



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

Título tesis
**Etiología del variegado del Chile (*Capsicum*
annuum L.) en Yurécuaro, Michoacán.**

Nombre
María Guadalupe Hernández Deheza

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

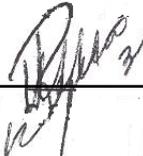
MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2013

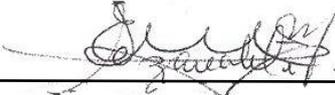
La presente tesis, titulada: **Etiología del variegado del chile (*Capsicum annuum* L.) en Yurécuaro, Michoacán**, realizada por la alumna: **María Guadalupe Hernández Deheza**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

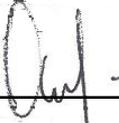
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: 

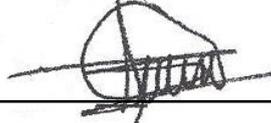
Dra. Reyna I. Rojas Martínez

ASESOR: 

Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESOR: 

Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

ASESOR: 

Dr. Ángel Rebollos Alvirer

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2013.

ETIOLOGÍA DEL VARIEGADO DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) EN YURÉCARO, MICHOACÁN

María Guadalupe Hernández-Deheza¹

¹ Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo Texcoco, México. CP 56230. e-mail: hernandez.maria@colpos.mx

RESUMEN

En Yurécuaro, Michoacán, en el ciclo de cultivo verano otoño 2009 y 2011 se encontraron en cultivos de chile síntomas de variegado, nervaduras cloróticas, deformación de la lámina foliar y fruto, albinismo y escaldadura, síndrome al cual se le denominó “variegado del chile”. A simple vista, esta serie de síntomas indicaban que el problema era causado por virus fitopatógenos; sin embargo, en ensayos previos se detectó a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si esta bacteria es el agente causal del variegado del chile. Mediante transmisión por injerto, transmisión con el vector *Bactericera cockerelli* y reacción en cadena de la polimerasa con el par de iniciadores OA2/CLi.po.F y OI2, se confirmó que dicha sintomatología es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, PCR, secuenciación.

AETIOLOGY OF CHILI PEPPER VARIEGATION FROM YURÉCUARO, MÉXICO

María Guadalupe Hernández-Deheza¹

¹ Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo
Texcoco, México. CP 56230. e-mail: hernandez.maria@colpos.mx

ABSTRACT

In Yurecuaro, Michoacan, during the cultivation of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) in the summer - autumn 2009 and 2011, variegation symptoms (chlorotic ribs, deformation of the leaf lamina and fruit, albinism and browning) were observed. This syndrome, was called "chili pepper variegation". At first glance, this series of symptoms indicated that the problem was caused by pathogenic viruses, however, was detected in preliminary tests to *Candidatus Liberibacter solanacearum*, so the aim of this study was to determine whether this bacterium is the causal agent of chili pepper variegation. By Graft transmission, the transmission by the vector *Bactericera cockerelli* and chain reaction polymerase with primers pair OI2 OA2/CLi.po.F was confirmed that this symptom is induced by the bacterium *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Keywords: *Candidatus Liberibacter solanacearum*, PCR, sequencing.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por financiar mis estudios de postgrado en el Colegio de Postgraduados.

Al **Colegio de Postgraduados** al programa de Fitosanidad-Fitopatología por la formación académica que recibí y por su hospitalidad.

A la estación cuarentenaria de fitopatógenos **ENECUSAVEQ-SENASICA**, por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A la **Dra. Reyna I. Rojas Martínez**, por ser mi consejera durante mi estancia en la maestría, por compartir sus conocimientos para la culminación de este trabajo, por su paciencia y por su amistad incondicional.

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía**, por su valiosa participación en la realización de este trabajo y por compartir sus conocimientos.

Al **Dr. Daniel L. Ochoa Martínez**, por su valiosa participación en la realización de este trabajo, por su apoyo incondicional y por su amistad.

Al **Dr. Ángel Rebollar Alviter**, por su valiosa participación, sugerencias y apoyo en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mí papí Enrique Hernández Ramírez, por permitir mi óptimo desarrollo, por su apoyo, por su paciencia, amor incondicional, pero sobre todo por su amistad. Ser padre no es fácil y tener que ser ambos a la vez mucho menos, gracias por esa entrega.

A mí hermano Juan, por su cariño, comprensión y apoyo. Gracias por ser el mejor hermano del mundo, porque admiro tu sencillez con la que riges tu vida, pero sobre todo por el ser humano maravilloso que eres.

A mis abuelitos, ustedes son mis abuelos por naturaleza pero han sido mis padres por elección, gracias por el amor que me brindan siempre, solo le pido a la vida les brinde muchos años más para poderlos compartir con mígo.

A mis niños Raziél y Aldemar que son la luz de mi vida, con su sonrisa hacen que un mal día se convierta en uno increíble, porque a su lado te das cuenta que la vida es simple y maravillosa.

A mis tíos Toño y Sol y mis primos Toño, Kenia y Mary que siempre han estado a mi lado apoyándome y llenando mi vida de amor.

A mis hermanos Hugo, Isa y Monze, porque por ustedes intento ser mejor cada día para poder brindarles un buen ejemplo y a la vez aprendo de cada uno pues poseen grandes virtudes.

A mis amigos Jaime, Alma, Nan, Alex, Eber, Dan, Bere, y Gaby, por tantos años de amistad, porque la vida nos ha puesto en caminos diferentes pero siempre han estado a mi lado apoyándome en cada una de las etapas que he vivido. A Albita, Yola, Moy, Hugo, Juan Manuel, Dago, Gil, Abi, Noemí, Lalo, por hacer la estancia en el colegio más agradable y a Eli y Poncho por que con su amistad y compañía me siento en familia.

A Pedro Ibarra, por su apoyo durante mi estancia en la maestría. De la misma forma que el destino nos unió nos ha separado, muchas gracias por lo vivido, que dios te bendiga siempre

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1 <i>Candidatus</i> Liberibacter	14
2.2 Clasificación y biología	15
2.3 Distribución mundial	16
2.4 Síntomas y hospedantes	19
2.5 Detección	20
2.6 Genómica	22
2.7 Vector y manejo de la enfermedad	24
2.8 Relación patógeno-vector y patógeno-hospedante	26
2.9 <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en México	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Material vegetal e insectos	30
3.2 Extracción de ácidos nucleicos	30
3.3 Detección de <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum	31
3.3.1. Detección por PCR	31

3.3.2. Detección por PCR en tiempo real	32
3.4 Secuenciación	32
3.5 Transmisión por injerto	32
3.6 Transmisión por <i>Bactericera cockerelli</i> .	33
IV. RESULTADOS	34
4.1 Secuenciación y análisis filogenético	35
4.2 Transmisión por injerto	36
4.4 Transmisión por <i>Bactericera cockerelli</i> .	37
V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSION	43
VII. LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Distribución geográfica de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	19
2	Síntomas asociados a <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .	34
3	Productos amplificados mediante PCR con los iniciadores OA2 y OI2c a partir de tejido de plantas de <i>Capsicum annuum</i> L. (var. centella) con diferentes síntomas	35
4	Árbol filogenético de la región 16S rRNA de las bacterias pertenecientes al género “ <i>Candidatus Liberibacter</i> ” del grupo alpha de la subdivisión <i>Proteobacteria</i> y las especies <i>Escherichia coli</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> y <i>Rhizobium leguminosarum</i> utilizadas como raíz.	36
5	Plantas injertadas (A y B) mostrando variegado a los 90 días después de la inoculación.	37
6	Transmisión por psílidos.	38
7	PCR con los iniciadores OA2 y OI2c de plantas de Chile inoculadas con psílidos previamente alimentados en plantas infectadas con <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> .	39

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	Iniciadores específicos para <i>Candidatus</i> Liberibacter	21
2	Resultados de PCR-TR de las pruebas del primer ensayo de transmisión por psíidos para CaLso.	39

I. INTRODUCCIÓN

México se encuentra entre los principales países productores y exportadores de hortalizas en el mundo, se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial y el primero en el continente Americano. Otros exportadores de importancia son Países Bajos, España, China, Francia, Bélgica, y Canadá; los diez principales países productores de hortalizas contribuyen con alrededor del 70% de la producción mundial. En México las cinco especies de hortalizas con más valor en el mercado son tomate rojo (*Solanum lycopersicum*), chile verde (*Capsicum annuum*), cebolla (*Allium cepa*), tomate verde (*Physalis ixocarpa*) y calabacita (*Cucurbita pepo*) (Financiera Rural, 2008).

El chile verde es la hortaliza más sembrada en el país. En 2009 se sembró una superficie de 149,114.73 ha comparada con el tomate rojo (66,635.31 ha) y calabacita (31,738.24 h) (SIAP, 2010). Los principales estados productores en México son Sinaloa (694,633.90 t), Chihuahua (564,256.08 t) Zacatecas (209,330.90 t), San Luis Potosí (133,402.30 t), Tamaulipas (125,481.50 t) y Michoacán (93,424.44 ton) (SIAP, 2010). Este último ocupa el sexto lugar en producción de esta hortaliza, siendo los municipios de Yurécuaro, Tanhuato, Coahuayana, Vista Hermosa y Ecuandureo los que tienen la mayor superficie sembrada (SIAP, 2007).

