se detectó la presencia de *Ca. L. solanacearum* en tubérculos con síntomas de “zebra chips” (Liefting *et al.*, 2008). Por otro lado, en el año 2009 en la región del bajío Michoacano, en los municipios de Yurécuaro, Tanhuato y Vista Hermosa, Michoacán, se detectó la presencia de *Ca. L. solanacearum* en plantas de chile variedad Centella con síntomas de: clorosis, disminución del tamaño del ápice de la hoja, deformaciones de las hojas, reducción de tamaño de la planta, aborto de flores, y variegado (Hernández, 2009). En ese mismo año se reportó a *Ca. L. solanacearum* como patógeno en el cultivo de chile en La Cruz Elota, estado de Sinaloa, los síntomas de las plantas fueron semejantes al “yellow psilid” que se presenta en papa, y mostraron además entrenudos cortos, y crecimientos apicales cloróticos (Munyanza *et al.*, 2009).

El control de *Ca. Liberibacter* en papa está enfocado al manejo integrado de *B. cockerelli*, debido a que éste es conocido como el principal medio de transmisión de la bacteria. A pesar de que desde 1947 se tiene registrada su presencia en los campos agrícolas de los estados de Durango, Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (Plesch, 1947, citado por

Vega *et al.*, 2008), no existen estudios detallados acerca de su papel como vector de *Ca. Liberibacter*.

Con la idea de contribuir al conocimiento de esta enfermedad la presente investigación tuvo como objetivo: Realizar un análisis temporal y espacial de la epidemia *Ca. Liberibacter solanacearum* en el cultivo de chile.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Candidatus Liberibacter*

Las bacterias agrupadas dentro del género *Candidatus Liberibacter*, colonizan el floema de sus plantas hospedantes y la dificultad para cultivarlas ha imposibilitado su ubicación taxonómica y por tanto se mantienen bajo la condición de *Candidatus*, término que antecede al género y especie debido a que no se puede tener en una colección biológica. Estas bacterias han sido asociadas con la enfermedad Huanglongbing (HLB) que afecta a los cítricos y cuyo significado en español es “Dragón Amarillo”. La bacteria fue observada por primera vez en 1970 afectando el floema de hojas de naranja (Lafèche y Bové, 1970), enfermedad que en ese entonces se consideró que era inducida por un organismo tipo micoplasma (MLO). Mediante microscopía electrónica de transmisión se determinó que su tamaño era mucho menor a un micoplasma y muy similar al de las bacterias, por lo que se le llamó organismo tipo bacteria (BLO) (Garnier *et al.*, 1984). Su caracterización bioquímica es nula, dada la dificultad para aislarla en medio de cultivo puro. La microscopía electrónica y técnicas citoquímicas, ha revelado que la bacteria *Ca. Liberibacter*, está rodeada por una membrana celular compuesta de peptidoglicano, típica de las gram negativas (Garnier *et al.*, 1984). Después de comparar su secuencia de nucleótidos con otras bacterias registradas en el GenBank, se propuso como miembro de las *Eubacteria*. El análisis filogenético del gen 16S rRNA indica que estas bacterias pertenecen al grupo de las *Alphaproteobacterias* donde se encuentran otros miembros como *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Bradyrhizobium*, entre otras

(Jagoueix *et al.*, 1994). Estos investigadores propusieron que el organismo que causa el HLB fuera considerado como una bacteria, y que los organismos de este nuevo grupo de la división de las *Proteobacteria*, deberían recibir el nombre trivial de “liberobacter” (del latín *liber* [corteza] y *Bacter* [bacteria]). Por otro lado Murray y Schleifer (1994) hicieron una propuesta considerando la morfología que presenta esta bacteria en los arboles de cítricos en la India y en arboles de cítricos de África proponen dos especies “*Candidatus Liberobacter asiaticum*” y “*Candidatus Liberobacter africanum*” respectivamente. Mediante cortes ultradelgados de tejido de floema de cítricos con HLB observados en microscopio electrónico de transmisión se ha determinado que tienen un diámetro de 0.2-0.3µm. Actualmente se han propuesto tres nombres para las bacterias que causan el HLB de los cítricos: *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter africanus*, las que son transmitidas por dos insectos vectores: *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. La bacteria está presente en la hemolinfa y las glándulas salivales del insecto vector (Jagoueix *et al.*, 1994).

Actualmente se usan varias técnicas, como PCR, clonación y la secuenciación para su detección y caracterización (Hansen *et al.*, 2008).

A finales de 2008 se reportaron nuevas especies de *Ca. Liberibacter* asociadas a solanáceas, como tomate, papa, chile; se indica que el psilido *Bactericera cockerelli* (Sulc), saltador de la papa, es el responsable de transmitir esta bacteria (Liefting *et al.*, 2008).

En el 2009 se reportó a *Ca. L. solanacearum* como patógeno en el cultivo de chile en La Cruz Elota estado de Sinaloa. Esta enfermedad, además de inducir síntomas semejantes al “yellow psilid”, también redujo entrenudos y causó crecimiento apical clorótico (Munyaneza *et al.*, 2009). En este mismo año se reporta la presencia de *Ca. L. solanacearum* en el cultivo de chile variedad Centella en Yurécuaro, Tanhuato y Vista Hermosa, Michoacán con los síntomas siguientes: clorosis, fuerte disminución del tamaño del ápice de la hoja, deformaciones de las hojas, reducción de tamaño de la planta, aborto de flores, además de variegado (Hernández, 2009).

En el 2010 se reportó la presencia de *Ca. L. solanacearum* en zanahoria en el sur de Finlandia; la transmisión ha sido atribuida al psilido *Trioxa apicalis*, plaga que comúnmente se presenta en el centro y norte de Europa. Los síntomas observados en esta hortaliza fueron: amarillamiento, deformación de hojas, clorosis, reducción de tamaño de la planta y proliferación de raíces secundarias (Munyaneza *et al.*, 2010).

La dificultad de cultivar las bacterias agrupadas en el género *Candidatus Liberibacter* a partir de plantas afectadas ha llevado a un diagnóstico erróneo. Anteriormente los síntomas de esta enfermedad eran atribuidos a otros patógenos, como hongos, bacterias cultivables, virus y fitoplasmas; no obstante los análisis para detectar algunos de éstos organismos fueron negativas (Weir *et al.*, 2008; Fletcher y Wayadande, 2009).

Generalmente *Ca. Liberibacter psyllaurorus* y *Ca. Liberibacter solanacearum* son transmitidos por el psilido *Bactericera cockerelli*, insecto polífago que se alimenta del floema de una amplia variedad de especies de plantas, entre las que se encuentra papa, jitomate y chile. En el caso de papa, se reporta que la secreción de la saliva de *B. cockerelli*, debilita al cultivo e induce el síntoma del “yellow psilid” (Blood *et al.*, 1933; y Carter, 1950; citados por Hansen *et al.*, 2008). El desorden de “yellow psilid”, anteriormente fue atribuido a una reacción de la planta, como resultado de las secreciones inyectadas cuando el psilido se alimentaba (Eyer, 1937; Richards y Blood, 1933). Los avances actuales en las técnicas de microbiología molecular han permitido detectar que “yellow psilid” y “Zebra chips” son dos enfermedades distintas, siendo la segunda causada por *Ca. Liberibacter* (Segonda *et al.*, 2009).

El control de *Ca. Liberibacter* en papa se realiza con el manejo integrado de *Bactericera cockerelli*, debido a que éste es conocido como el principal medio de transmisión de la bacteria; cabe considerar que algunas bacterias se transmiten por semilla, por lo tanto existe la posibilidad de que también suceda para *Ca. Liberibacter solanacearum*, lo que podría ser la principal fuente de diseminación, e inoculo primario.

2.2 Aspectos epidemiológicos

La epidemiología puede ser considerada, como el estudio de las epidemias. Una definición de epidemia es: El cambio en intensidad de enfermedad en una población de hospedante

sobre en tiempo y espacio (Madden *et al.*, 2007). Existen otras definiciones como la de Kranz (1990), quien menciona que una epidemia es el progreso de una enfermedad en tiempo y espacio.

Cuando se estudia el progreso de una enfermedad en el tiempo, se habla de un estudio temporal, mientras que cuando se usa su dimensión espacial, los estudios son espaciales. En ambos estudios es necesario medir atributos estructurales y funcionales de la población de plantas o de patógenos. Las mediciones estructurales convencionales incluyen la incidencia y la severidad. La incidencia es la cantidad de plantas o partes de plantas con la condición de la enfermedad con respecto a la población total; en cambio, la severidad se define como una medida que estima la cantidad relativa de área con un determinado síntoma en una unidad de observación (Madden *et al.*, 2007).

Las epidemias se pueden caracterizar en su estructura temporal utilizando uno o más parámetros asociados al progreso de una enfermedad; estos permiten caracterizar la intensidad de la epidemia, comparar epidemias, evaluar medidas de control, etc. Comúnmente se usan las siguientes variables: incidencia inicial, incidencia final, duración total de la epidemia, área bajo la curva, tasa de infección aparente, entre otros.

La estructura espacial se determina con parámetros como el índice de dispersión, índice de agregación, dependencia espacial e intensidad de agregación, etc., estos definen el tamaño, localización y forma de agregados de plantas con algún atributo poblacional, permiten

identificar el grado de dependencia espacial que se establece entre plantas sanas y enfermas en un área determinada. Un medio de apoyo es la elaboración de mapas bidimensionales y tridimensionales, ya que proveen de una visualización rápida de los patrones que podrían estar presentes (Zadoks y Schein, 1979).

