

## ANÁLISIS DE INFECTIVIDAD EN *Diaphorina citri* KUWAYAMA COLECTADAS EN CITRICOS DE TRASPATIO EN URUAPAN MICHOACÁN, MÉXICO

Norma Sonia Martínez-Hernández<sup>1</sup>, Francisco Javier Avendaño-Gutiérrez<sup>2</sup>, Margarita Vargas-Sandoval<sup>2</sup>, Martha Elena Pedraza-Santos<sup>2</sup>, Patricia Delgado-Valerio<sup>2</sup>, Pedro Antonio García-Saucedo<sup>2</sup>, Ignacio Vidales-Fernandez<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Estudiante tesista y <sup>2</sup>Profesores de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlin S/N. Colonia Viveros. C. P. 60090. Uruapan, Michoacán. [normis\\_7@hotmail.com](mailto:normis_7@hotmail.com) [javieravend@gmail.com](mailto:javieravend@gmail.com), [vargasmarga@hotmail.com](mailto:vargasmarga@hotmail.com) [marelpesa@yahoo.com.mx](mailto:marelpesa@yahoo.com.mx), [garsapan@gmail.com](mailto:garsapan@gmail.com)

**RESUMEN:** *Diaphorina citri* Kuwayama, está presente en México y es la responsable de transmitir la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., por lo tanto los objetivos fueron: 1) Conocer el estado infectivo de insectos adultos y 2) Conocer el área geográfica con mayor infestación. El trabajo se realizó en Uruapan, Michoacán, México; de diciembre de 2012 a febrero de 2013. La colecta de insectos adultos fue en árboles cítricos en calles y avenidas. Se realizaron estudios de taxonomía para confirmar la especie. Para identificar a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) se utilizaron los iniciadores HLBas, HLBr y la sonda HLBp. El resultado fue indeterminado a la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), e indica que la bacteria no existe. Al analizar estadísticamente la densidad poblacional de insectos por árbol, destacan tres sitios de alto riesgo fitosanitario: Avenida las Américas, Calzada Benito Juárez y Avenida Latinoamericana.

Palabras clave: Psílido, Bacteria, Infestación, Patogenicidad.

### Pathogenicity analysis in *Diaphorina citri* collected in citrus of backyard Uruapan Michoacan, Mexico

**ABSTRACT:** *Diaphorina citri* is present in Mexico and is liable for transmitting the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp, therefore the objectives were: 1.) Recognize the infection status of adults insect and 2). Know the geographical area with major infestation. The work was done in Uruapan, Michoacán, of December 2012 to February 2013. The collection of adult insects was in citrus trees on streets and avenues. Taxonomic studies were performed to confirm the species. To identify the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAS) the HLBas, HLBR HLBp probe and primers were used. The result was indeterminate test Chain Reaction Polymerase real-time (qPCR), and indicates that the bacteria doesn't exist. By statistically analyzing the population density of insects per tree, there are three places of high phytosanitary risk: The Americas avenue, Calzada Benito Juarez and Latinoamericana Avenue.

Key words: Psyllid, bacterium, infestation, pathogenicity.

### Introducción

La citricultura en México representa una actividad agrícola de importancia económica ya que se cultivan 540 000 ha en 27 estados de la República, los principales estados productores son: Michoacán, Veracruz, Oaxaca y Colima (SIAP, 2012). La producción de cítricos en el país ocupa el cuarto lugar a nivel mundial, sin embargo este cultivo se ve seriamente amenazado por el Huanglongbing (HLB), problema fitosanitario detectado en México en Julio de 2009 (NAPPO, 2010), esta enfermedad es causada por *Candidatus Liberibacter*, una bacteria gram negativa (Bove, 2006), que se transmite por medio de vectores de dos géneros importantes: *Diaphorina citri* Kuwayama 1908 y *Trioza erytreae* Del Guercio (1918), por lo tanto, una de las acciones importantes, para evitar la infección de árboles de cítricos, es el control adecuado del vector ya que actualmente *D. citri* se encuentra en todas las zonas citrícolas de México, situación que obligó a las autoridades fitosanitarias a emprender una campaña nacional con la finalidad de controlar al vector, evitar su desarrollo y la diseminación del patógeno, por

lo tanto los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Conocer el estado infectivo de insectos adultos y 2) Conocer el área geográfica de la ciudad de Uruapan, Michoacán, con mayor infestación de *D. citri*.