El cultivo de chile, como el resto de los cultivos es afectado por diferentes microorganismos fitopatógenos como virus, bacterias y hongos (Agrios, 2006). En el 2008 en el municipio de Yurécuaro, Michoacán se encontró un nuevo problema fitosanitario. Inicialmente se pensó que se trataba de un problema de virosis, ya que se observaba variegación, deformación de la lámina foliar y albinismo, síntomas

típicos causados por estos agentes causales. Sin embargo, los resultados del análisis de ELISA para el *Tobacco mosaic virus* (virus mosaico del tabaco TMV), *Tobacco ringspot virus* (virus de la mancha anular del tabaco TRSV), *Cucumber mosaic virus* (virus mosaico del pepino CMV), *Alfalfa mosaic virus* (virus mosaico de la alfalfa AMV), *Tomato spotted wilt virus* (virus de la marchitez manchada del tomate TSWV), *Tabacco etch virus* (virus jaspeado del tabaco TEV) y *Tomato aspermy virus* (virus aspermia del tomate TAV) fueron negativos, indicando que dicha sintomatología no se encontraba asociada con estos virus. Con estos antecedentes y conociendo que el género *Candidatus* afecta también a la familia de las solanáceas, se sospechó que estos síntomas podrían deberse a este patógeno, debido a la abundante presencia de *Bactericera cockerelli* en la zona. En enero de 2008 *Ca. Liberibacter* fue reportada por vez primera en el cultivo de chile en Nueva Zelanda, ocasionando moteado, amarillamiento, deformación de la lámina foliar y muerte repentina de la planta (Liefting *et al.*, 2008). Recientemente a esta bacteria se le asignó el nombre de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009), y tiene como vector a *Bactericera cockerelli* (Liefting *et al.*, 2008), a quien se le atribuye la transmisión de la enfermedad denominada zebra chip en el cultivo de papa en Estados Unidos (Abad *et al.*, 2009) y Nueva Zelanda (Liefting, 2008). Por otro lado, diversas especies de “*Candidatus Liberibacter*” se han reportado como patógenas en plantas de la familia de las rutáceas, siendo la enfermedad conocida como Huanglongbing un problema serio a nivel mundial para la citricultura (Murray y Schleifer, 1994; Jagoueix, 1994; Murray y Stackebrandt, 1995; Martínez, 2008; Brlansky, 2009).

Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar si *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* es el agente causal del variegado del chile en Yurécuaro, Michoacán.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Candidatus Liberibacter*

Candidatus Liberibacter es una bacteria Gram negativa, restringida a los tubos cribosos del floema, que pertenece al grupo α de la subdivisión *Proteobacteria* (Jagoueix *et al.*, 1994). *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas) fue la primera especie que se reportó a finales del siglo XIX por citricultores de China, como causante de la muerte de los árboles en corto tiempo (Zhao, 1981). En 1994 y 2004 se detectaron en cítricos las especies *Candidatus Liberibacter africanus* (CaLaf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CaLam), respectivamente. En 2008 se detectó a *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) afectando cultivos comerciales de Chile, jitomate y papa en Nueva Zelanda (Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009) y México (Munyanzeza *et al.*, 2009; Camacho-Tapia *et al.*, 2011), posteriormente en 2010 se encontró afectando zanahoria en Europa (Munyanzeza *et al.*, 2010) y recientemente en Jocotitlán, Estado de México, afectando jitomate (Ling *et al.*, 2011). Los síntomas causados por la bacteria varían según el cultivar y la etapa de crecimiento del hospedante pero consisten principalmente en amarillamientos y deformación de la lámina foliar (Khairulmazmi *et al.*, 2008). La transmisión se lleva a cabo por los psílidos *Diaphorina citri*, *Trioza erytrae*, *Bactericera cockerelli* y *Trioza apicalis*; y a través de semilla e injerto (Garnier *et al.*, 2000; Hansen *et al.* 2008, Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009). Esta bacteria se ha relacionado con la enfermedad conocida como zebra chip (ZC) en papa (Munyanzeza *et al.*, 2007) y el permanente del tomate (Munyanzeza *et al.*, 2009). La detección de *Candidatus Liberibacter* se realiza principalmente mediante técnicas moleculares, destacando la reacción en cadena de la polimerasa (Das, 2004).

2.2 Clasificación y biología

El término “*Candidatus*” en el caso de bacterias se asigna a organismos que no pueden caracterizarse con técnicas bioquímicas (Murray y Schleifer, 1994; Murray y Stackebrandt, 1995), mientras que el nombre trivial “*Liberobacter*” proviene del latín *Liber* (corteza) y *bacter* (bacteria) que posteriormente fue remplazado por “*Liberibacter*”. Estas bacterias pueden ser de forma filamentosa con un diámetro de 0.2 – 0.3 μm o redonda con un diámetro mayor de 0.5 μm , no poseen una membrana externa y la pared de peptidoglicanos es apenas visible, sin evidencias de flagelos o pilis; su citoplasma es menos denso con respecto a otras bacterias fitopatógenas y con frecuencia muestran plasmólisis (Jagoueix *et al.*, 1994; Garnier *et al.*, 2000). A la fecha se han reportado cuatro especies, de las cuales tres afectan cítricos; *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Brlansky *et al.*, 2009), *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus* (Jepson, 2008) que causan la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB, “Dragón amarillo” en español), considerada como la más importante a nivel mundial en estos cultivos (Brlansky *et al.*, 2009). La cuarta especie *Candidatus Liberibacter solanacearum* afecta a plantas la familia Solanaceae y Apiaceae. En el Cuadro 1 se indican los hospedantes a los que afecta cada especie, sus vectores y su tolerancia a temperatura.

Sechler *et al.* (2009) lograron aislar y cultivar *in vitro* a las tres especies de *Candidatus Liberibacter* que afectan cítricos, en un medio especial llamado “Liber A” que se prepara con extracto de venas de cítricos, potasio monobásico, fosfato dibásico, NADP, cicloexamida y agar. Lo anterior les permitió llevar a cabo pruebas de patogenicidad, no obstante, no se conocen reportes adicionales que indiquen el uso extensivo de este medio de cultivo en la investigación y diagnóstico de *CaLspp.*,

posiblemente debido a que es mucho más rápido y práctico realizar la detección mediante PCR.

2.3 Distribución mundial

La bacteria *Candidatus Liberibacter*, se detectó por primera vez en China, a finales del siglo XIX (Zhao, 1981), posteriormente se reportó en el continente africano a finales de 1920 (Van der Merwe y Andersen, 1937) y en 2004 se detectó por primera vez en el continente Americano en Brasil (Da Graca y Korsten, 2004). En 2005 se reportó en el sur de Florida en la región de Homestead (Brlansky, 2009), en 2006 en Cuba (Martínez *et al.*, 2009 y Da Graca, 2008), en 2008 en Lousiana (Jepson, 2008), en 2008 en Belice y República Dominicana y por último en México en el 2009 (SENASICA, 2009) (Fig. 1). *CaLasiaticus* es un grave problema en cítricos en países como China, Taiwán (Zhao, 1981), Filipinas (Lee, 1921), Indonesia (Aubert *et al.*, 1996), India (Raychaudhuri *et al.*, 1974) y Brasil (Texeira *et al.*, 2005).

El HLB se reportó por primera vez en México en Tizimin, Yucatán y se asoció con la bacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Robles *et al.*, 2009). Actualmente se encuentra distribuida en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche, Colima y Sinaloa (SENASICA, 2010). En México, se han eliminado 379 árboles con síntomas de la enfermedad en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Jalisco y Nayarit (SENASICA, 2010). Sin embargo, Texeira *et al.* (2005) mencionan que cuando un árbol presenta los síntomas característicos de la enfermedad, al menos cinco árboles aledaños a éste ya portan a la bacteria, por lo que se prevé que en poco tiempo la incidencia de la enfermedad crecerá exponencialmente. La especie *CaLaf* se encuentra distribuida en el Este, Centro y Sur de África incluyendo Burundi, Camerún, Etiopía, Isla Mauricio, Kenya,

Madagascar, Malawi, Nigeria, República centroafricana, Isla Reunión, Ruanda, Somalia, Sudáfrica, Suazilandia, Tanzania y Zimbaue (Le Roux *et al.*, 2006).

Candidatus Liberibacter americanus sólo se ha encontrado en Brasil en la región de Araraquara, São Paulo, y aunque no se tienen reportadas las pérdidas económicas que ocasiona, desde su detección en 2004 se han eliminado 500 mil árboles, pero de forma extraoficial se estima que adicionalmente los productores han eliminado de 300 a 400 mil árboles. Inicialmente se consideró que se trataba de la especie CaLas, pero dada la severidad de los síntomas observados en árboles de cítricos y los resultados de los análisis moleculares, se determinó que se trataba de una nueva especie clasificada como CaLam y que resultó ser más agresiva que la especie asiática (Texeira *et al.*, 2005).