Por lo tanto, la epidemiología es una herramienta importante en el manejo y prevención de las enfermedades, debido a que nos ayuda a entender una enfermedad en tiempo y espacio, a fin de restituir el balance en un sistema agrícola.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la zona de muestreo

En julio 2009 se realizó un recorrido en los municipios Vista Hermosa y Yurécuaro, Michoacán. Se seleccionaron áreas con cultivares de chile, principalmente tipo jalapeño y poblano, que en ciclos de cultivo anteriores presentaron síntomas típicos del variegado similar a los asociados por *Ca. Liberibacter*. Se seleccionaron parcelas recién establecidas con el cultivo, cuatro parcelas en Yurécuaro, dos de chile jalapeño y dos de poblano, y una Vista Hermosa de chile poblano, la elección de cuatro zonas de muestreo en Yurécuaro fue debido a que existe mayor superficie de chile que en Vista Hermosa (Cuadro1).

Cuadro1. Localización de las parcelas muestreadas.

Número	Parcela	Municipio	Latitud y longitud	Metros sobre nivel de mar	Variedad	Fecha de siembra
1	Víctor Gutiérrez	Vista Hermosa	20° 17' 10N 102° 30' 54O	1533m	Don Matías	24 de julio
2	Javier Rico	Yurécuaro	20°17'45N 102° 17' 07O	1543m	Centella	11 de julio
3	Jesús Vega	Yurécuaro	20° 17' 27N 102° 18' 52O	1544m	Don Matías	18 de julio
4	Daniel Murillo	Yurécuaro	20° 19' 07N 102° 19' 00O	1547m	Centella	1 agosto
5	Salvador Hernández	Yurécuaro	20° 20' 05N 102° 19' 53O	1538m	Don Matías	15 de agosto

3.2 Detección de *Candidatus Liberibacter*

Con la finalidad de probar si los síntomas observados en las parcelas en Yurécuaro y Vista Hermosa se debían *Ca. Liberibacter*, se colectaron plantas de chile de las variedades Centella y Tajín con síntomas de variegado, albinismo, escaldadura, nervaduras cloróticas, y deformación de la lámina foliar. Además se realizó colecta de *Bactericera cockerelli* en las parcelas evaluadas, esto para detectar la presencia de *Ca. Liberibacter* en este insecto vector. El material colectado se trasladó al Laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta

Patógeno-Vector del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados para la realizar las pruebas pertinentes.

Con el fin de descartar la presencia de la bacteria en semilla de chile, se colectaron en Yurécuaro 10 frutos en etapa de corte de cinco plantas con síntomas de variegado y deformación de la lámina foliar de las variedades Centella y Tajín; también se incluyeron semillas cosechadas por el productor y semillas comerciales de las variedades Big-Brother, Centella y Camino Real.

La extracción de ácidos nucleicos de tejido foliar se realizó a partir de 0.3g siguiendo el método descrito por Ahrens y Seemüller (1992), de semilla se realizó a partir 0.2 g y de insecto se hizo tomando un individuo (se tomaron 100 insectos) utilizando el kit de extracción de Qiagen®. La cantidad y calidad del DNA extraído se determinaron mediante espectrofotometría (Lambda Bio mod. 10, PERKIN ELMER®) a una absorbancia de 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, respectivamente

3.2.1 Detección de *Ca. Liberibacter* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las pruebas de PCR se utilizaron los iniciadores específicos OA2 y OI2c los cuales fueron diseñados a partir de la región 16S rDNA y que amplifican un fragmento de 1160 pb (Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD®, modelo i-Cycler con una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 30 s para la desnaturalización, 58 °C

por 30 s para la hibridación y 72 °C por 1 min para la extensión y un ciclo de 72 ° C por 10 min para la extensión final. Del producto de PCR se cargaron 5 µL en un gel de agarosa al 1% y corrieron en electroforesis a 90 volts. Una vez finalizada la corrida se procedió a teñirlo con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹ por 10 min), para finalmente analizarlo con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®). Como referencia de peso molecular se utilizó el marcador 1Kb (GIBCO BRL®).

Los productos de PCR obtenidos de las amplificaciones de semilla, tejido e insecto se limpiaron con el kit wizard (PROMEGA®), se realizó secuenciación de nucleótidos de la región 16S rDNA amplificada de DNA de insectos, ésta se realizó con un secuenciador automatizado (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, APPLIED BIOSYSTEM®). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las disponibles en el GenBank, utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

4.3 Análisis espacio-temporal del variegado del chile intra-parcela.

Con el propósito de conocer la enfermedad en su dimensión temporal y espacial se eligieron tres parcelas en Yurécuaro y una en Vista Hermosa cada una compuesta por tres unidades experimentales llamadas cuadrantes de cinco surcos cada uno con dos hileras de cultivo. En cada hilera se contó 30 plantas de manera unidireccional y consecutiva, obteniendo 300 plantas por cuadrante. Cada cuadrante fue considerado una repetición.

Para comparar el progreso temporal de la enfermedad, en una parcela de Yurécuaro se seleccionaron tres surcos aleatoriamente, cada surco con dos hileras y conteniendo 60 plantas teniendo un total de 180 plantas. Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad a intervalos de dos semanas y se registraron en un libro de campo, donde se especificó fecha, nombre del evaluador, sitio experimental y observaciones; en observaciones se consideró la presencia del insecto vector, plantas muertas o agente climático que pudiera haber alterado los resultados (granizo o helada). La incidencia se evaluó como la proporción de plantas que manifestaban síntomas del variegado. Para determinar la severidad de la enfermedad, se definió una escala ordinal arbitraria con seis clases, en donde la clase 0 representó el tejido foliar asintomático, mientras que la clase 5 tuvo la superficie foliar con clorosis, además de acortamiento de entrenudos, ésta fue definida con base en el desarrollo de los síntomas en campo. A cada clase se le asignó un porcentaje de daño; sin embargo para fines de análisis se consideró el punto medio de cada categoría (Cuadro 2). Para verificar el porcentaje de clorosis visualmente, se hizo un programa en Visual Basic ver. 6.0 con un clasificador de píxeles de imágenes digitales en formato jpg y con iluminación difusa. Para esto, se obtuvieron muestras de píxeles, unidades básicas de una imagen, en tres categorías: fondo de la imagen, superficie verde de la planta, y superficie dañada o clorótica de la planta, que a su vez fueron las clase 1 a 3 las que podía tomar la variable de salida del clasificador. Las variables de entrada del clasificador fueron cada uno de los tres canales del modelo de color RGB. Después con 2909 juegos de datos salida (una variable) entrada (tres variables), se

entrenó el clasificador con una red neuronal artificial mediante la estrategia genética con el programa Neuroshell Classifier® de Al Trilogy (Ward Systems Group, Inc). Este clasificador asignó correctamente 97.5 % de los píxeles a las tres categorías de salidas definidas, donde 91.8 % y 99 % de los píxeles pertenecían a la clase verde y clorótica de la planta fueron clasificados correctamente. Al evaluar en campo con la escala arbitraria se registraba clorosis en las planta, considerando el área que abarcaba, aunque en esta área estimada no existiera clorosis en su totalidad. El número de evaluaciones realizadas en cada parcela fue variable, debido a que cuando se le dio seguimiento a la enfermedad del variegado, las plantaciones disponibles variaban en fecha de su establecimiento en campo (Cuadro 1).

Cuadro 2.- Conversión de escala ordinal a punto medio de daño en porcentaje.

Clase	Daño	Porcentaje (%)	Punto medio
0	Asintomática	0%	0%
1	1er. Tercio superior con clorosis	0.1-20%	10%
2	1er y 2do tercio superior con clorosis	20.1-40%	30%
3	Clorosis completa	40.1-60%	50%
4	Clorosis completa y ligero achaparramiento	60.1-80%	70%
5	Clorosis y achaparramiento completo	80.1-100%	90%

Para el estudio epidemiológico en su dimensión espacial en cada cuadrante se hicieron mapas bidimensionales y tridimensionales que se elaboraron con el software Surfer® v.6. Después se analizó la matriz de datos para ver su tipo de distribución con los índices de distribución de Morisita (I_g) y Lloyd (LIP) en los cuadrantes evaluados de la parcela 2, además se calcularon los mismos índices usando el método de Greig-Smith (1952) ajustado (Campbell y Madden, 1990), y se estimó el tamaño óptimo del cuadrante (TOC).

3.4 Análisis regional del variegado del chile.

Con fines de comparar en cuanto análisis espacial de la enfermedad entre las parcelas que se les dio seguimiento en el ciclo de cultivo, se realizó un análisis espacial en 10 parcelas de chile, poblano, jalapeño y chilaca, ubicadas en la zona productora de Yurécuaro, las cuales se geoposicionaron y en cada una se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad en un sólo cuadrante de 20x20 plantas, por lo que se tuvo 400 plantas por parcela. Este muestreo se realizó al final del ciclo de cultivo (Cuadro 3 y Figura 1). Las evaluaciones se realizaron con el mismo tipo de escala arbitraria establecida en campo usada en el estudio de distribución espacial intra-parcela.

Cuadro 3. Localización de las parcelas de muestreo regional.