## Materiales y Métodos

El trabajo de campo se realizó en las principales vías públicas de la ciudad de Uruapan, Michoacán durante diciembre de 2012 a febrero de 2013, (Cuadro 1). Se calculó el tamaño de muestra, se definió el método de muestreo y análisis de varianza de acuerdo con Morales (2012). El modelo experimental fue: y el diseño  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$  experimental completamente al azar. De acuerdo con el resultado de la fórmula se realizó el cálculo del tamaño de muestra, se muestrearon 63 árboles con presencia de síntomas parecidos al HLB, en ellos se colectaron 592 insectos adultos de *D. citri* que se conservaron en alcohol a 70%. En colaboración con la Sociedad de Producción Rural de Responsabilidad Limitada de Capital Variable BIO-CHRYSS, en su laboratorio se realizaron los estudios de taxonomía para tener la confiabilidad que se trataba de *Diaphorina citri*. Posteriormente en la Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal (ENECuSaV) El Marques, Querétaro, se realizaron los estudios de patogenicidad reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) presencia-ausencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter*, conforme al siguiente procedimiento: se extrajo el ADN en forma individual a colectiva ya que los psílidos fueron colocados de 1 a 17 por microtubo, enseguida se colocaron en papel absorbente para su secado, después de retirarlos del alcohol a 70% con un embudo de papel se colocaron en un microtubo de 1.5  $\mu$ L, previamente etiquetados para posteriormente cada muestra compuesta por 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 13 y 17 insectos respectivamente, se agregaran 350  $\mu$ L de PBS1X pH 7.2 (fosfato de potasio 50mM, NaCl 150 mM), 500 $\mu$ l de la solución AP1 y 100  $\mu$ L AP2 de acuerdo con el kit de extracción de ADN para sangre y tejido Axygen (AxyPrep™ BloodGenomic DNA Miniprep kit). Las muestras se homogenizaron en un disruptor de tejidos por 30 segundos, a continuación las muestras se centrifugaron durante 8 minutos a 14 000 rpm, se preparó una columna y se etiquetaron tubos de recolección de 1.5 mL se colocó el sobrenadante en un nuevo micro-tubo con columna a centrifugar durante un minuto a 800 rpm se retiró el sobrenadante, enseguida se agregaron 700  $\mu$ L de la solución AW2 centrifugado durante 1 minuto a 800 rpm desechando el sobrenadante y por última vez se agregaron 300  $\mu$ L de AW2 se realizó una centrifuga durante 2 minutos a 14 000 rpm. Se retiró la columna con cuidado de no tocar el precipitado. En un tubo nuevo previamente etiquetado se transfirió la columna de cada muestra, se agregaron 35 $\mu$ L del Buffer de extracción TE precalentado a 65°C se centrifugó dos veces por 1 minuto a 800 rpm, se desechó la columna y se almacenó el ADN a -20°C. El ADN se suspendió en 40 $\mu$ L del Buffer PCR 1X (10 Mm Tris HCL, 1mM EDTA Na2). Se utilizaron 2 $\mu$ L del ADN para la prueba de qPCR y para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) se utilizaron los iniciadores HLBas (TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG), HLB<sub>r</sub> (GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG) y la Sonda HLB<sub>p</sub> (FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/BHQ-1) diseñados por (Li *et al.*, 2006). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador CFX96 (Bio- Rad) en un volumen de 25 $\mu$ L con los siguientes reactivos: Buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 6.0 mM, dNTP's 0.24 mM Taq polimerasa una unidad (Invitrogen), 240nM de cada primer y 120nM de la Sonda. El programa de amplificación consistió en 95 °C por 20 segundos de 40 ciclos por 1 segundo y 58 °C por 40 segundos, de acuerdo al protocolo de HLB (USDA *et al.*, 2012).

Cuadro. 1. Referencias geográficas de la colecta de *D. citri*, en Uruapan, Michoacán, 2012.

Vía pública	Insectos Colectados	Latitud Norte	Longitud Oeste
Manuel Pérez Coronado.	29	19° 23' 51.56''	102° 03' 27.84''
Libramiento Oriente	21	19° 27' 22.67''	102° 03' 67.6''
Vías del tren	21	19° 24' 49.72''	102° 02' 59.09''
Avenida Insurgentes	14	19° 25' 21.86''	102° 01' 54.92''
Avenida Latinoamericana	40	19° 24' 21.22''	102° 03' 09.69''
Camellón Avenida Latinoamericana	21	19° 24' 22.51''	102° 03' 12.83''
Infonavit Aeropuerto	29	19° 23' 27.7''	102° 02' 45.71''
Calzada Benito Juárez	132	19° 25' 63''	102° 03' 34.67''
Colonia Emiliano Zapata	117	19° 23' 34.15''	102° 03' 16.01''
Avenida Américas	17	19° 24' 55.43''	102° 03' 11.13''
Avenida Chiapas	13	19° 25' 16.76''	102° 02' 51.78''
Colonia La Cedrera	18	19° 24' 49.58''	102° 03' 00.68''
Colonia Los Ángeles	16	19° 24' 02.73''	102° 02' 59.62''
Otros Sitios	104	19° 25' 09.33''	102° 03' 00.59''
<b>Total</b>	<b>592</b>		