Las mayores pérdidas ocasionadas por HLB se reportan en Brasil y EUA, países donde se han eliminado más de 5 millones de árboles con síntomas de la enfermedad, a lo que se suman los costos (279 dólares/ha) por las aplicaciones contra el vector (Ayres y Yamamoto, 2007; Brlansky, 2009). En 2008, se reportó en Nueva Zelanda una nueva especie de esta bacteria afectando cultivos de chile y jitomate en invernaderos comerciales, la cual se identificó como CaLso (Liefting *et al.*, 2008). Después de este hallazgo la agencia de Bioseguridad del Ministerio de Agricultura y Silvicultura de Nueva Zelanda suspendió las importaciones de chile y jitomate (Liefting *et al.*, 2008). Los investigadores de esta agencia notificaron que se trataba de una nueva especie de *Candidatus Liberibacter*, ya que las pruebas moleculares utilizadas para su identificación indicaron que la bacteria no correspondía a ninguna de las especies descritas con anterioridad (Liefting *et al.*, 2008). Esta especie se encuentra distribuida en Canadá (Alberta, British Columbia, Ontario, Quebec, Saskatchewan), México (Sinaloa, Michoacán y Estado de México) ,

Estados Unidos (Arizona, California, Colorado, Idaho, Kansas, Minnesota, Montana, Nebraska, Nevada, Nuevo México, Dakota del Norte, Oklahoma, Dakota del Sur, Texas, Utah y Wyoming), Guatemala, Honduras y Nueva Zelanda (EPPO, 2009; Liefting *et al.*, 2009; Camacho-Tapia *et al.*, 2011; Munyaneza *et al.*, 2007 y 2011).

En Texas y California, se encontró otra especie de esta bacteria en poblaciones del psílido *B. cockerelli*, la cual fue denominada *Candidatus Liberibacter psyllaeus* (CaLps); los psílicos fueron colectados por Hansen *et al.* (2008) en cultivos de papa y jitomate con síntomas de amarillamiento y confirmaron que *B. cockerelli* es el vector de CaLps. Algunos autores mencionan que CaLps está muy relacionada con CaLso y que probablemente se trata de la misma especie (Munyaneza *et al.*, 2010; EPPO 2011).

Munyaneza *et al.* (2007) mencionan que en Nueva Zelanda, Estados Unidos, México y Centro América la enfermedad conocida como ZC en papa, asociada con CaLso, ha causado pérdidas económicas estimadas en millones de dólares y el abandono de campos enteros. En jitomate y chile no se tienen datos de pérdidas y daños (Liefting *et al.*, 2009). En 2010 esta especie se detectó también en zanahoria (*Daucus carota*) en el sur de Finlandia, atribuyéndose la transmisión al psílido *Trioza apicalis*, plaga que se presenta en el centro y norte de Europa (Munyaneza *et al.*, 2010).

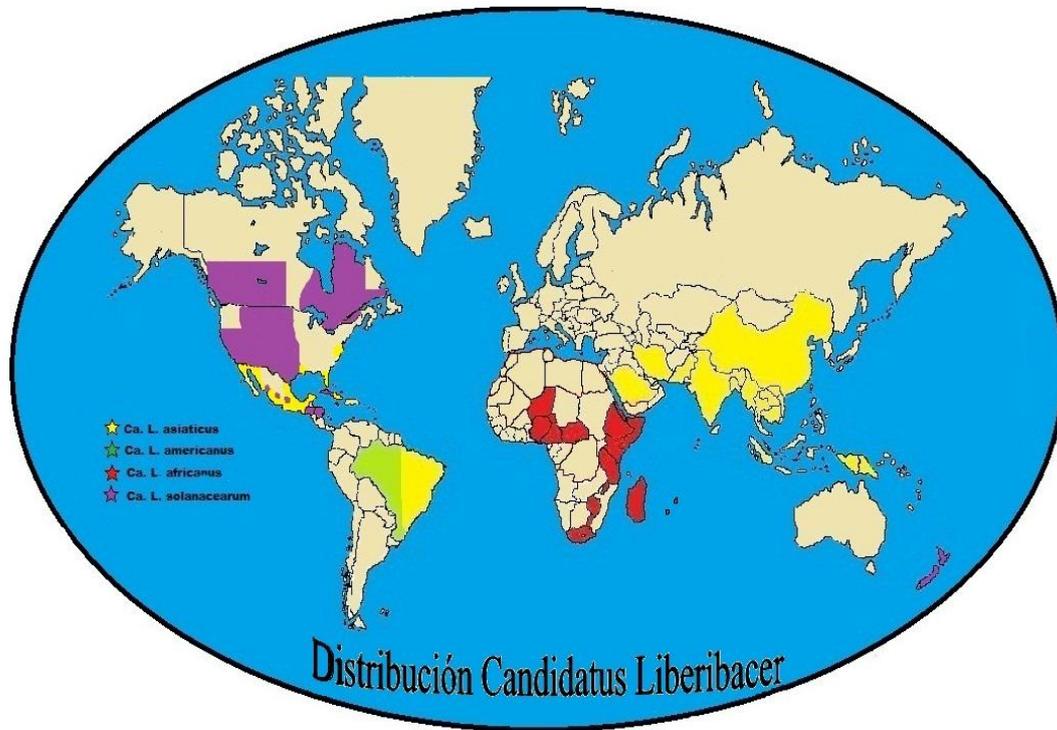


Fig. 1. Distribución geográfica de *Candidatus*

2.4 Síntomas y hospedantes

El género *Candidatus Liberibacter* afecta principalmente a las especies cítricas más importantes de la familia Rutaceae incluyendo naranjos (*Citrus cinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*) y tangelos (*Citrus reticulata x C. paradisi*), y en menor grado a los limones (*Citrus limon*), toronjas (*Citrus paradisi*) y especies ornamentales como *Swinglea glutinosa* y *Triphasia trifolia* (McClellan y Schwarz, 1970).

El HLB causa defoliación de los árboles, amarillamiento, reducción del tamaño de los frutos, moteado del follaje y amarillamiento de las venas (Khairulmazmi *et al.*, 2008).

El síntoma característico de la enfermedad es la presencia de una o más ramillas terminales del árbol con apariencia clorótica, que contrasta con el color verde de las hojas de las ramas no afectadas (Bové, 2006). Las plantas enfermas presentan también caída prematura, asimetría y reducción del número de frutos con una línea curvada a la mitad del mismo (observada al cortarlo longitudinalmente) (Bové, 2006; Bransky *et al.*, 2009). Los síntomas a veces pueden confundirse con deficiencias de

zinc, hierro, magnesio, calcio y cobre u otras enfermedades como gomosis (García, 2006).

Ca. *Liberibacter solanaceum*, afecta a especies de la familia de las solanáceas, de ahí su nombre; no obstante, en el año 2010 se encontró afectando al cultivo de zanahoria (Munyanza *et al.*, 2010). En jitomate los síntomas incluyen enrollamiento y amarillamiento de las hojas, achaparramiento de la planta y deformación del fruto en algunas variedades. Liefting *et al.* (2008, 2009) mencionan que en diversos materiales de Chile, los síntomas se manifiestan como hojas deformes de color verde pálido o amarillo, con tallos acortados, caída de flores y muerte repentina de diferentes partes de la planta. Camacho-Tapia *et al.* (2011) mencionan que los síntomas inducidos por la bacteria en materiales de Chile tipo serrano son: venas cloróticas, deformación de la lámina foliar y fruto, albinismo y variegado. En papa la enfermedad se manifiesta por clorosis en hojas, deformación de tallos o en forma de zigzag, desarrollo de tubérculos aéreos, oscurecimiento del sistema vascular y hojas dobladas o marchitas. Sin embargo, sólo la presencia de rayas necróticas en la médula del tubérculo se considera como síntoma típico para la diagnosis de la enfermedad ZC (Munyanza *et al.*, 2007). En zanahoria los síntomas consisten en amarillamiento, clorosis, deformación de hojas, reducción de tamaño de la planta y proliferación de raíces secundarias (Munyanza *et al.*, 2010).

2.5 Detección

La detección de la bacteria requiere de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Das, 2004), clonación y secuenciación (Hansen *et al.*, 2008). La PCR es la más usada para la detección de esta bacteria, por ser una técnica muy sensible y rápida. Para realizarla es necesario contar, para cada una de las especies

descritas de *Candidatus Liberibacter* con oligonucleótidos específicos (Cuadro 1), cuyo diseño se basa en la secuencia de nucleótidos de la región 16S rDNA de su genoma (Jagoueix *et al.*, 1996; Texeira *et al.*, 2005).

Jagoueix *et al.* (1994) diseñaron el oligonucleótido universal OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3), que se usa en combinación con el resto de los oligos para la detección de las diferentes especies de *Ca. Liberibacter*.

Cuadro 1. Iniciadores específicos para *Candidatus Liberibacter*

Especie	Oligonucleótido o (sentido 5'-3')	Oligonucleótido (antisentido 5'- 3')	Región que amplifica	Fragmento (pb)	Fuente
CaLasiaticus	OI1 (GCGCGTATG CAATACGAGC GGCA)	OI2c (GCCTCGCGAC TTCGCAACCCAT)	16S rDNA	1,160	Jagoueix <i>et al.</i> , 1996. Texeira <i>et al.</i> , 2005.
CaLafricanus	OA1 (GCGCGTATTT TATACGAGCG GCA)			1,160	Jagoueix <i>et al.</i> , 1996. Texeira <i>et al.</i> , 2005.
CaLamericanus	GB1 (AAGTCGAGC GAGTACGCAA GTACT-3)	GB3 (CTATATTTGCC ATCATTAAGTT GG)		1,027	Texeira <i>et al.</i> , 2005.
	OA2 ^x (GCGCTTATTT TTAATAGGAG CGGCA)			1,060	Liefting <i>et al.</i> , 2009.