Parcela	Latitud y longitud	Metros sobre nivel del mar	Variedad
1	20° 19' 16N 102° 16' 24O	1538m	Cayenes
2	20° 19' 15N 102° 16' 23 O	1538m	Caloro
3	20° 19' 12N 102° 16' 22O	1543m	Chilaca Anajay
4	20° 19' 12N 102° 16' 22O	1543m	Centella
5	20° 19' 15N 102° 16' 23O	1543m	Jalapeño Pitón
6	20° 19' 28N 102° 16' 31O	1544m	Centella
7	20° 19' 54N 102° 18' 34O	1540m	Chile Poblano
8	20° 19' 54N 102° 18' 33O	1535m	Centella
9	20° 18' 42N 102° 19' 52O	1535m	Don Matías
10	20° 19' 38N 102° 19' 14O	1534m	Centella

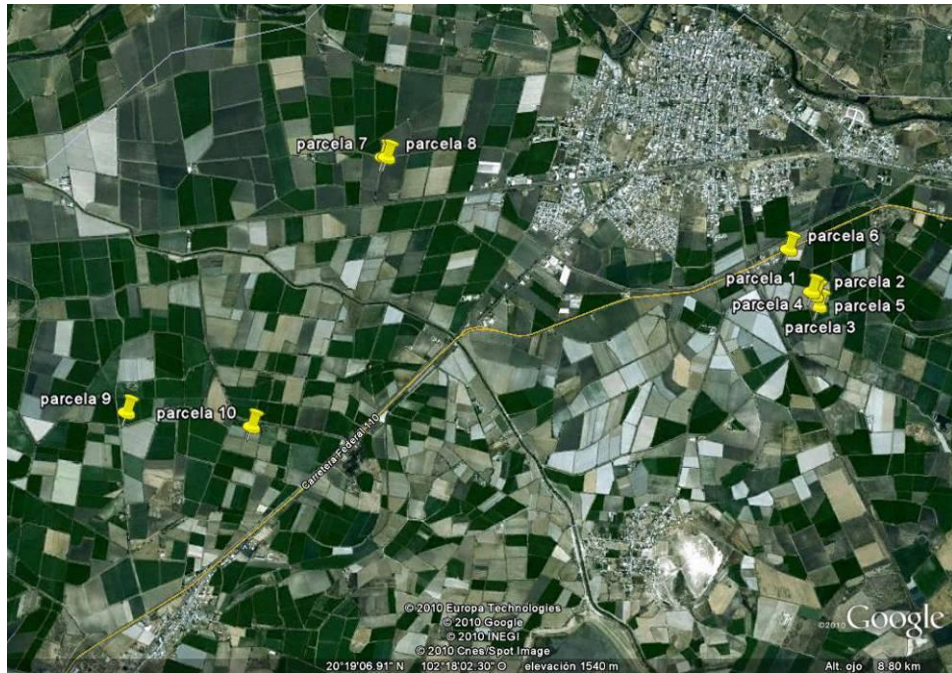


Figura 1.- Geoposición de las parcelas para el estudio de distribución regional.

3.6 Dinámica de *Bactericera cockerelli*

Con la finalidad de verificar la correlación entre la dinámica poblacional de *Bactericera cockerelli* y la incidencia y severidad del variegado de chile, se realizaron muestreos de este insecto en las parcelas 2 y 5 en Yurécuaro. Se atraparon los insectos con una charola cubierta de aceite, golpeando 10 plantas de chile unidireccionalmente hacia la charola, la dinámica de población de *B. cockerelli* se estimó en el mismo periodo en que se evaluó la epidemia del variegado. Los datos se graficaron y se compararon con la incidencia del variegado en la parcela correspondiente donde se realizó la evaluación.

3.7 Análisis de datos

Los datos de incidencia y severidad (con base en el punto medio) se usaron para construir curvas de progreso de la enfermedad en el tiempo. Posteriormente, con el fin de conocer si alguno de los modelos epidemiológicos (Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz) describía, la epidemia, dichos modelos se ajustaron a los datos de incidencia y severidad. El modelo de mejor ajuste fue aquel que tuvo el coeficiente de determinación (R^2) más alto y un patrón de residuales al azar. La posible descripción de la epidemia por alguno de los modelos mencionados sería un indicador del proceso biológico que explicaría el desarrollo de la epidemia. Así mismo, para conocer la relación entre los niveles poblacionales de *B. cockerelli* y la incidencia de la enfermedad en campo, se realizó un análisis de correlación de Pearson para las variables, número de insectos por charola, incidencia del variegado, temperatura media y dirección del viento. Los datos obtenidos en el caso de viento, temperatura media, fueron promedios de cada semana en que se realizó la evaluación, estos datos se obtuvieron de la estación meteorológica de Sartenejo, ubicada en Yurécuaro, Michoacán. Los ajustes de los modelos y los análisis de correlación se realizaron con el paquete estadístico SAS 9® y Minitab 12 ® respectivamente.

IV.RESULTADOS

4.1 Detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* por PCR

Las muestras de plantas colectadas con síntomas de *Ca. Liberibacter* fueron analizadas para *Ca. Liberibacter solanacearum* (Figura 2). Todas las muestras que mostraban síntomas de variegado, deformación de hojas y clorosis, resultaron positivas a la bacteria (Figura 3).



Figura 2.- Síntomas asociados a *Ca. Liberibacter* en plantas de chile en Yurécuaro Mich, 2009.

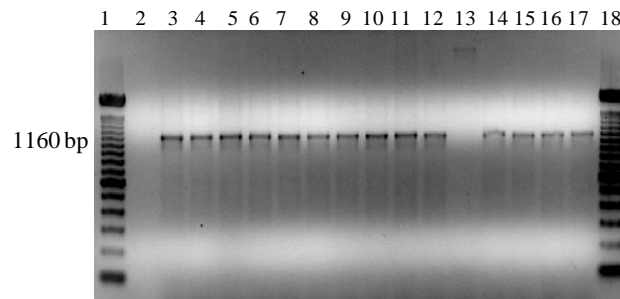


Figura 3.- Reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores OA2 y OI2c en plantas de *Capsicum annuum* L. con diferentes síntomas. Carril 1 y 18 Marcador molecular 100 bp (Invitrogen®); Carril 2, Planta asintomática (testigo) de *Capsicum annuum* L.; Carril 3, Hoja con albinismo; Carril 4, Hoja con variegado; Carril 5, Hoja con Variegado y venas amarillas; Carril 6, Hoja con Escaldadura; Carril 7, Hoja con ampollamiento y deformación de la lámina foliar; Carril 13, Negativo (agua inyectable estéril).

Se detecto la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* en semillas obtenidas de frutos cosechados de plantas manifestando síntomas de variegado, acortamiento de entrenudos, clorosis, etc., en todas las muestras procesadas (Cuadro 4, Figura 4). Con respecto a las muestras procesadas de insectos, una resultó negativa a *Ca. Liberibacter solanacearum*. Al comparar las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir del fragmento amplificado de ADN del insecto con las secuencias de nucleótidos depositadas en el GenBank, se obtuvo un 98% de similitud con los nucleótidos del genoma de *Ca. Liberibacter solanacearum* existentes en el GenBank. Esta comparación se realizó utilizando el programa Basic Local Alingment Search Tool (BLAST).

Cuadro 4. Semillas procesadas para *Ca. Liberibacter*.

Pozo	Semilla
1	Chile jalapeño centella (CII1)
2	Chile jalapeño centella (CII2)
3	Tajín (Ta1)
4	Tajín (Ta2)
5	Chile Ancho procesada por productor (Ap1)
6	Chile Ancho procesada por productor (Ap2)
7	Semilla “Big-Brother” (Bg1)
8	Semilla “Big-Brother”(Bg2)
9	“Camino real” (Cr)

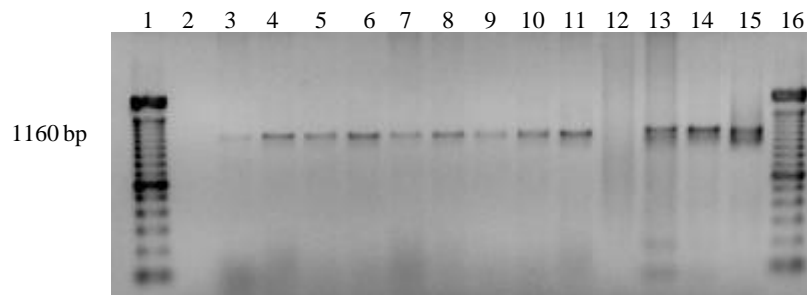


Fig.4.- Reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores OA2 y OI2c en semillas de chile e insectos. Carril 1 y 16 Marcador molecular 100 bp (invitrogen®); carril 2, negativo; carril 3 a 11 semillas de chile, carril 12 a 14 insecto; carril 15, control positivo.

4. 2 Distribución espacio temporal intra-parcela

En los primeros cuatro muestreos se presentaron plantas muertas por efecto de factores distintos a la bacteria, por lo tanto se registraron con un punto en el libro de campo y se consideraron como valores perdidos. En la parcela 2 ubicada en Yurécuaro se presentó mayor progreso de la epidemia, (93.95 % incidencia), que en la parcela 5 en Yurécuaro, donde la máxima incidencia en cuadrante fue de 3.66 durante el ciclo de cultivo.

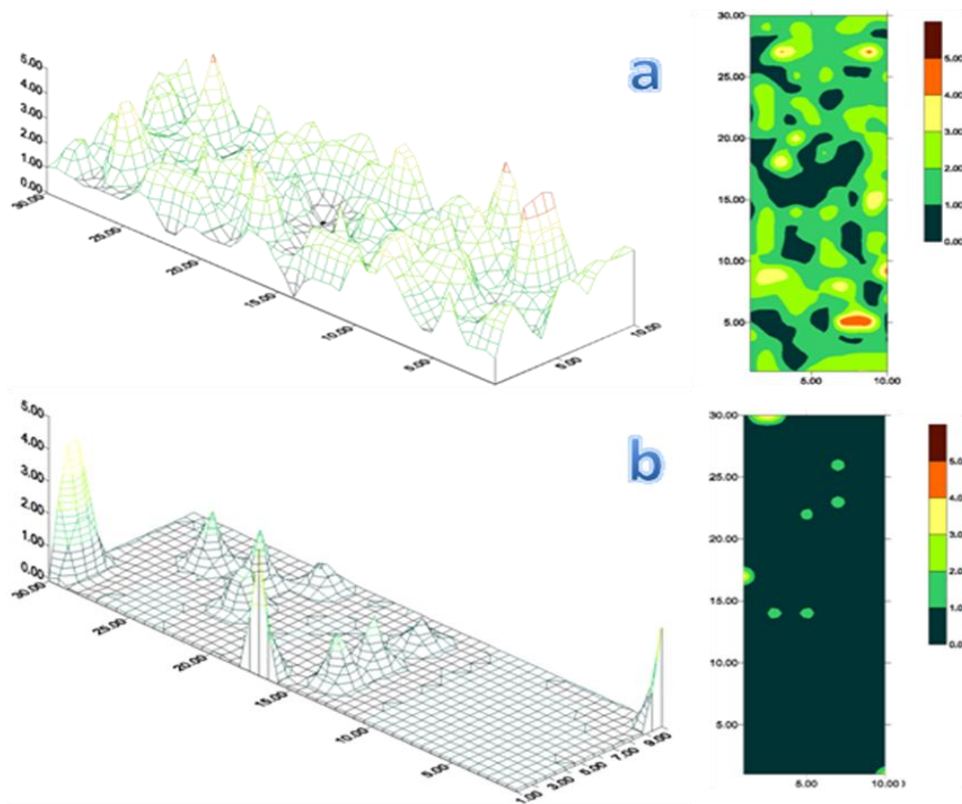


Figura 5.- Mapa bidimensional y tridimensional donde se observa la distribución de la enfermedad en la evaluación de 14 de noviembre del 2009: a) parcela 2, b) parcela 5.