**Resultados y Discusión**

En la confirmación taxonómica de *D. citri*, se consideraron criterios como la posición del vector sobre el hospedante, así como la morfología de las antenas, alas, geneas, y abdomen; estos resultados coinciden con lo publicado por García *et al.*, (2010). De acuerdo con el análisis de varianza los resultados fueron significativos (Cuadro 2), y conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey al 5% (Cuadro 3), de los 28 tratamientos (sitios de colecta), existen tres agrupaciones de las cuales destaca: a) Avenida Las Américas, cabe señalar que los árboles ubicados en este sitio cuentan con las características que favorece el resguardo del insecto y su posible diseminación por el movimiento de los arboles ocasionado por los autos que transitan; b) La Calzada Benito Juárez cuenta con árboles de cítricos que rodean a la zona del mercado conocido como “La Charanda”, el cual destaca por su demanda en ventas de fruta cítricas, este lugar es importante en la colonización de *D. citri* por el posible traslado de cítricos infestados donde el insecto se resguarda en los arboles de las vías públicas. De acuerdo con Lopes y Frare (2008); Halbert *et al.*, (2010), señalan que la diseminación del insecto vector del HLB es el resultado de la capacidad innata para desplazarse, por el impulso proporcionado con el viento y por el efecto de las actividades del humano, este último, a su vez, está integrado por tres componentes: propagación de cítricos, transporte de fruta cítrica fresca a granel y transporte de plantas y c) La ultima agrupación corresponde a la Avenida Latinoamericana que es una de las principales salidas a la Ciudad de Morelia, y de acuerdo con la metodología de análisis de riesgo para plagas de importancia cuarentenaria existen dos enfoques principales, el primero corresponde a un análisis de ruta, basado en las vías de introducción de un país a otro el segundo estimar el potencial de distribución de la plaga en una área determinada (Auclair *et al.*, 2005).

Finalmente se representan los resultados de la amplificación de PCR en tiempo real y se observan los valores obtenidos en la prueba de patogenicidad realizada a *D. citri*, que resultó ser negativo Ct > 35 (Fig. 1), en el gráfico los valores están representados con líneas de color azul y estiman que están por debajo del umbral (línea recta de color azul), lo cual indica que el ADN no contiene incremento de fluorescencia y por ello no manifiesta un aumento exponencial, este resultado difiere de los datos obtenidos de los testigos procedentes del estado de Colima, México, que resultaron

positivos a *Candidatus Liberibacter*, y en el gráfico están representados por las rectas color rojo. De acuerdo con el protocolo de diagnóstico para la detección de HLB de USDA (2012) considera muestras positivas a las que presentan valores de ciclo umbral (Ct) > 32, sin embargo valores > 32 y < 36 se consideran indeterminadas y negativas aquellas que presentan valores mayores que 37.

Cuadro 2. Resultados del análisis de varianza de *D. citri* colectados en cítricos sobre las avenidas públicas en Uruapan, Michoacán, México.

Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	Pr. > F
Tratamiento	28	700.65079365	25.023249	3.75	0.0001
Error	35	233.66666667	6.6761909		
Total	63	R cuadrada		C. V	Media
corregido		0.749 907		27.636 92	9.349 206 35

Cuadro 3. Pruebas de Tukey para medias de la población total de *D. citri* colectadas en cítricos de traspatio, Uruapan, Michoacán.

Grupo Tukey	Media	N	Tratamiento	Grupo Tukey	Media	N	Tratamiento
A	17.000	1	Av. Americas	B	8.000	1	Los Angeles
B	14.667	9	Calzada Benito J.	B	8.000	1	Paraguay
B	13.333	3	Av. Latinoamericana	B	8.000	1	Venustiano Carranza
B	10.500	2	Paseo L. Cardenas	B	7.250	4	Infonavit aeropuerto
B	10.500	2	Av. Chiapas	B	7.000	1	Calle Niza
B	10.500	2	Camellon Av. Latino	B	7.000	1	Calle Querétaro
jj	10.500	2	Libramiento Oriente	B	7.000	1	Calle osio
B							
B	10.000	1	Cedrera	B	7.000	1	Calle Morelos
B	10.000	1	San Juan Bautista	B	6.000	1	Calle Constitución
B	10.000	1	Gabriel Zamora	B	6.000	1	Calle La joyita
B	9.750	12	Colonia E. Zapata	B	6.000	1	C. Rodilla del diablo
B	9.000	1	Libramiento Oriente	B	4.667	3	Avenida Insurgentes
B	9.000	1	Juan Delgado	B	4.333	6	Manuel P. Coronado
B	8.000	1	Tipitín	B	4.000	1	Calle Bogotá

Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente según Tukey al 5%.