CaLsolanacearum		OI2C (GCCTCGCGAC TTCGCAACCAT)			
	Cli.po.F (TACGCCCTGA GAAGGGGAAA GATT)			1, 070	Secor <i>et al.</i> , 2009.
	LsoF (GTCGAGCGC TTATTTTAAAT AGGA)			1, 173	Munyanez <i>et al.</i> , 2010. Li <i>et al.</i> (2009)

2.6 Genómica

A la fecha se han secuenciado los genomas de las tres especies relacionadas con HLB sin que se conozca, para la mayoría de las secuencias obtenidas para qué genes codifican. El genoma completo de CaLas secuenciado en 2009, está constituido por un cromosoma circular de 1.23 Mbps con un bajo contenido de GC (36.5%) distintivo de bacterias intracelulares. Un alto porcentaje de su genoma corresponde a secuencias de genes relacionados con movilidad celular (4.5%) y genes relacionados con transporte activo (8.0%). En concordancia con su naturaleza intracelular carece de los sistemas de secreción tipo III y tipo IV, así como de enzimas degradadoras extracelulares. Mediante análisis filogenético se determinó

que *CaLas* está estrechamente relacionada con miembros de la familia *Rhizobiaceae* (Duan *et al.*, 2009) (Figura2).

El genoma de *CaLso*, se secuenció en 2010 y consiste de un cromosoma circular de 1.26 Mbps nucleótidos (Genbank No. CP002371). Su tamaño es similar al de las especies *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. africanus*, con las cuales está relacionada. El ADN bacteriano utilizado para la secuenciación se aisló de psíldos colectados en campos de papa afectados por ZC en Dalhart, Texas, Estados Unidos (Lin *et al.*, 2011). El genoma completo de *Ca. L. solanacearum* se analizó y comparó con el de otras bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, del género *Agrobacterium* y con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Lin *et al.*, 2011), tal análisis indicó la existencia de un gran número de transportadores únicos y rutas metabólicas que pueden contribuir a su patogenicidad. Algunos de estos atributos posiblemente se adquirieron a través de transferencia horizontal de genes. La comparación de los genomas de *CaLso* y el de *CaLas* reveló que ambas especies tienen un genoma pequeño existiendo una gran similitud entre ambas, aunque se observaron reordenamientos genómicos que sugieren que han tenido una rápida evolución; también se encontró un gran número de genes con funciones desconocidas (Lin *et al.*, 2011).

En las especies de *CaLso* y *CaLas*, sólo el 30% del total de su genoma constituye marcos de lectura abierta y el 70% restante corresponde a un gran número de proteínas hipotéticas, el determinar su función en los procesos bioquímicos fundamentales o de supervivencia de la bacteria y su posible relación con la inducción de síntomas (Lin *et al.*, 2011), permitirá tener un mejor entendimiento de su biología, lo cual eventualmente ayudará a desarrollar estrategias de manejo.

2.7 Vector y manejo de la enfermedad

Ca. Liberibacter se transmite a través de insectos, es una bacteria persistente que se reproduce dentro del insecto y es capaz de transmitirse de generación en generación de forma transovárica (Pelz-Stelinsky *et al.*, 2010). La dispersión de las bacterias causantes del HLB tienen lugar principalmente a través de dos vectores: *Diaphorina citri* para las especies asiática y americana, y *Trioza erytreae* para la especie africana (Garnier *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2007; Hall, 2008). Las estrategias de manejo de HLB están dirigidas principalmente al manejo del vector mediante la aplicación de productos químicos y el uso de enemigos naturales; también se ha recomendado utilizar plantas sanas, eliminar árboles enfermos y aplicar antibióticos como clorhidrato de tetraciclina para eliminar a la bacteria (Aubert *et al.*, 1996; Da Graca y Kortsen, 2004).

La especie CaLso es transmitida por *Bactericera cockerelli*. Cuando el insecto se alimenta de las plantas infectadas, adquiere a la bacteria, ésta, pasa a través de la barrera intestinal, se multiplica dentro del individuo y una vez que llega a las glándulas salivales es transmitida a otra planta durante la alimentación (Liefing *et al.*, 2009). No se tienen muchos estudios del tiempo de alimentación que requiere el insecto para la adquisición de la bacteria, el periodo de latencia y el tiempo de alimentación para la transmisión a una nueva planta. Cranshaw (1993), menciona que *B. cockerelli* es originaria de Norte América, ya que los primeros problemas en papa ocasionados por esta plaga, se detectaron en los Estados Unidos en 1920. En 1947 se documentó la presencia de *B. cockerelli* en México afectando solanáceas en los estados de Durango, México, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (Plesch, 1947); a partir de 1970 se le consideró como una plaga primaria en los cultivos de chile, jitomate y papa (Garzón-Tiznado 2003). En Nueva Zelanda apareció en 2005 y

se le ha catalogado como una plaga de gran importancia en diversas especies vegetales, especialmente chile y jitomate (Teulon *et al.*, 2009). Dos años después de haber detectado a *B. cockerelli* en campos agrícolas de Nueva Zelanda se reportó la presencia de CaLso, tal hecho sugiere que la bacteria llegó con el psílido a Nueva Zelanda y que éste es su vector (Liefting *et al.*, 2009). Para el caso de Estados Unidos y México el origen de la bacteria es incierto, ya que desde 1948 se reportó en México la presencia de la enfermedad conocida como punta morada de la papa (PMP), posteriormente fueron consignadas las enfermedades Zebra chip (Munyanza *et al.*, 2007) y permanente del tomate (Munyanza *et al.*, 2009) las cuales en años recientes se asociaron con CaLso. Lo anterior sugiere que la enfermedad se encontraba originalmente en papa y posteriormente con ayuda del psílido *B. cockerelli* se transmitió a jitomate, chile y otras solanáceas silvestres. Aunque en un principio estas enfermedades se atribuyeron a fitoplasmas o virus; actualmente se ha logrado establecer que tales síntomas se asocian con *Candidatus Liberibacter*. Muy probablemente la bacteria ha estado presente desde hace tiempo en los cultivos antes mencionados, pero no existían los métodos adecuados para su detección.

El manejo de CaLso se ha basado principalmente en el control químico del insecto vector, ya que la aplicación de antibióticos no ha tenido resultados para la remisión de síntomas o la muerte de la bacteria (Khairulmazmi *et al.*, 2008). Los insecticidas que se han recomendado son thiamethoxam e imidacloprid (Vega-Gutiérrez *et al.*, 2008). Butler *et al.* (2011) encontraron que en comparación con los testigos no tratados, la aplicación de imidacloprid y abamectina disminuyeron significativamente la transmisión de CaLso, como resultado de la reducción de las poblaciones del psílido de la papa.

Para el caso de las especies de *Ca. Liberibacter* que afectan cítricos, se han realizado varias investigaciones tendientes a desarrollar métodos de aplicación de antibióticos para el manejo de la bacteria. Zhang *et al.* (2011) encontraron que inyectando al tronco o sumergiendo las raíces en una mezcla de penicilina y estreptomicina se suprime el desarrollo de la bacteria. Esta estrategia constituye una herramienta útil para el manejo de *Ca. L. asiaticus* y podría serlo para otras especies de *Candidatus Liberibacter*.

2.8 Relación patógeno-vector y patógeno-hospedante.

La bacteria que causa el HLB es transmitida por los psílidos *T. erytrae* y *D. citri* y puede ser adquirida en 30 minutos, tiene un período de latencia de 7-10 días (Da Graca 1991), lo que sugiere que el patógeno se multiplica dentro del vector. Sin embargo, Xu *et al.* (1988) reportan que un tiempo mínimo de alimentación de 5-7 horas fue suficiente para adquirir y transmitir el patógeno, lo cual no se logró con periodos de 1-3 horas. Por otra parte no se conoce si los psílidos *D. citri* y *T. erytrae* pueden ser infectados simultáneamente con las especies *CaLas* y *CaLaf* (Garnier *et al.*, 2000). Los adultos, el cuarto y quinto instar son capaces de transmitir al patógeno en la secreción salival después de un periodo de latencia que varía desde 1-25 días. Las ninfas del primer al tercer instar no transmiten el patógeno. Hasta el momento no se han realizado estudios sobre la transmisión de *Candidatus Liberibacter* por vía sexual en psílidos, y tampoco se sabe si los parasitoides que se desarrollan en psílidos infectados con la bacteria pueden transmitir el patógeno (Halbert y Manjunath, 2004). Se carece de información acerca del efecto que *Ca. Liberibacter* tiene sobre el ciclo de vida de su vector *B. cockerelli*; Nachappa *et al.* (2011) determinaron que la presencia de *CaLso* en el interior del insecto, redujo

significativamente los días de fecundación de la hembra y porcentaje de supervivencia de ninfas. Estos resultados aportan evidencia de que *Ca. L. solanacearum* afecta negativamente la tasa de crecimiento de la población del vector.