4.3 Análisis temporal de la epidemia

La epidemia sólo presentó un progreso notable en la parcela 2 en Yurécuaro con la variedad Centella. En Vista Hermosa en la parcela 1, la enfermedad progresó en la variedad Don Matías, esto no se observó en Yurécuaro en la misma variedad. Además la parcela 4 con la variedad Centella no presentó incidencia alta de la bacteria, incluso con poblaciones elevadas de *B. cockerelli*. En estas parcelas donde no avanzó la enfermedad, los síntomas no presentaron un nivel elevado de daño, es decir sólo hasta una clase 3 en la escala arbitraria establecida en campo.

En algunas parcelas sólo hubo 6 evaluaciones debido a que cuando se inició el muestreo las plantas se encontraban en etapas fenológicas avanzadas. En otras, no se continuó la evaluación debido a que las plantas estaban enfermas por hongos y algunas se perdieron.

En la parcela 2 de Javier Rico se obtuvo el mayor porcentaje de severidad estimado, mientras que la parcela 4, con la misma variedad Centella y en Yurécuaro, no presentó un porcentaje elevado de incidencia y severidad.

Con respecto a la incidencia del insecto, se observó que en la parcela 2, fue mayor, obteniéndose una media de 222.25 insectos en las charola muestreada, mientras que en la parcela 5 ubicada también en Yurécuaro, la incidencia del insecto vector fue mínima teniendo una media de 3 insectos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Incidencia del insecto vector en las parcelas muestreadas.

Fecha de evaluación	Incidencia de <i>B. cockerelli</i> en parcela 2	Incidencia de <i>B. cockerelli</i> en parcela 5
04-sep	1	0
18-sep-09	1	1
2-3-oct-09	14	1
16-17-oct-09	71.75	1
30-31-oct-09	156	3
13-14- Nov-09	222.25	0

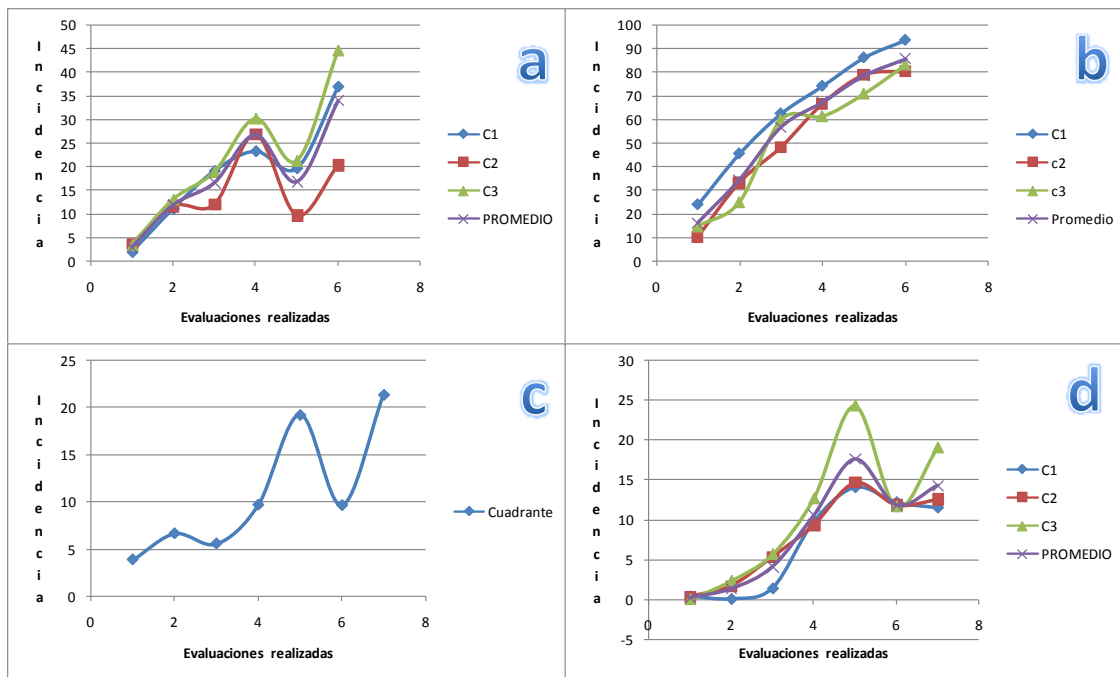


Figura 6.- Incidencia de plantas con síntomas asociado a *Ca. Liberibacter solanacearum* en las parcelas de los productores: a) Víctor Gutiérrez, b) Javier Rico, c) Jesús Vega, d) Daniel Murillo.

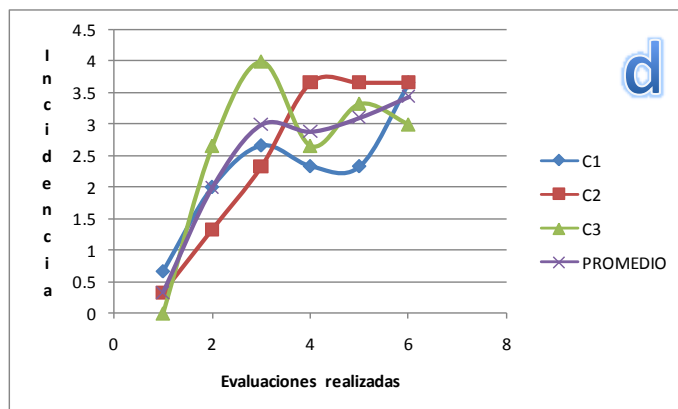


Figura 6.- (Continuación).- Graficas de incidencia de la enfermedad: e) Salvador Hernández.

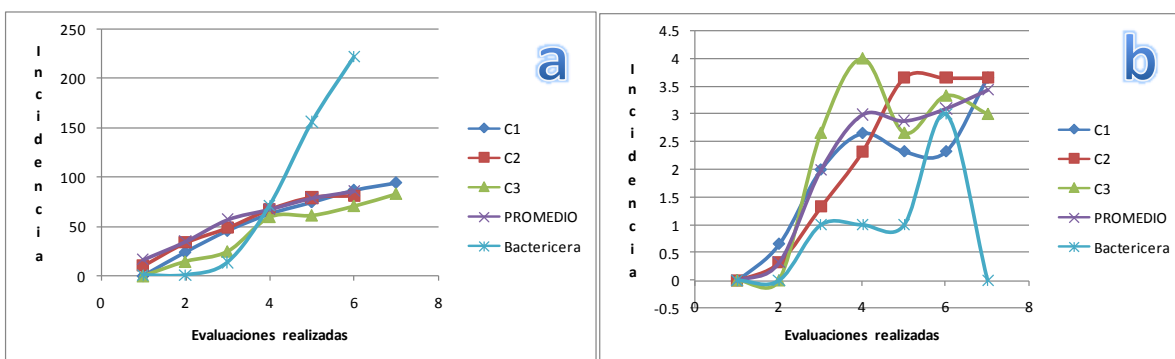


Figura 7.- Graficas de incidencia del variegado y la dinamica poblacional de *B. cockerelli* en las parcelas de: a) Javier Rico, b) Salvador Hernández.

La incidencia del variegado en las parcelas de Javier Rico y Salvador Hernández inició antes de que existiera una población elevada del insecto vector (Figura 7). La incidencia se incrementó de manera proporcional en la parcela que tuvo mayor desarrollo de la epidemia, en comparación con las parcelas con incidencia baja de plantas con síntomas de variegado.

La grafica que se tomó para describir el modelo de ajuste de la epidemia fue de la parcela 2. Sólo en ésta se describe una curva de progreso de la enfermedad en comparación con las otras parcelas en donde no se observó un incremento notable de la epidemia (Figura 8).

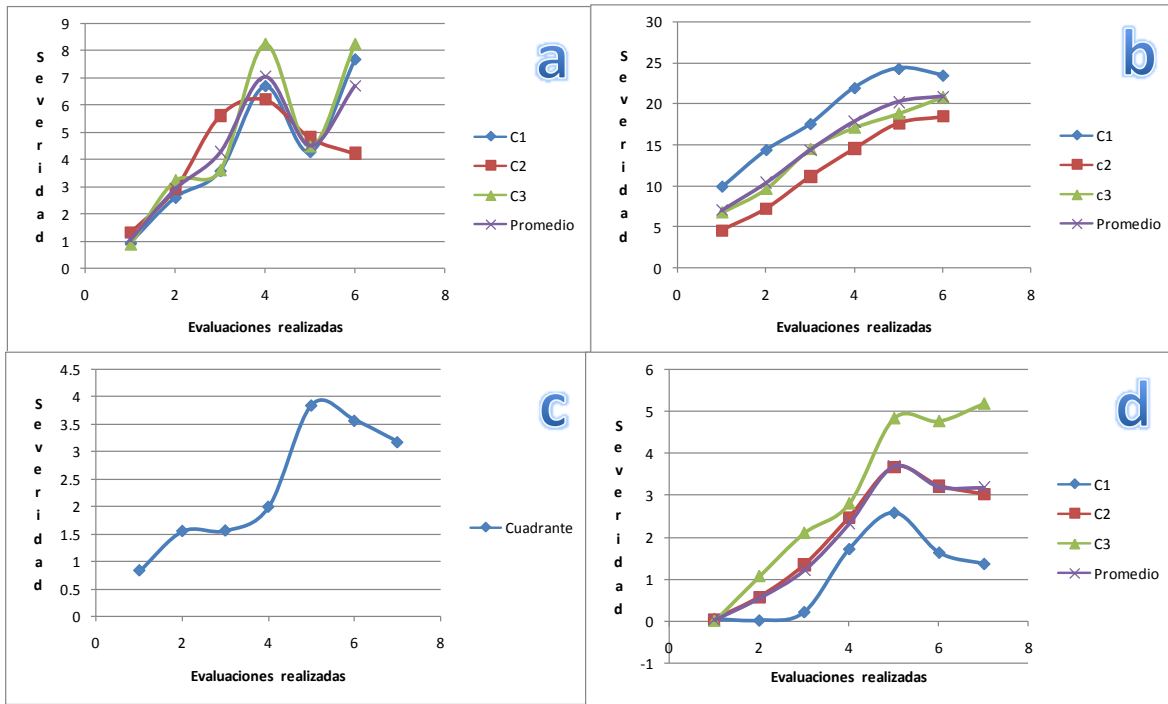


Figura 8.- Gráficas de severidad de la enfermedad de acuerdo a la conversión de punto medio de la escala ordinal establecida en campo: a) Víctor Gutiérrez, b) Javier Rico, c) Jesús Vega, d) Daniel Murillo.