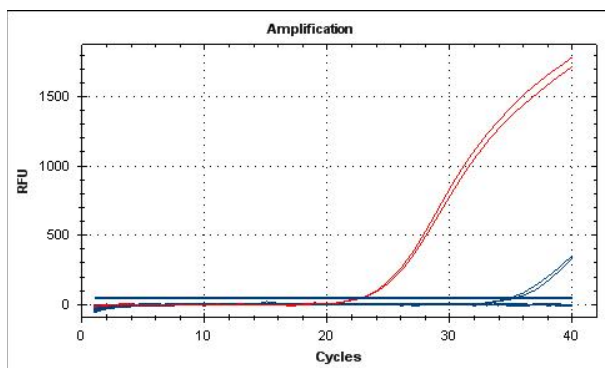


Figura 1. Valores obtenidos en la prueba de patogenicidad en tiempo real en *D. citri*.

## Conclusiones

Los estudios de taxonomía realizados en la caracterización del insecto colectado en esta prueba, confirmaron que se trata de *Diaphorina citri* Kuwayama.

El estudio de infectividad realizado en adultos de *Diaphorina citri* fue negativo a la presencia de *Candidatus Liberibacter*. En Uruapan sobresalen tres sitios geográficos con elevado riesgo fitosanitario, los cuales son: Av. Las Américas, Calz. Benito Juárez y la Av. Latinoamericana.

## Agradecimientos

Al Dr. Javier Trujillo Arriaga, Director General de Sanidad Vegetal, Al M.C. Bernardo Reyes González, Ing. Elena Iobanna Alanis Martínez, a BIO-CHRY S.P.R. de R.L. de C.V. por el apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo.

## Literatura Citada

- Auclair, A. N. D., G. Fowler, M.K. Hennessey, A. T. Hogue, M. Keena, D.R. Lance, R.M. McDowell, D. O. Oryang, and A. J. Sawyer. 2005. Assessment of the risk off introduction of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) in municipal solid waste from the quarantine area of New York City to landfills outside of the quarantine area: A pathway analysis of the risk of spread and establishment. *J. Econ. Entomol.* 98: 47-60.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology.* 88 (1) 7-37.
- García-Pérez F., Ortega-Arenas L. D., Lomelí-Flores J. R., Romero Nápoles J., López-Arroyo, J. I. y González-Hernández, A. 2010. Caracterización morfológica de psílicos asociados a cítricos en Cazonas, Veracruz. 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México–2010. p. 19-24.
- Halbert, S.E, Manjunath K.L., Ramadugu, C., Brodie, M. W., Webb, S. E. and Lee, R. F. 2010. Trailers transporting oranges to processing plants move Asian Citrus Psyllids. *Florida Entomologist.* 93 (1): 33-38.
- Li, W., Hartung, J. S., and Levy, L. 2006. Quantitative real-time PCR detection and quantification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiology Methods.* 66:104-115.
- Lopes, S. A. and Frare, G. F. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to *Candidatus Liberibacter americanus*. *Plant Disease.* 92:21-24.
- Morales, V. P. Estadística aplicada a las Ciencias Sociales: Tamaño necesario de la muestra ¿Cuántos sujetos necesitamos? (En línea). Disponible en: <http://www.upcomillas.es/personal/peter/investigacion/Tama%F1oMuestra.pdf> (fecha de consulta 15 de octubre de 2013). 24 p.
- NAPPO 2010. Detección de Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) en el Municipio de Tecmán, Colima, México. Sistema de Alerta Fitosanitaria SAF.
- SIAP. 2012. Producción agrícola por cultivo y por estado. México (En línea). Disponible en [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) (Fecha de consulta 30 de abril 2014).
- USDA. 2012. “DNA extraction and PCR detection in citrus” in “New Pest Response Guidelines – Citrus Greening Disease”. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine (PPQ). Disponible en:[http://www.aphis.usda.gov/plant\\_health/plant\\_pest\\_info/citrus\\_greening/downloads/pdf\\_files/cg-nprg.pdf](http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/citrus_greening/downloads/pdf_files/cg-nprg.pdf). (fecha de consulta: 20 de septiembre de 2013).