Pierson *et al.* (2011) al estudiar los patrones de desplazamiento de *Ca. Liberibacter solanacearum* a través del floema de plantas de tomate y papa, encontraron que la frecuencia y/o dirección de desplazamiento varían entre las dos especies y entre variedades de papa. En ambas especies hospedantes se detectó a la bacteria con mayor frecuencia en las hojas del nivel superior y medio, tres semanas después de la transmisión por *B. cockerelli*; las tasas de movimiento fueron similares entre las variedades de papas y los síntomas se desarrollaron más en las variedades susceptibles. Los patrones de movimiento, la dirección de desplazamiento y la velocidad de movimiento de la bacteria en tomate y papa fueron parecidos a los patrones de movimiento de los virus y *CaL*so puede pasar del sitio de infección al tallo principal en tan solo 7 días. Por otro lado la dirección de translocación del patógeno fue similar en tomate y entre las diferentes variedades de papa, la bacteria parece seguir el movimiento de los carbohidratos hacia las hojas jóvenes. La manifestación de síntomas siguió el mismo patrón que el movimiento del patógeno y éste se pudo detectar en el mismo tejido por varias semanas (Pierson *et al.*, 2011). La velocidad de desarrollo de síntomas fue diferente en tomate, papa y entre las variedades de papas susceptibles y potencialmente tolerantes; en tomate los síntomas fueron menos severos y el desarrollo de los mismos fue más lento.

Se carece de información disponible sobre este tema para otras especies de *Ca Liberibacter*, por lo que es necesario realizar estudios similares para conocer la dirección y velocidad de desplazamiento de las otras especies de la bacteria y los

mecanismos responsables de estos procesos. Este conocimiento sería de utilidad para determinar cuándo y en qué tejidos realizar el muestreo para llevar a cabo la detección temprana del patógeno en campo. Así mismo, la comparación de los patrones de desplazamiento entre las variedades susceptibles y tolerantes podría contribuir al esclarecimiento de los mecanismos de tolerancia a la enfermedad.

2.9 *Candidatus Liberibacter solanacearum* en México

Esta bacteria se detectó por primera vez en 2009 en campos de jitomate en Cruz de Eleta, Sinaloa, (Munyanza *et al.*, 2009). En el mismo año se encontró afectando plantaciones de chile en la región del Bajío Michoacano en los municipios de Yurécuaro, Tahnuato y Vista Hermosa (Camacho-Tapia *et al.*, 2011). Recientemente se reportó la presencia de la bacteria en invernaderos de jitomate en Jocotitlán, Estado de México (Ling *et al.*, 2011). Los trabajos en jitomate se limitaron a la detección de la bacteria en plantas con síntomas, mientras que en el caso de chile se observó mediante transmisión por injerto de brotes provenientes de plantas enfermas, y sugieren que esta bacteria produce un variegado en las plantas, además una clorosis en las puntas de las hojas y variegado seguido de necrosis a los 90 días después de ser inoculada. Otro hallazgo interesante de este trabajo fue la detección de la bacteria en semilla de chile comercial, utilizada para siembra en los municipios de Yurécuaro, Vista Hermosa y Tahnuato, Michoacán. Semillas obtenidas de frutos de plantas positivas a CaLso (Camacho-Tapia *et al.*, 2011). Este trabajo apoya los resultados realizados por Shatters, (2008) quien detectó por PCR en tiempo real a CaLas en raíces de plántulas obtenidas de semilla de pomelo (*Citrus paradisi*) de árboles enfermos. Por su parte Hilf (2011) reportó la presencia de CaLas en las cubiertas de semillas de naranja dulce variedad "Sanguenelli" y de

pomelo variedad “Conners”. Esta información indica que la semilla puede constituir una fuente de inóculo primario de gran importancia y que habrá que considerar la termoterapia de semilla como un componente más en la estrategia de manejo de *Candidatus Liberibacter*.

En un estudio epidemiológico de la especie CaLso en el cultivo de chile jalapeño, la epidemia se ajustó al modelo logístico característico de enfermedades policíclicas y el desarrollo de la epidemia tardía se asoció con la presencia de *B. cockerelli*. Sin embargo, el inicio de la epidemia no se asoció con la presencia de insectos, por lo que se sugirió que las primeras plantas enfermas se generaron a partir de semillas infectadas (inóculo primario) y que posteriormente los insectos contribuyeron a la dispersión secundaria de la enfermedad (Camacho-Tapia *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal e insectos

La colecta del material biológico se realizó en los meses de agosto 2009 y junio de 2011, en Yurécuaro, Michoacán, localizado al noroeste del Estado, en las coordenadas 20°20' de latitud norte y 102°17' de longitud oeste. Se seleccionaron plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) de las variedades Tajín, Don Matías y Centella, con síntomas de variegado, escaldadura, variegado con nervaduras cloróticas, ampolla miento y deformación de la lámina foliar. Diez plantas con síntomas se sacaron con raíz y se trasplantaron en macetas que contenían suelo estéril y se mantuvieron en el invernadero para su posterior análisis.

Con una red entomológica se capturaron aproximadamente 300 adultos de *B. cockerelli* de plantas con síntomas putativas a la enfermedad y se transportaron al invernadero en una hielera. Los individuos se colocaron sobre 50 plantas de chile sanas variedad Early California y se mantuvieron en jaulas con malla entomológica para evitar su dispersión y la entrada de otros insectos. Las plantas utilizadas en esta prueba fueron analizadas por PCR para corroborar que fueran negativas a CaLso.

3.2 Extracción de ácidos nucleicos

Se realizó la extracción de ácidos nucleicos de las plantas colectadas, a partir de 0.2 g de tejido foliar de plantas de chile con síntomas de variegado con venas amarillas, amarillamiento y deformación de la lámina foliar con el método de CTAB 3% modificado por Rojas-Martínez (1998) y con el producto comercial DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN®. Se verificó la calidad del ADN en un gel de agarosa al 1% y la

cantidad se determinó por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop® ND-1 V 3.2.1).

La extracción de ADN de los insectos se realizó con el kit comercial, antes mencionado, en grupos de 10 insectos, siguiendo el procedimiento indicado para las muestras vegetales.

3.3 Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

3.3.1. Detección por PCR

Para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en las plantas y en los insectos vectores, que se encontraban en el invernadero, se usaron los iniciadores específicos OA2 (5'-GGGGGAATTCCCTCTTCACTTCTCAGAAT-3') y OI2c (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3') diseñados a partir de la región 16S rDNA y que amplifican un fragmento de 1,160 pb (Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009). Con el propósito de corroborar estos resultados a la par se usó el iniciador sentido CLi.po.F (5'-TACGC CCTGAGAAGGGGAAAGATT-3'), específico para detectar en otras especies de la misma familia, en combinación con iniciador OI2c, el fragmento que amplifica es de aproximadamente 1,069 pb (Secor *et al.*, 2009). Se usó una mezcla de reacción de 25 µL, buffer de PCR 1X, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 20 pm de cada iniciador, 1U Taq polimerasa y 100 ng de ADN.

La amplificación se realizó en un termociclador BIO-RAD®, modelo i-Cycler con una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 s para la desnaturalización, 62 °C por 30 s para la hibridación y 72 °C por 60 s para la extensión y un ciclo de 72 °C por 10 min para la extensión final. La visualización de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90 volts. Una vez finalizada la electroforesis se procedió a

teñir el gel con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 10 min) y finalmente se analizó con un fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®).

3.3.2. Detección por PCR en tiempo real

La detección de CaLso en el insecto vector se determinó por PCR en tiempo real múltiple con los iniciadores Lsof-HLBr/COX; con una mezcla de reacción de 25 μL : 1X buffer para PCR, 6.0 mM de MgCl_2 , 0.24 mM de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa, 240 nM de mezcla de los iniciadores Lsof/HLBr, 120 nM de la sonda HLB, 240 nM de mezcla de los iniciadores COX, 120 nM de sonda COX y 100 ng de ADN.

3.4 Secuenciación

El producto de PCR de plantas sintomáticas y *B. cockerelli*, se limpió con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, los productos se mandaron a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación de la UNAM. Se secuenció la región 16S rDNA en un secuenciador automatizado (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, APPLIED BIOSYSTEM®). Las secuencias fueron comparadas y depositadas en la base de datos de GenBank, utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.5 Transmisión por injerto

Se injertaron 20 plantas sanas de Chile (variedad Early California) de aproximadamente 45 días de edad con ramas de plantas de Chile mantenidas en el invernadero y que mostraban síntomas de variegado con venas cloróticas y

deformación de la lámina foliar. En la base de las ramas con síntomas se hizo un corte en doble bisel y se introdujeron en un corte longitudinal ligeramente inclinado hecho en el tallo de la planta receptora, el tejido injertado se sujeto con parafim; cada planta recibió de dos a tres injertos. Para conservar la humedad, las plantas se cubrieron una bolsa de plástico durante siete días y se mantuvieron en el invernadero a temperaturas diurnas de 25 a 30 °C hasta que mostraron síntomas.