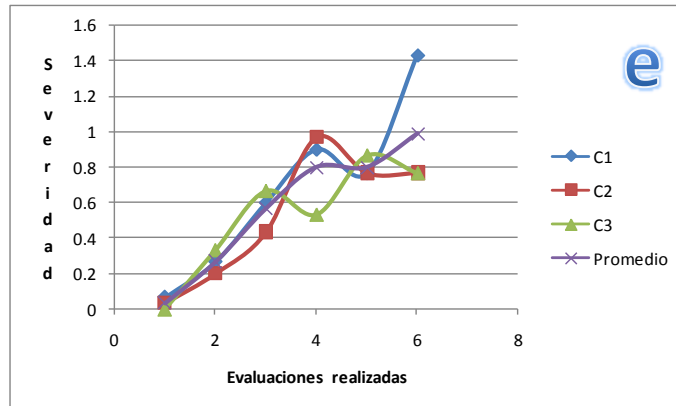


Figura 8.- (Continuación).- Gráficas de severidad de la enfermedad de acuerdo a la conversión de punto medio de la escala ordinal establecida en campo: e) Salvador Hernández.

Con respecto a la severidad, está fue graficada de acuerdo con la conversión de punto medio realizada de los datos de cada parcela.

El análisis temporal se realizó con los resultados de incidencia y severidad de la parcela 2 (Yurécuaro), cultivada con chile jalapeño de la variedad centella. La epidemia se ajustó al modelo logístico, $y=1/\{1+\exp [-a+kt]\}$, obteniéndose un r^2 aceptable que va de 0.9360 a 0.9920 (Cuadro 6, Anexo 1). No se logró ajustar el modelo logístico a los datos de las demás parcelas porque no presentaron una curva típica de incremento de la enfermedad.

Cuadro 6.- Modelo logístico para incidencia y severidad de los cuadrantes de la parcela 2 en Yurécuaro, Michoacán.

Cuadrante	Formula	r^2	rL (sig)	SME
	$y=1/\{1+\exp [-a+kt]\}$			
Incidencia Promedio	$y=1/(1 +\exp (-0.088221+ 0.965566 (t)))$	0.9920	0.0001	0.000773
Severidad Promedio	$y=1/(1 +\exp (-0.159644 + 0.854686 (t)))$	0.9863	0.0003	0.000981

R^2 coeficiente de determinación; rL, estimador de tasa de modelo logístico; SME, suma de cuadrados de error.

Al comparar el área bajo la curva, se observo que la parcela 2 (Javier Rico) es la que tiene mayor área, seguido por la parcela 1 (Víctor Gutiérrez), estas fueron de dos variedades distintas, jalapeño Centella y poblano Don Matías respectivamente. En las otras parcelas que se contaban con estas mismas variedades el área bajo la curva fue mínima, incluso en la parcela 4 (Daniel Murillo) ubicada en Yurécuaro, no mostró un área bajo la curva significativa, siendo de 14.36 y 175.33 en incidencia y severidad respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Estimación de área bajo la curva e incidencia y severidad final en las parcelas evaluadas.

Parcela	Municipio	Incidencia Final	ABCPE	Severidad Final	ABCPE
Víctor Gutiérrez	Vista Hermosa	33.98	1270.33	6.71	316.17
Javier Rico	Yurécuaro	85.96	4094.67	20.94	1089.10
Daniel Murillo	Yurécuaro	14.36	739.33	3.18	175.33
Salvador Hernández	Yurécuaro	3.44	182.60	0.98	43.06

ABCPE, área bajo la curva del progreso de la epidemia.

El estudio de correlación indica que no existe correlación significativa del variegado con la densidad de *B. cockerelli*, velocidad media del viento y temperatura (Figura 9).

Correlación incidencia de parcela 2 Javier Rico

	Tiempo	C1	c2	c3	Promedio	Bactericera	Temp
C1	0.985 0.000**						
c2	0.975 0.001**	0.995 0.000**					
c3	0.960 0.002**	0.974 0.001**	0.957 0.003**				
Promedio	0.981 0.001**	0.998 0.000**	0.992 0.000**	0.985 0.000			
Bactericera	0.940 0.005*	0.871 0.024	0.856 0.029	0.835 0.039	0.861 0.028		
Temp	-0.822 0.045*	-0.725 0.103	-0.708 0.115	-0.663 0.151	-0.704 0.118	-0.961 0.002**	
Viento	-0.585 0.223	-0.506 0.306	-0.488 0.326	-0.489 0.325	-0.498 0.315	-0.624 0.185	0.551 0.257

Correlación severidad de parcela 2 Javier Rico

	Tiempo	C1	c2	c3	Promedio	Bactericera	Temp
C1	0.958 0.003**						
c2	0.988 0.000**	0.986 0.000**					
c3	0.984 0.000**	0.979 0.001**	0.992 0.000**				
Promedio	0.981 0.001**	0.993 0.000**	0.997 0.000**	0.995 0.000**			
Bactericera	0.940 0.005*	0.830 0.041	0.902 0.014	0.872 0.023	0.872 0.023		
Temp	-0.822 0.045	-0.675 0.141	-0.763 0.077	-0.713 0.112	-0.720 0.106	-0.961 0.002*	
Viento	-0.585 0.223	-0.459 0.360	-0.514 0.297	-0.539 0.270	-0.506 0.306	-0.624 0.185	0.551 0.257

Figura 9.- Análisis de correlación para parcela 2 donde hubo progreso de la enfermedad, donde se observa la significancia de las variables evaluadas, ** Altamente significativa, *significativa.

El progreso de la epidemia en la parcela 2 (Yurécuaro), fue mayor en las evaluaciones 1 y 2, con una incidencia de 24 y 45 % respectivamente, aún cuando fue mínima la presencia del insecto vector (media de 1) (Figura 7). Con respecto a la severidad, fue 9.8 y 14 % en las primeras dos evaluaciones.

4.4 Análisis espacial de la epidemia

Con respecto a la incidencia, los índices de Morisita y Lloyd indicaron que la distribución de la enfermedad fue uniforme (0 a 0.98). Cabe mencionar que la presencia de *B. cockerelli* fue mínima en las primeras dos evaluaciones, la enfermedad no estuvo distribuida en agregados y por tanto se especula que no hay contagio por plantas circundantes. La estimación óptima del cuadrante fue de 64 en todos los cuadrantes en las distintas evaluaciones. Considerando que estas últimas evaluaciones tenemos una amplia distribución de la enfermedad, aunque empezó a decrecer la población de plantas por enfermedades causadas por hongos, que no eran el objetivo de la investigación (Cuadro 8,9, 10).

Cuadro 8. Índices de agregación para cuadrante 1

Ev	Incidencia						Severidad			
	Ig	LIP	TOC	Greig-Smith			LIP	TOC	Greig-Smith	
				Ig	LIP	Ig			Ig	LIP
1	0	0.01	64	0.96	0.95	3.04	3.04	64	1	1.01
2	0.09	0.09	64	0.97	0.96	1.65	1.65	64	0.99	0.99
3	0	0	64	0.98	0.97	1.23	1.23	64	1.01	1.01
4	0	0	64	0.98	0.98	1.02	1.01	64	1.01	1.02
5	0	0	64	0.98	0.98	0.90	0.89	64	1	1
6	0	0	64	0.98	0.98	0.92	0.86	64	1	1

Ig, Índice de agregación Morisita; LIP, índice de agregación de Lloyd; TOC, tamaño óptimo de cuadrante.

Cuadro 9. Índices de agregación para cuadrante 2

Incidencia			Severidad							
Ev	Ig	LIP	Greig-Smith				Greig-Smith			
			TOC	Ig	LIP	Ig	LIP	TOC	Ig	LIP
1	0	0.02	64	0.96	0.94	7.31	7.25	64	1.02	1.04
2	0	0	64	0.97	0.95	3.06	3.05	64	0.99	0.99
3	0	0	64	0.99	0.99	1.67	1.67	64	1.02	1.03
4	0	0	64	0.99	0.98	1.23	1.23	64	1.01	1.01
5	0	0	64	0.98	0.97	0.89	0.86	64	0.99	0.99
6	0	0	64	0.99	0.99	0.93	0.81	64	1	1.01

Ig, Índice de agregación Morisita; LIP, índice de agregación de Lloyd; TOC, tamaño óptimo de cuadrante.