3.6 Transmisión por el insecto *Bactericera cockerelli*.

Con una red entomológica se colectaron en campo adultos de paratrioza en campo que se encontraban sobre plantas de chile con los síntomas antes descritos y se llevaron al invernadero donde se colocaron en plantas de chile var. Early California con síntomas de variegado, éstas se mantuvieron dentro de una jaula de madera con tela organza. Los insectos se dejaron en estas plantas durante 30 días para aumentar su población. Las pruebas de transmisión se realizaron en dos ensayos, el primero consistió en una prueba masiva en la que se colocaron alrededor de 100 insectos adultos de la colonia establecida en invernadero en plantas enfermas y se colocaron en una jaula que contenía 50 plantas sanas, 48 hrs después los insectos fueron colectados y colocados en alcohol.

IV. RESULTADOS

Las 10 plantas con síntomas de variegado, nervaduras cloróticas y deformación de la lámina foliar colectadas en campo y mantenidas en invernadero (Fig. 2), fueron positivas para *Candidatus Liberibacter solanacearum* en la prueba de PCR con los iniciadores específicos OA2/OI2c y ClipoF/OI2c que amplificaron un fragmento de 1,160 pb (Figura 3).



Figura 2.- Síntomas asociados a *Candidatus Liberibacter solanacearum*. A) planta asintomática de chile (var, centella); B) planta mostrando variegado y disminución de la lámina foliar.

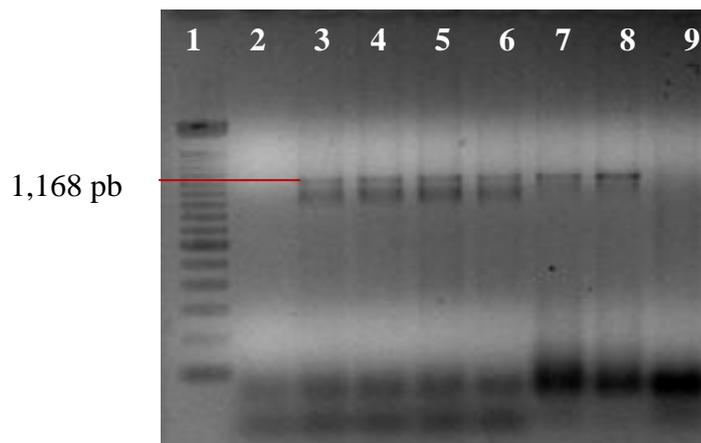


Figura 3.- Productos amplificados mediante PCR con los iniciadores OA2 y OI2c a partir de tejido de *Capsicum annuum* L. (var. centella) con diferentes síntomas. 1, Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®); 2, Planta asintomática; 3, hoja con albinismo; 4, hoja con variegado; 5, hoja con variegado y venas amarillas; 6, hoja con escaldadura; 7, hoja con ampollamiento y deformación de la lámina foliar; 8, hoja con variegado y deformación de la lámina foliar y 9, negativo (agua inyectable estéril).

4.1 Secuenciación y análisis filogenético

La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en el GenBank para *Candidatus Liberibacter solanacearum* indicó un 98% de similitud entre éstas. Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los números de acceso HQ379735, HQ379736 y HQ379737. Estas secuencias se usaron para realizar un análisis filogenético entre las diferentes especies de *Candidatus Liberibacter* en la fig. 4 en este árbol se puede observar que las secuencias obtenidas en este estudio (1, 2 y 3) son muy similares a otras secuencias de *CaLso* depositadas previamente en el banco de genes del NCBI, por lo que se encuentran agrupadas en el mismo ramal. En este mismo análisis filogenético se observa que la especie *Ca. Lpsyllauros* está muy relacionada con *CaLso*.

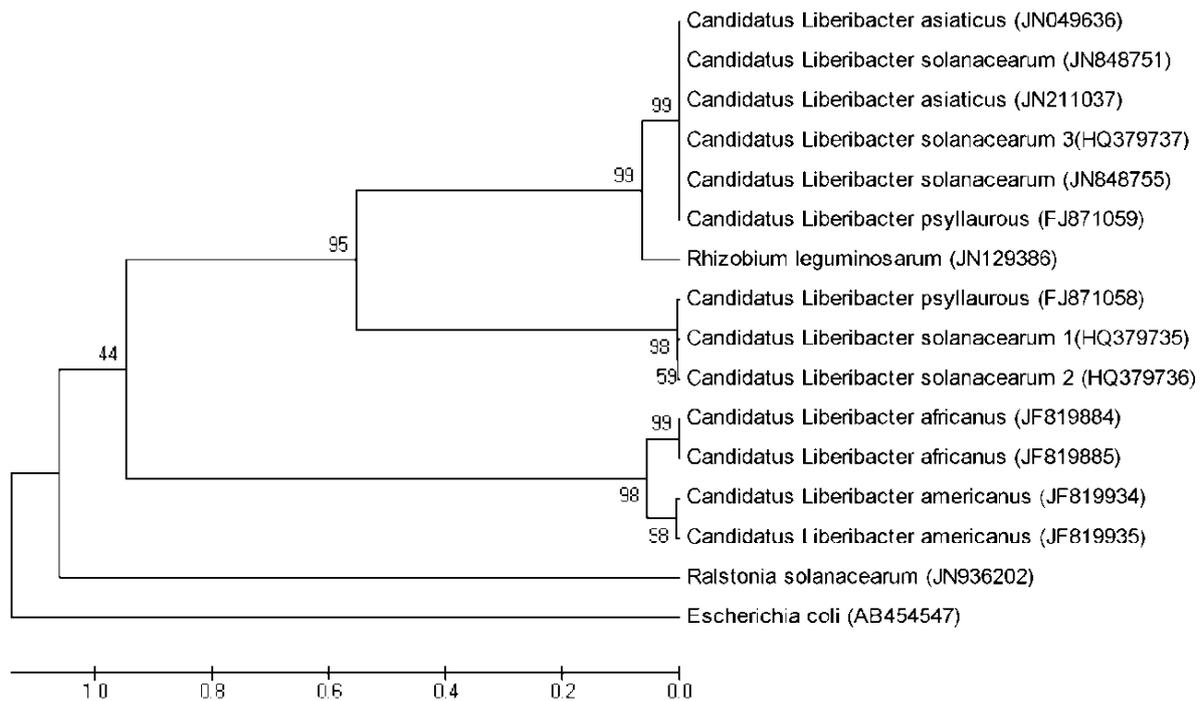


Figura 4. Árbol filogenético de la región 16S rRNA de las bacterias pertenecientes al género “Candidatus Liberibacter” del grupo alpha de la subdivisión *Proteobacteria* y las especies *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum* y *Rhizobium leguminosarum* utilizadas como raíz.

4.2 Transmisión por injerto

Las plantas injertadas con tejido de ramas con síntomas de variegado, mostraron el mismo síntoma y amarillamiento a los 90 días después de la inoculación (Fig. 5) y al ser sometidas a análisis mediante PCR resultaron positivas para *CaLso*.



Fig. 5. Plantas injertadas (A y B) mostrando variegado a los 90 días después de la inoculación.

4.3 Transmisión por *Bactericera cockerelli*.

La transmisión de CaLso se detectó por PCR (iniciadores OA2/OI2c) (Fig. 6) y PCR en tiempo real múltiple (iniciadores Lsof-HLBr/COX) (Cuadro 2), en 50 plantas expuestas a psílidos previamente alimentados en plantas de Chile con síntomas. Los síntomas desarrollados en las plantas expuestas a los psílidos fueron deformación de la lámina foliar variegado y tonalidad morada en entrenudos y venas.

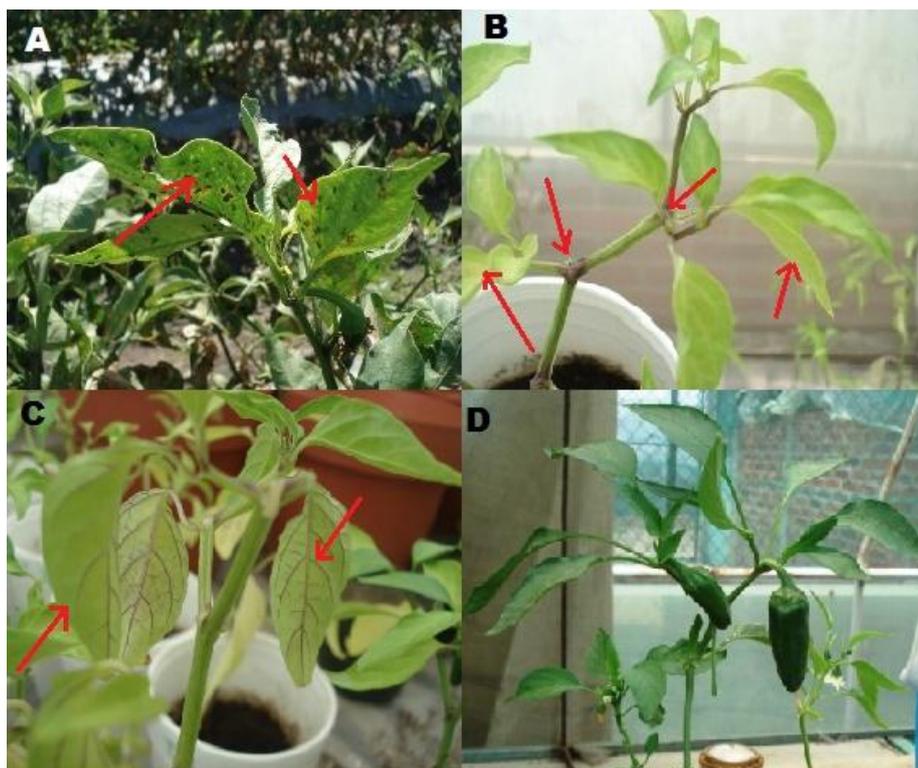


Fig. 6. Transmisión por psílidos. A) Dónde se observan psílidos alimentándose de plantas con sistemas de variegado; B). Planta expuesta al insecto mostrando amarillamiento y entrenudos morados; C) planta expuesta al insecto mostrando nervaduras moradas; D) planta testigo.

Muestra	Resultado	Ct
negativo (H₂O)	Negativo	0
Chile	Positivo	33.77
Chile	Positivo	32.22
Chile	Positivo	20.47
Chile	Positivo	31.1
Chile	Positivo	31.8
Chile	Positivo	35.82
Chile	Positivo	32.92
Chile	Negativo	0
Jitomate	Negativo	0
positivo (insecto)	Positivo	25.14

Cuadro 2. Resultados de PCR-TR de transmisión por psílidos para *CaLso*.

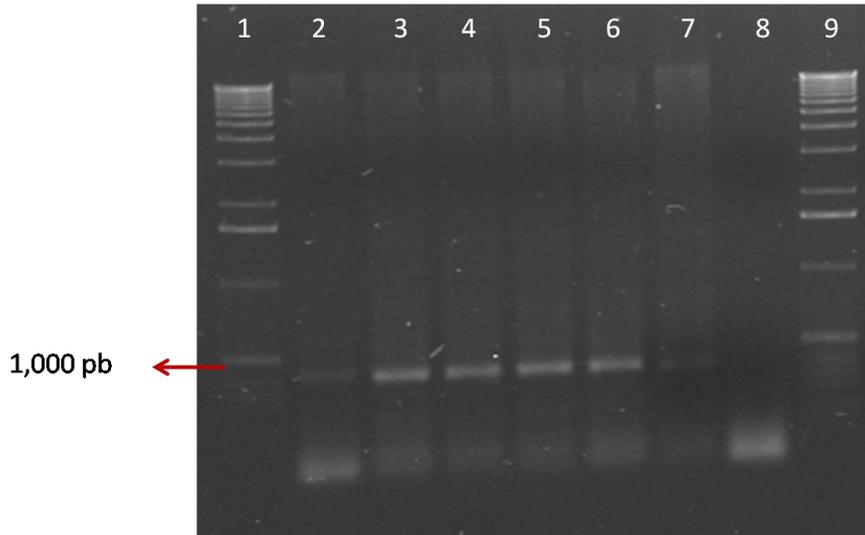


Figura 7.- PCR con los iniciadores OA2 y OI2c de plantas de Chile inoculadas con psílidos previamente alimentados en plantas infectadas con *Ca. Liberibacter solanacearum*. Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); 2-6 plantas de Chile que mostraron amarillamiento y nervaduras en tonalidad morada; 7, Positivo (clona de insecto positivo a *CaLso*); 8, negativo (agua inyectable estéril).

V. DISCUSIÓN

La sintomatología observada en plantas de Chile en este trabajo es diferente a la reportada por Liefiting *et al.*, (2008, 2009). Ellos mencionan que en solanáceas *Candidatus Liberibacter* en solanáceas ocasiona hojas deformes de color verde pálido o amarillo, tallos cortos, caída de flores y muerte repentina de diferentes partes de la planta. En la presente investigación los síntomas consistieron en moteado, venas cloróticas y deformación del fruto; tales síntomas son similares a los reportadas en cítricos (Garnier *et al.*, 2000 y da Graca y Korsten, 2004) y Chile (Camacho-Tapia *et al.*, 2011). Estos últimos investigadores mencionan que el desarrollo de síntomas de variegado, venas cloróticas y deformación del fruto, va a depender del estado fenológico de la planta, las condiciones ambientales y de la variedad de Chile.

Comúnmente la detección de la bacteria se realiza mediante PCR mientras que para insectos se hace mediante PCR en tiempo real usando los iniciadores específicos OA2, Cli.po.F, LsoF/OI2c (Liefiting *et al.*, 2009; Secor *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Munyaneza *et al.*, 2010) y Lsof-HLBr/COX respectivamente. En esta investigación los iniciadores OA2/OI2c no fueron específicos ya que las secuencias generadas al compararse en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mostraron un 90% de similitud con cloroplastos de plantas de Chile; por otro lado se ha observado que con iniciadores específicos como Lso TX 16/23 F/R y Lso adk F/R, diseñados a partir de la región conservada del rDNA 16 y 23 S (Ravindran *et al.*, 2011) de CaLso, al ser utilizados para la detección de esta bacteria en plantas de papa con síntomas de zebra chip, se obtiene un solo fragmento pues se ha observado que este par de iniciadores son mucho más específicos comparados con LsoF/OI,2 pero en Chile

con síntoma de variegado se obtienen muchos fragmentos inespecíficos (datos no publicados); por lo anterior, no se recomienda el uso de más de un par de iniciadores para detectar a la bacteria en este cultivo.

La transmisión de CaLso mediante injerto fue exitoso debido a que la bacteria es habitante del floema de la planta (Bové, 2006). La transmisión se dio sin ningún problema, observándose el síntoma típico de variegado que portaban las plantas enfermas colectadas en campo.

En la prueba de transmisión por *Bactericera cockerelli* se logró reproducir el síntoma de variegado y se confirmó la presencia de la bacteria en las plantas enfermas, corroborando así que es vector de CaLso, como lo indican Liefting *et al.* (2008,2009) y Hansen *et al.* (2008).

La secuenciación de los productos obtenidos de esta investigación confirman que la bacteria en estudio corresponde a *Candidatus Liberibacter solanacearum* ya que cuando se compararon en la base de datos del NCBI se observó una similitud del 97% con las especies de CaLso que se encuentran depositadas en dicha base. El análisis filogenético indicó que las secuencias generadas en esta investigación se encuentran en el mismo grupo del género *Candidatus Liberibacter* y en la misma rama que otras secuencias depositadas en la base de datos del Genbank correspondientes a CaLso. En la literatura varios investigadores mencionan la existencia de otra especie de *Candidatus Liberibacter* transmitida por *B. cockerelli* conocida como *Candidatus Liberibacter psyllauros* (Hansen *et al.*, 2008; Munyaneza *et al.*, 2010; EPPO 2011) asociada a la enfermedad ZC. Sin embargo, en la presente investigación los análisis filogenéticos realizados indican que CaLso y CaLps son la misma especie (Munyaneza *et al.*, 2010; EPPO 2011). Duan *et al.* (2009) secuenciaron por primera vez el genoma completo de CaLas y mencionan

que los miembros del género al que pertenece esta bacteria están estrechamente relacionados con los de la familia *Rizhobiaceae*, lo cual es sustentada por Lin *et al.* (2011), quienes secuenciaron el genoma completo de CaLso.

VI. CONCLUSIÓN

La transmisión positiva del variegado de Chile por injerto y por *B. cockerelli* y la confirmación de la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, mediante PCR en las plantas inoculadas y en los insectos utilizados en la prueba de transmisión, indican que esta bacteria es el agente causal del variegado de Chile.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Aubert B**, Grisoni M, Villemin M. and Rossolin G. 1996. A case study of Huanglongbing (greening) control in reunion. pp: 276-278. *In*: da Graça JV, Moreno P and Yokomi KR. (eds.). Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California, Riverside.
2. **Ayres JA** and Yamamoto PT. 2007. Survey of HLB (Greening) and control strategies in Brazil. FUNDECITRUS. Citrus Expo 2007-Florida.
3. **Bové MJ**. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
4. **Brlansky HR**, Dewdney MM, Rogers EM and Chung RK. 2009. Florida citrus pest management guide: Huanglongbing (Citrus greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA. 225p.
5. **Butler CD**, Byrne FJ, Keremane ML, Lee RF and Trumble JT. 2011. Effects of insecticides on behavior of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae) and transmission of *Candidatus Liberibacter psyllaurous*. *Journal of Economic Entomology* 104: 586-594.
6. **Camacho-Tapia M**. 2010. Epidemiología del variegado del chile (*Capsicum annum*) en la región de Yurécuaro, Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 69 p.
7. **Camacho-Tapia M**, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Hernández-Deheza MG, Carrillo-Salazar JA, Rebollar-Alviter A y Ochoa-Martínez DL. 2011. Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *Journal of Plant Pathology* 93: 331-335.