Cuadro 10. Índices de agregación para cuadrante3

Incidencia			Severidad							
Ev	I _g	LIP	Greig-Smith				Greig-Smith			
			TOC	I _g	LIP	I _g	LIP	TOC	I _g	LIP
1	0	0.01	64	0.95	0.94	4.99	4.97	64	1.04	1.06
2	0	0	64	1	1	3.22	3.21	64	1.08	1.13
3	0	0	64	0.98	0.98	1.43	1.43	64	1.03	1.05
4	0	0	64	0.98	0.98	1.24	1.23	64	1	1
5	0	0	64	0.98	0.98	1.09	1.08	64	0.99	0.99
6	0	0	64	0.99	0.98	0.99	0.94	64	0.99	0.99

I_g, Índice de agregación Morisita; LIP, índice de agregación de Lloyd; TOC, tamaño óptimo de cuadrante.

En la Figura 10 se observan los mapas bidimensionales y tridimensionales del cuadrante 1 de la parcela 2, donde hubo mayor incidencia de la enfermedad, las elevaciones rojas indican el nivel más alto de severidad. En el tiempo 3 de evaluación se observó una amplia distribución de la enfermedad con dominancia de las clase 1, 2, 3; en el tiempo 4 se observaron plantas con clase 4 y 5 lo que indica un nivel alto de severidad, aunque fue mínimo el número de plantas en estas clases.

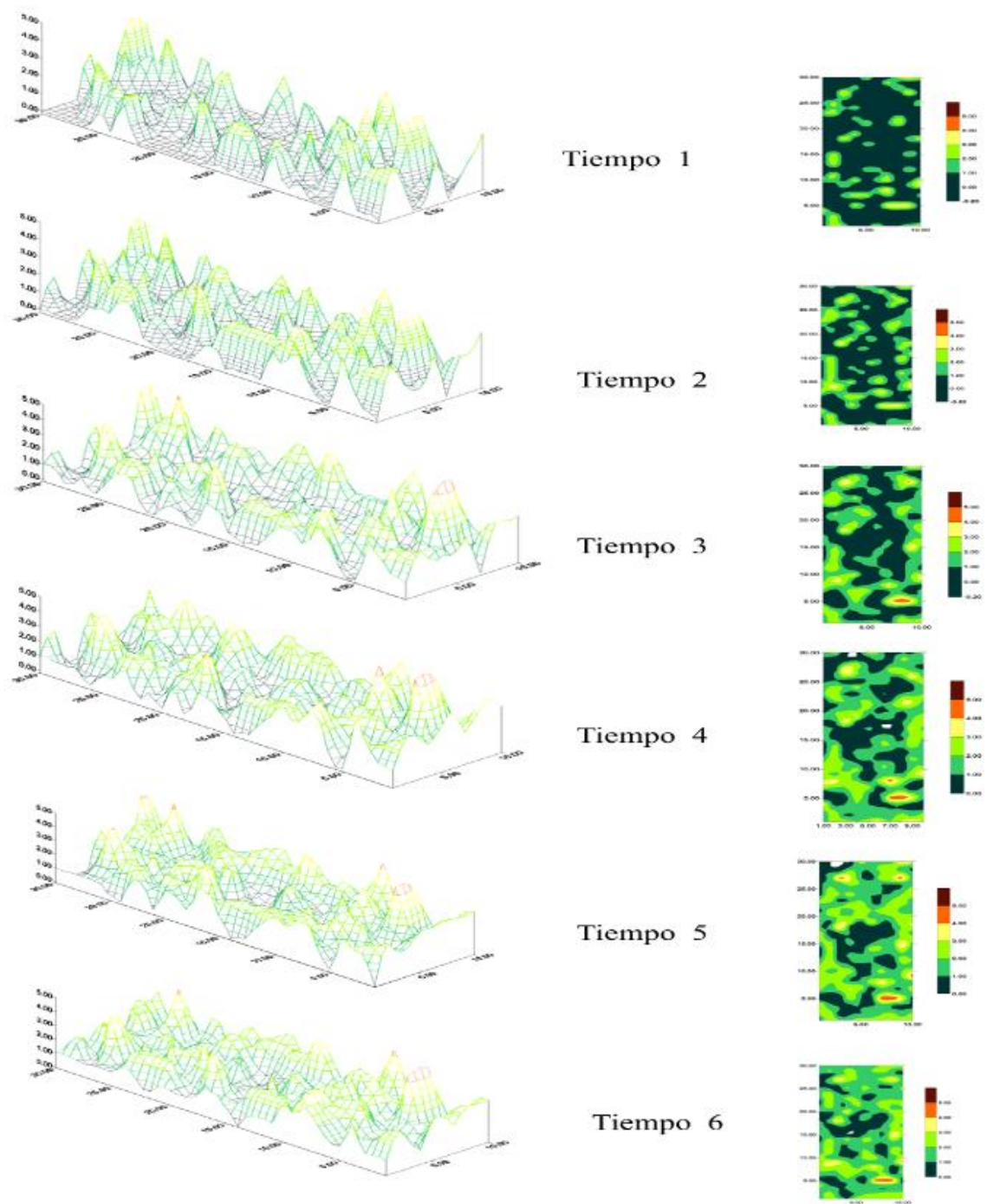


Figura 10.- Mapas bi y tridimensionales del cuadrante 1 de la parcela donde hubo mayor incidencia de la enfermedad.

4.6 Distribución Regional

Se evaluaron parcelas con fines de realizar mapas bidimensionales y tridimensionales para observar la distribución espacial principalmente en jalapeño variedad Centella y poblano variedad Don Matías, estas parcelas estaban ubicadas en Yurécuaro, y contaban con alta incidencia de *B. cockerelli*. Las parcelas 1 a 4 de muestreo regional mostraron alta incidencia y severidad final de la enfermedad, estas estaban juntas. En las parcelas 6 a 9 no hubo alta incidencia de la enfermedad, la 6 y 8 eran de la variedad centella, pero a diferencia de las primeras parcelas no existió alta incidencia del variegado, en cambio en la parcela 10 que es de la misma variedad la incidencia fue mayor. En todas había alta densidad poblacional del insecto vector.

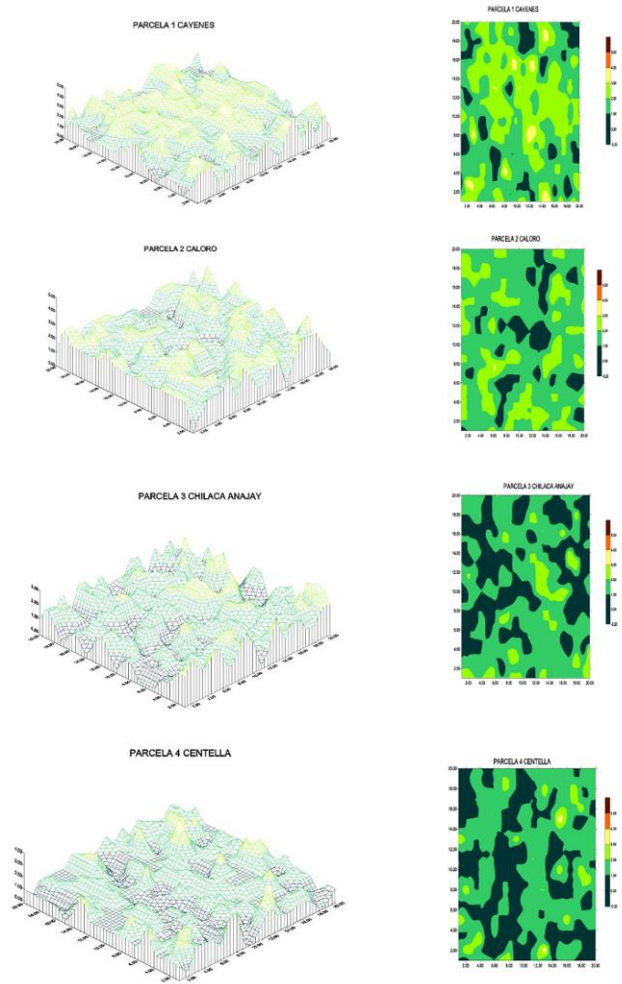


Figura 11.- Mapas realizados del muestreo regional en las 10 parcelas evaluadas.

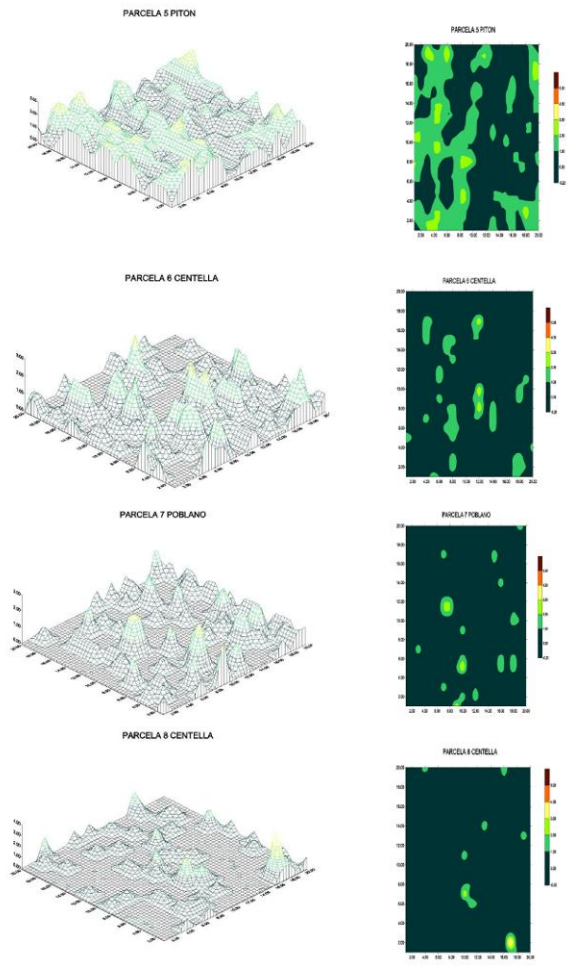


Figura 11.- Continuación. Mapas realizados del muestreo regional en las 10 parcelas evaluadas.

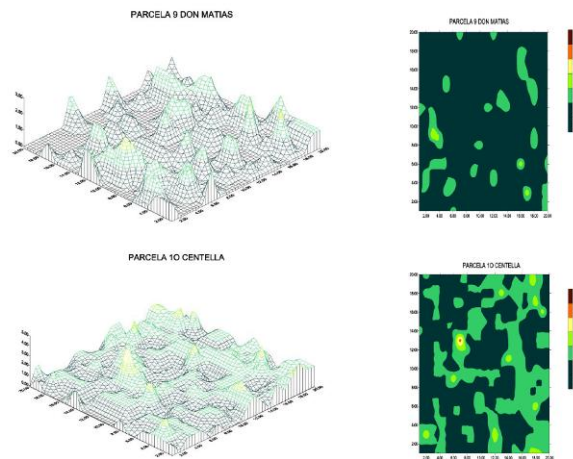


Figura 11.- Continuación. Mapas realizados del muestreo regional.

En todas las parcelas de distribución regional se obtuvo un índice de agregación uniforme con respecto a la incidencia, cabe mencionar que el cultivo estaba es su etapa final, por tanto los síntomas estaban ampliamente distribuidos, a excepción de la parcela 6, 7 y 8, donde se obtuvo un índice de agregación uniforme a pesar de que no hubo incidencia alta del variegado (Cuadro 11).

Cuadro 11.- Índice de agregación para parcelas de muestreo regional.

Parc	Incidencia						Severidad				
	I _g	LIP	TOC	Greig-Smith		I _g	LIP	Greig-Smith		I _g	LIP
				I _g	LIP			I _g	LIP		
1	0	0	32	0.98	0.98	0.68	0.68	32	1	1	
2	0	0	32	0.98	0.98	0.59	0.59	32	0.99	0.99	
3	0	0	32	1	1	0.67	0.67	32	1.01	1.02	
4	0	0	32	0.98	0.98	0.52	0.52	32	0.99	0.99	
5	0	0	32	1	1	0.71	0.71	32	1.09	1.12	
6	0	0	32	0.92	0.91	1.58	1.57	16	1.01	1.01	
7	0	0.01	16	0.96	0.96	2.02	2.01	16	1.08	1.09	
8	0	0.01	16	0.93	0.92	3.65	3.61	16	1.02	1.02	
9	0	0	16	1	1	1.57	1.57	16	1.07	1.07	
10	0	0	32	0.98	0.98	0.55	0.55	16	0.98	0.98	

En el muestreo regional algunas parcelas no presentaron alta incidencia de la enfermedad al final del ciclo de cultivo, lo que guarda relación con las parcelas evaluadas para análisis espacial y temporal, en donde sólo una de la variedad centella presentó alta incidencia de

síntomas. En el muestreo regional las parcelas con la variedad centella la distribución de la enfermedad fue mínima a pesar que las poblaciones del insecto vector eran altas.

4. 7 Uso de software para comparación de escala ordinal

Con respecto al procesamiento de imágenes para comparar las clases, este se realizó de fotos tomadas en parcelas, el programa consiste en separar por color las áreas dañadas, la estimación del porcentaje de área con clorosis, así mismo se obtuvo en las plantas clasificadas en la clase 3, la clorosis cubrió 41% de su superficie, lo que confirma que bajo esta clase, tiene clorosis que abarca todo los tres tercios de la planta, pero no los cubre en su totalidad. Con respecto a las clases 4 y 5, la clorosis no es un buen criterio de clasificación de acuerdo con el software usado, ya que es parcial y hay otros síntomas como achaparramiento de las plantas, deformación de hojas, y baja productividad. En la clase 5 se agruparon las plantas con una altura menor de 30cm y un nivel casi nulo de productividad, mientras que en la clase 4 se agruparon aquellas con la mitad de altura en comparación con una planta sana. (Figura 12, Cuadro 12).

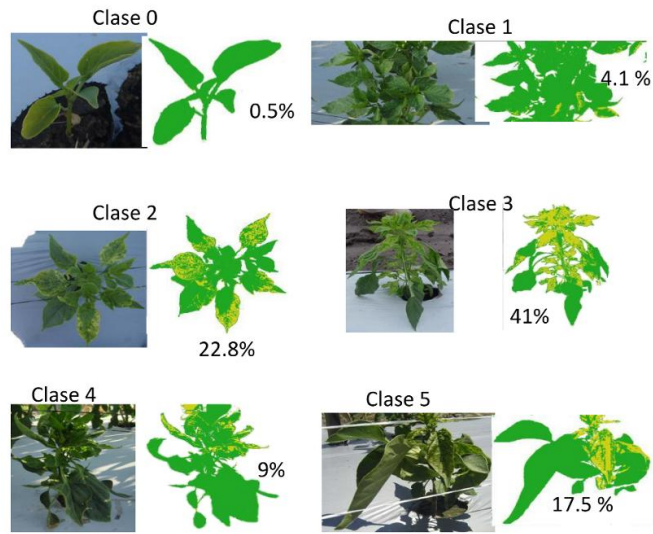


Figura 12.- Estimación del porcentaje clorótico de plantas clasificadas de acuerdo a la escala arbitraria establecida en campo.

Cuadro 12. Porcentaje de clorosis estimado en las clases evaluadas.

Foto	% área verde	% área clorótica
Clase 0	99.5	0.5
Clase 1	95.9	4.1
Clase 2	77.2	22.8
Clase 3	59	41
clase4	91	9
clase5	82.5	17.5

V. DISCUSIÓN

Los síntomas inducidos por *Ca. Liberibacter solanacearum* en el cultivo de chile en Yurécuaro, Tanhuato y Vista Hermosa, Michoacán son diferentes de aquellos reportados en Nueva Zelanda en la misma hortaliza, esto posiblemente se deban a que se trata de diferentes cultivares, ya que la sintomatología puede variar dependiendo del hospedante. Los síntomas observados en las plantas de chile de Michoacán son muy parecidos a los reportados para cítricos: moteado, venas cloróticas, deformación del fruto, y semillas atrofiadas mostrando una coloración café (Garnier *et al.*, 2000; Khairulmazmi *et al.*, 2008 y da Graca *et al.*, 2004).

La llegada de *B. cockerelli* después del tiempo de inicio de la epidemia, se vio reflejada en la baja de correlación entre las variables de severidad e incidencia del variegado. El progreso de la enfermedad en su dimensión temporal posiblemente se mostró influenciado por la transmisión de *Ca. Liberibacter solanacearum* mediante semilla, debido a que se tuvo una incidencia de 24 % al inicio de las evaluaciones y como incidencia final fue 93.95% en el cuadrante 1 de la parcela 2. El progreso temporal de la enfermedad en ésta parcela evidenció diferencia con las otras parcelas evaluadas, donde no se observó similitud en la incidencia. El modelo matemático que ajusta la epidemia es el Logístico, de acuerdo con Madden y Campbell (1990), este modelo es propio de epidemias policíclicas, aunque en esta investigación no se presentaron varios ciclos de infección, por tanto este fenómeno epidemiológico pudo haber sido afectado por la transmisión por semilla de *Candidatus*

Liberibacter solanacearum y por la llegada de *B. cockerelli* como vector y dispersor de la bacteria.

Respecto a la distribución espacial, la epidemia reflejó un índice de agregación de tipo uniforme, que es considerado poco común en relación a estudios realizados en patosistemas, en estos sistemas donde la enfermedad es transmitida por insectos (Ord, 1982), existe el principio de contagio, y se espera comúnmente una distribución en agregados. En este caso, se conoce que *B. cockerelli* es el insecto vector de la bacteria, pero no se encontró un patrón de distribución en agregados, si no uniforme, lo cual, podría explicarse por la transmisión del patógeno mediante la semilla, Hudelson *et al* (1996), reportan que la bacteria *Pseudomonas syringae* mostró un patrón de distribución uniforme debido posiblemente a labores culturales y la transmisión por semilla, aunque queda en discusión la influencia de este tipo de diseminación y el tipo de índice de agregación obtenido.

En el estudio de distribución regional, convendría identificar cada parcela de Chile en la región de estudio, registrar información sobre manejo agronómico y darle seguimiento al cultivo; en nuestra investigación el muestreo se hizo al final, y se desconoce tanto la situación en que estuvo la planta, como la dinámica poblacional de los insectos, Se sugiere para un estudio posterior que las parcelas estén distribuidas en todo el estado de Michoacán, con la finalidad de obtener un mejor panorama del nivel de enfermedad en cada zona evaluada. La propuesta de considerar sólo la evaluación de la superficie clorótica mediante análisis de

imágenes digitales con una cámara fotográfica no funcionó para categorizar la severidad de la enfermedad en esta investigación, debido a que la gama de síntomas inducidos por *Ca. Liberibacter solanacearum* en campo complica la toma de fotos y su evaluación con el software no es posible, ya que de cada parcela se realizan observaciones de muchas plantas, por lo tanto capturar de manera individual cada foto implica demasiado tiempo y poca exactitud, además que conforme avanza el ciclo de cultivo las plantas empiezan a juntarse con otras circundantes complicando este sistema. Este programa puede considerarse como una opción de sistema de entrenamiento previo para evaluadores, con la finalidad de obtener mayor exactitud y precisión por parte de éstos.

La introducción de *Ca. Liberibacter solanacearum* en México es incierta, la enfermedad se reportó desde el 2009, mientras que la presencia del insecto vector *B. cockerelli* asociado con su diseminación ha sido reportada en ese lugar desde 1947 (Plesch, 1947, citado por Vega *et al.*, 2008) tiempo antes de considerar a la bacteria potencialmente perjudicial en solanáceas.