8. **Cranshaw** WS. 1993. Annotated bibliography of potato/tomato psyllid *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Homoptera: Psyllidae). Pub. TB93-5. Colorado State University, Fort Collins. Agricultural Experiment Station. USA. 52 p.
9. **da Graca** JV. 1991. Citrus greening disease. Annual Review of Phytopathology 29:109-136
10. **da Graca** JV and Korsten L. 2004. Citrus Huanglongbing: Review, present status and future strategies. Diseases of Fruits and Vegetables 1: 229-245.
11. **da Graca** JV. 2008. Biology, History and World Status of Huanglongbing. pp:7. *In: memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Cítricos Candidatus Liberibacter spp) y el psílido asiático de los cítricos (Diaphorina citri)*. Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México.
12. **Das** KA. 2004. Rapid detection of Candidatus Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) disease using PCR. Current Science 87:1183-1185.
13. **Duan** Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y and Gottwald T. 2009. Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Obtained Through Metagenomics. Molecular Plant-Microbe Interactions 22: 1011-2020.
14. **EPPO**, European and Mediterranean Plant Protection Organization 2011. www.eppo.org (consulta, octubre 2011).
15. **García** C. 2006. Huanglongbing (HLB Greening). Dirección de Vigilancia y Monitoreo. (En línea). Disponible en [http:// www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar) (consulta 07 noviembre 2011).
16. **Garnier** M, Jagoueix-Eveillard S, Cronje PR, Le Roux HF and Bové JM. 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.

17. **Garzón-Tiznado** JA. 2003. El pulgón saltador o la paratrioza, una amenaza para la horticultura de Sinaloa. Pp: 9-12. *In*: Memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* (Sulc.) como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México.
18. **Halbert** S and Manjunath LK. 2004. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87:330-353.
19. **Hall** DG. 2008. Biology, History and World Status of *Diaphorina citri*. Pp:11. *In*: memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Cítricos *Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México.
20. **Hansen** AK, Trumble JT, Stouthamer R and Paine T. 2008. A new Huanglongbing species, "*Candidatus liberibacter psyllauros*", found to infected tomato and potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Applied and Environmental Microbiology 74: 5862-5865.
21. **Hilf** ME. 2011. Colonization of citrus seed coats by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*': Implications for seed transmission of the bacterium. Phytopathology 101:1242-1250.
22. **Jagoueix** S, Bové JM and Garnier M. 1994. The Phloem-Limited Bacterium of greening disease of citrus is a Member of the α subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 44: 379-386.
23. **Jepson** SB. 2008. Citrus Greening Disease (Huanglongbing). OSU Plant Clinic, Oregon State University. Corvallis, OR, USA. Corvallis OR 97331-2903.

24. **Khairulmazmi A**, Kamaruzaman S, Habibuddin H, Jugah K and Syed O. 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.
25. **Lee HA**. 1921. The relation of stocks to mottled leaf of citrus leaves. *Philippines Journal of Science* 18: 85-95.
26. **Le roux HF**, Van Vuuren and Manicom BQ. 2006. Huanglongbing in South Africa. pp: 5-9. *In: Proceedings of the Huanglongbing-greening International Workshop*. Ribeirao Preto, Soa Paulo, Brazil.
27. **Li W**, Abad JA, French-Monar RD, Rascoe JA, Wen A, Gudmestad NC, Secor GA, Lee IM, Duan Y and Levy L. 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in potato plants with zebra chip. *Phytopathology*. 78:59-65.
28. **Liefting WL**, Perez-Egusquiza CZ, Clover GRG and Anderson JAD. 2008. A new *Candidatus Liberibacter* species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92:1474.
29. **Liefting WL**, Sutherland WP, Ward IL, Paice LK, Weir SB and Clover GG. 2009. A new "*Candidatus Liberibacter*" species associated with diseases of Solanaceous crops. *Plant Disease* 93:208-214.
30. **Lin H**, Lou B, Glynn JM, Doddapaneni H, Civerolo E. 2011 The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *PLoS ONE* 6: e19135. doi:10.1371/journal.pone.0019135
31. **Ling KS**, Lin H, Lewis-Ivey ML, Zhang W and Miller AS. 2011. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' naturally infecting tomatoes in the State of Mexico, Mexico. *Plant Disease*. 95:1026.

32. **Lopes** AS, Frare FG, Bertolini E, Cambra M, Fernandes GN, Ayres JA, Marin RD and Bové MJ. 2009. Liberibacter associated with citrus huanglongbing in Brazil: "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" is heat tolerant, "*Ca. L. americanus*" is heat sensitive. *Plant Disease* 93:257-267.
33. **Martínez** Y, Llauger R, Batista L, Luis M, Iglesia A, Collazo C, Peña I, Casín JC, Cueto J and Tablada M. 2009. First report of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" associated with Huanglongbing in Cuba. *Plant Pathology* 58: 389.
34. **McClellan** APD and Schwarz RE. 1970. Greening or blotchy-mottle disease of citrus. *Phytophylactica* 2: 177-194.
35. **Meyer** MJ, Hoy AM and Singh R. 2007. Low incidence of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) populations between Nov 2005 and Jan 2006: relevance to management of citrus greening disease in Florida. *Florida Entomologist* 90: 394-397.
36. **Munyaneza** JE, Crosslin JM and Upton JE. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "Zebra Chip," a new potato disease in Southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100:656-663.
37. **Munyaneza** JE, Sengoda GV, Crooslin JJ, Garzon T and Cardenas GV. 2009. First report of *Candidatus* Liberibacter solanacearum in tomato plants in Mexico. *Plant Disease* 93:1076.
38. **Munyaneza** JE, Fisher WJ, Sengoda GV and Garczynski F. 2010. First report of "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" associated with psyllid affected carrots in Europe. *Plant Disease* 94: 639.
39. **Munyaneza** JE, Sengoda GV, Buchman LJ and Fisher WT. 2011. Effects of temperature on "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" and zebra chip potato disease symptom development. *Phytopatology* DOI: 10.1094/PDIS-03-11-0185.

40. **Murray** RGE and Schleifer KH. 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:174-176.
41. **Murray** RGE and Stackebrandt E. 1995. Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described Procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:186-187.
42. **Nachappa** P, Austin SA and Tamborindeguy C. 2011. Effect of “*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*” on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) on tomato. *Phytopathology* DOI: 10.1094/PHYTO-03-11-0084.
43. **Pels-Stelinsky** KS, Bransky RH, Ebert TA and Rogers ME. 2010. Transmission Parameters for *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Arthropods in Relation to Plant Disease* 103: 1531-1541.
44. **Pierson** AE, Levy J, Ravindran A, Gross D and Tamborindeguy C. 2011. Translocation of “*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*”, the zebra chip pathogen, in potato and tomato. *Phytopathology* DOI: 10.1094/PHYTO-04-11-0121.
45. **Plesch** DJ. 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. Pub 446. Montana. Agricultural Experimental Station. USA. 95p.
46. **Ravindran** A, Levy J, Pierson E. 2011. Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, *Candidatus* *Liberibacter solanacearum*. *Plant Disease* 95:1542-1546.

47. **Raychaudhuri** SP, Nariani TK, Ghosh SK, Viswanath SM and Kumar D. 1974. Recent studies on citrus greening in India. Pp: 53-57. *In*: Proceedings of the 6th Conference of International Organization of Citrus Virologist University of Florida Press, Gainesville.
48. **Robles** GP, Sánchez AH y Delgadillo VI. 2009. Programa Nacional Para la Detección del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) En México. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA. www.concitver.com (consulta octubre 2011).
49. **Sechler** A, Schuenzel EL, Cooke P, Donnua S, Thaveechai N, Postnikova E, Stone AL, Schneider WL, Damsteeqt VD and Schaad NW. 2009. Cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', 'Ca. L. africanus' and 'Ca. L. americanus' associated with huanglongbing. *Phytopathology*. 99:480-486.
50. **Secor** GA, Rivera VV, Abad JA, Lee I-M, Clover GRG, Liefing LW, Li X and De Boer SH. 2009. Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93:574-583.
51. **SAGARPA**, Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2009 y 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasica.gob.mx> (consulta octubre 2011).
52. **Shatters** JrRG. 2008. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus seedlings germinated from Florida seed. USDA, ARS, U. S. Horticultural Research Laboratory, Subtropical Insects Research Unit, Fort Pierce, FL 34945. <http://www.plantmanagementnetwork.org> (consulta octubre 2011).
53. **Teulon** DAJ, Workman PJ, Thomas JL and Nielsen M-C. 2009. *Bactericera cockerelli*: incursion, dispersal and current distribution on vegetable crops in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 62:136-144.

54. **Teixeira** CD, Saillard C, Eveillard S, Danet LJ, Da Costa P, Ayres JA and Bové J. 2005. "Candidatus *Liberibacter americanus*", associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1857–1862.
55. **Van der Merwe** AJ and Andersen FG. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Farming in South Africa*. 12:439-440.
56. **Vega-Gutiérrez** MT, Rodríguez-Maciel JC, Díaz-Gómez O, Bújanos-Muñiz R, Mota-Sánchez D, Martínez-Carrillo JL, Lagunés-Tejeda A y Garzón-Tiznado JA. 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas de salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozide). *Agrociencia* 42:463-471.
57. **Xu** C-F, Xia Y-H, La K-B and Ke C. 1988. Further study of the transmission of citrus Huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Pp: 243-248. *In*: Timmer LW, Garnsey MS, and Navarro L. (eds.). Proc. 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA.
58. **Zhao** XY. 1981. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) - a review. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 1:466-469.
59. **Zhang** MQ, Powell CA, Zhou LJ, He ZL, Stover E and Duan YP. 2011. Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in planta. *Phytopathology* 101:1097-1103.