En la actualidad el control de *Ca. Liberibacter solanacearum* en el cultivo de papa se ha enfocado al manejo del vector *B. cockerelli*, debido a que las liberibacter son bacterias que se encuentran limitadas al floema su medio de diseminación entre plantas es mediante injerto y vía insectos vectores (Bové, 2006). Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren la posibilidad de que el ingreso de esta bacteria en la región de Yurécuaro fue mediante semilla y que esta puede ser un factor que esté contribuyendo a su diseminación en

la localidad. Los síntomas de la enfermedad se observaron aún antes de que se detectó la presencia del insecto vector, por consiguiente es de suma relevancia determinar el papel que tiene la semilla como fuente de disseminación ya que de acuerdo con Schuster y Coyne (citados por Orvin y Hinkle, 1976) las bacterias pueden entrar a las semillas a través del sistema vascular, viajar hacia el tubo germinativo de los granos del polen, el hilo de las semillas maduras, e invadir la sutura dorsal de la semilla, posteriormente migrar hacia el funículo a través del rafe, pasar a la cubierta de la semilla y ahí alojarse por largos periodos de tiempo. Por lo tanto, entre las medidas fitosanitarias que podrían ayudar a manejar el problema debería considerarse el uso de semilla libre de *Ca. Liberibacter solanacearum*. La presencia de la bacteria en semilla estaría constituyendo la fuente de inóculo primario en vivero. Por otro lado en campo se debe realizar un manejo integrado de *B. cockerelli* para evitar la dispersión de la enfermedad en la parcela. En ausencia del cultivo de chile, el insecto vector tiene otras plantas como hospedantes alternos, de modo que *Ca. L. s.* podría sobrevivir en estas plantas. Se ha reportado la presencia de esta bacteria en *Solanum betaceum*, y *Physalis peruviana* (Liefting *et al.*, 2009).

VI. CONCLUSIONES

- El modelo epidemiológico al que se ajusta *Ca. Liberibacter solanacearum*, es Logístico.
- *Candidatus Liberibacter solanacearum* se transmite por semilla en el cultivo de chile.

VII. LITERATURA CITADA

- Ahrens U., Seemueller E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* **82**:828-832.
- Blood, H.L., Richards, B.L. and Wann, F.B., 1933. Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology* **23**:930
- Bové J.M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* **88**: 7-37.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York. USA. 532p.
- Carter, R.D. 1950. Toxicity of *Paratrioza cockerelli* (Sulc) to certain solanaceous plants. Ph.D. dissertation. University of California, Berkeley.
- Da Graca, J.V. and Korsten L., 2004. Citrus Huanglongbing: Review, present status and future strategies. *Diseases of Fruits and Vegetables* **1**: 229-245.
- Eyer, J., 1937. Observations on the feeding habits of the potato psyllid (*Paratrioza cockerelli* Sulc.) and the pathological history of the “psyllid yellows” which it produces. *Journal of Economic Entomology* **26**:846-850.

FAOSTAT,2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations:
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (fecha de
consulta: agosto, 2010)

Fletcher, J. and Wayadande, A., 2002. Bacterias Fastidiosas Colonizadoras Vasculares. Trans.

José Carlos Ureta R. 2009. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0323-01.

Garnier, M., Danel, N., Bové, J.M., 1984. The greening organism is a gram-negative bacterium, p. 115-124. In : (S.M Garnsey, L. W. Timmers, and J. A. Dodds editors), Proceedings of the 9th International Conference of Citrus Virologist. University of California, Riverside.

Garnier, M., Jagoueix-Eveillard S., Cronje, P.R., Le Roux, H.F. and Bové J.M., 2000. Genomic characterization of a Liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 2119-2125.

Greig-Smith, P. 1952. Use of random and contiguous quadrats in the study of the structure of plant communities. *Annals of Botany*, **16**:293-316.

- Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R., and Paine, T. D., 2008. A New Huanglongbing Species, *Candidatus Liberibacter psyllauros*,” Found To Infected Tomato and Potato, is Vected by the Psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Department of Entomology, University of California, Riverside, Riverside California. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:5862–5865.
- Hernández D.M.G. 2009. Asociación de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” con el variegado del chile (*Capsicum annuum* L.) en Yurécuaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Parasitología Agrícola. Chapingo, Mexico. 62p.
- Hudelson, B.D., Clayton, M.K., Smith, K.P., and Upper, C.D. 1997, Detection and description of spatil patterns of bacterial brown spot of snap beans using cyclic samples. *Phytopathology* **87**: 33-41.
- Jagoueix, S., Bove´ J.M. and Garnier, M., 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. *Internacional Journal Systematic Bacteriology* **44**:379–386.
- Khairulmazmi A., Kamaruzaman S., Habibuddin H., Jugah K. and Syed O.S.R., 2008. Occurrence and spread of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of Huanglongbing disease of citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **4**:103-111.

- Kranz, J., 1990. Epidemics, their mathematical analysis and modeling: An introduction. *In*: Epidemics of plant disease: Mathematical analysis and modeling, 2nd Edn. (J. Kranz, editor). Springer, Berlin, pp.1-11.
- Lafèche, D., and Bovk, J.M.,1970. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 2701915-1917.
- Liefting, L.W., Perez-Egusquiza, C.Z., Clover, G.R.G. and Anderson J.A.D., 2008. A New 'Candidatus Liberibacter' Species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* **92**:1474.
- Liefting, L.W., Sutherland, P.W., Ward, L.I, Paice, K.L., Weir B.S., and Clover G.R.G., 2009. A New 'Candidatus Liberibacter' Species Associated with Diseases of Solanaceous Crops, *Plant Disease* **93**:208-214.
- Madden, L.V. and Campbell, C.L., 1990. Nonlinear disease progress curve: *In* : Epidemics of plant disease: Mathematical analysis and modelling, 2nd. Edn. (J. Kranz, editor) Springer, Berlin, pp. 181-229.
- Madden, L.V., Hughes, G., Van den Bosch F., 2007. The study on plant disease epidemics. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota U.S.A. 421p.

- Munyanza, J.E., Sengoda, V.G., Crosslin, J., Garzon Tiznado, J.A., Cardenas Valenzuela, O.G., 2009. First report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in pepper plants in México. *Plant Disease* **93**:1076.
- Munyanza, J.E., Fisher, T.W., Segonda, V.G. and Garczynski F., 2010. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” associated with psyllid affected carrots in Europe. *Plant Disease* **94**:639.
- Murray, R.G.E. and Scheleifer, K.H., 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *Journal Systematic Bacteriology* **44**: 174-176.
- Nuez V. F., Gil. O.R., Costa G., J., 1996. El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 607 p.
- Ord, J. K., 1982. Aggregation. *In* : Encyclopedia of statistical sciences, Vol.1 (S. Kotz and N. L. Johnson, editors). John Wiley and Sons, New York, pp. 30-34.
- Orvin, J. and Hinkle, N.F., 1976. Bacteria ovules and seeds. *Applied and Environment Microbiology* **32**: 694-698.
- Plesch, D.J., 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. Montana Agricultural Experimental Station Bulletin 446. 95 p.

- Richards B.L., Blood, H.L., 1933. Psylla yellows of the potato. *Journal of Agricultural Research* **46**:189-216
- Schuster, M.L. and Coyne J.J., 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review Phytopathology* **12**:199-221.
- Segonda, V.G., Munyaneza, J.E., Crosslin, J.M., Buchman, J.L., Pappu, H.R., 2009. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip disease potato. Potato Association of America. *American Journal. Potato Research* 87:41-49.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2009. Agricultura, Producción anual por cultivo. www.siap.gob.mx (fecha de consulta: agosto, 2010).
- Vega G, M.T., Rodriguez M, J.C., Diaz G., M.O., Bujanos M., R., Mota S., D., Martínez C., J.L., Lagunes T.,A., Garzón T., J.A., 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Agrociencia* **42**: 463-471.
- Weir, B., Liefing, L., Ward, L., Paice, K., Clover, G., 2008. A New “*Candidatus Liberibacter*” Species Associated with Solanaceous Plants. Plant Health and Environment Laboratory. MAF Biosecurity New Zelanda. New Zelanda.
- Zadoks, J.C. and Schein, R.D., 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford. New York. 427p.

VIII. ANEXO

9.1.- Modelos de análisis temporal de la epidemia en la parcela 2 Javier Rico.

a) Modelo logístico.

Cuadrante	Formula	r^2	rL (sig)	SME
	$y=1/\{1+\exp [-a+kt]\}$			
Incidencia Promedio	$y=1/(1 +\exp (-0.088221+ 0.965566 (t)))$	0.9920	< 0.0001	0.000773
Severidad Promedio	$y=1/(1 +\exp (-0.159644 + 0.854686 (t)))$	0.9863	< 0.0003	0.000981

R^2 coeficiente de determinación; rL, estimador de tasa de modelo logístico; SME, suma de cuadrados de error.

b) Modelo Gompertz

Cuadrante	Formula	r^2	kg (sig)	SME
	$y=\exp\{-a \exp (-kt)\}$			
Incidencia Promedio	$y=\exp(-0.027078 \exp ((-0.715024)t))$	0.9897	0.0002	0.00100
Severidad Promedio	$y=\exp(-0.095789 \exp ((-0.659119)t))$	0.9686	0.0012	0.00224

R^2 coeficiente de determinación; kg, estimador de tasa de modelo gompertz; SME, suma de cuadrados de error.

c) Modelo Exponencial

Cuadrante	Formula	r^2	rE (sig)	SME
	$y=y_0*\exp(rE*t)$			
Incidencia Promedio	$y= 0.281623*\exp(0.225036*t)$	0.8486	0.0096	0.0147
Severidad Promedio	$y= 0.367999*\exp(0.180845*t)$	0.8754	0.0055	0.00890

R^2 coeficiente de determinación; rE, estimador de tasa de modelo exponencial; SME, suma de cuadrados de error.

d) Modelo Monomolecular

Cuadrante	Formula	r^2	rM (sig)	SME
	$y=1.-(1-y_0)*\exp(-rM*t)$			
Incidencia Promedio	$y=1.-(1-(-0.36698))*\exp(-0.47781*t)$	0.9623	0.0013	0.00365
Severidad Promedio	$y=1.-(1-(-0.1487))*\exp(-0.487109*t)$	0.9374	0.0037	0.00447

R^2 coeficiente de determinación; rM, estimador de tasa de modelo monomolecular; SME, suma de cuadrados de error.