

**‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’:  
bacteria emergente asociada a  
desarreglos vegetativos en apio y  
zanahoria**

López, M.M., Martínez, M.C., Teresani, G.R., Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Font, M.I., Tanaka, F., Kitajima, E.W., Roselló, M., Bartolomé, P., Sanjuan, S. Ferrandiz J.C. Cambra, M.

**Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias - IVIA**

**Universidad Politécnica de Valencia – UPV**

**Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz- ESALQ, Brasil**

**Servicio de análisis agroalimentario, Consellería de la Presidencia y de Agricultura, Pesca,  
Alimentación y Agua**

**Agrícola Villena Coop V.**

•El género *Candidatus Liberibacter* comprende seis especies bacterianas: '*Ca. L. asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', '*Ca. L. americanus*', '*Ca. L. endosymbiont*', '*Ca. L. solanacearum*', '*Ca. L. europaeus*' y '*Ca. L. crescens*'.

•'*Ca. L. asiaticus*' '*Ca. L. africanus*' y '*Ca. L. americanus*' están asociados con el HLB, la enfermedad más destructiva de los cítricos.



• '*Ca. L. solanacearum*', también llamada '*Ca. L. psyllauros*' está asociada a la enfermedad de la patata conocida como zebra chip.

# ***'Candidatus Liberibacter solanacearum'***

- Bacteria Gram negativa, no cultivable, restringida al floema y transmitida por injerto y psílicos vectores de forma transovárica
- Asociada a distintas enfermedades en patata ("Zebra chip disease"), tomate, pimiento, zanahoria y otras especies
- En general causa síntomas de desarreglos vegetativos variables según los cultivos

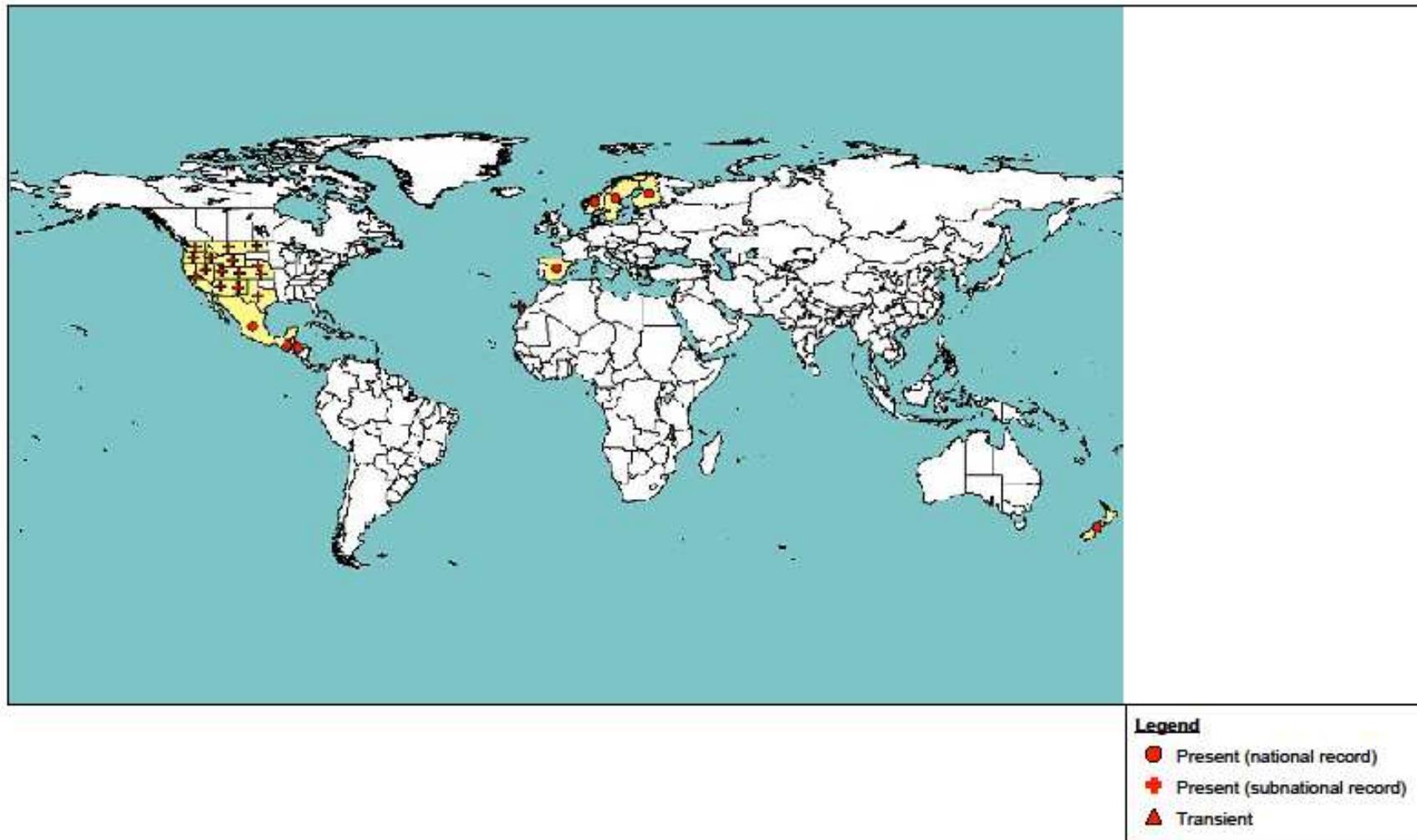


"Zebra Chip"



*Liberibacter solanacearum*

EPP0 Code : LIBEPS



**ESPAÑA: Síntomas en zanahoria: Canarias, Alicante, Albacete, Logroño y Sevilla desde 2007**



**Síntomas:** enrojecimiento, enrollado y proliferación anormal de hojas; enanismo de tallos y raíces; proliferación de raíces secundarias y forma filiforme del final de la raíz







- 18,288 plantas de zanahoria cv. Maestro fueron inspeccionadas visualmente:
- 873 (4,8%) mostraron proliferación y enrojecimientos
- 100 plantas sintomáticas fueron analizadas individualmente

La sintomatología observada se asocia con la detección de '*Ca. L. solanacearum*' y fitoplasmas

PCR tiempo real  
'*Ca. L. solanacearum*'

	+	-	
+	86	2	88
-	12	0	12
	98	02	100



**Desórdenes vegetativos en apio:**

**50% (2008), 60% (2009), 32% (2010), 08% (2011) y 0.1% (2012)**

**Susceptibilidad de cultivares:**

**Loretta > Imperial > Monterrey**

# Nueva sintomatología en apio en Villena (Alicante) desde 2007



Amarilleos

Excesivas brotaciones

Tallos delgados y retorcidos

**Pérdidas de producción comercial de hasta 70%,  
desabastecimiento del mercado y cuantiosas pérdidas económicas**



# **Etiología de los desórdenes en apio y zanahoria**

# Asociación de síntomas con detección de 'Ca. Liberibacter solanacearum' y/o fitoplasmas

Presencia de síntomas y detección específica de 'Ca. Liberibacter solanacearum' (Teresani et al., 2013)

Presencia de síntomas y detección universal de fitoplasmas (Hren, et al., 2007)

Síntomas	PCR en tiempo real ("spot" + DNA)		
	Positivo	Negativo	Total
Desarreglos	213	111	324
Normal	38	140	178
Total	251	251	502

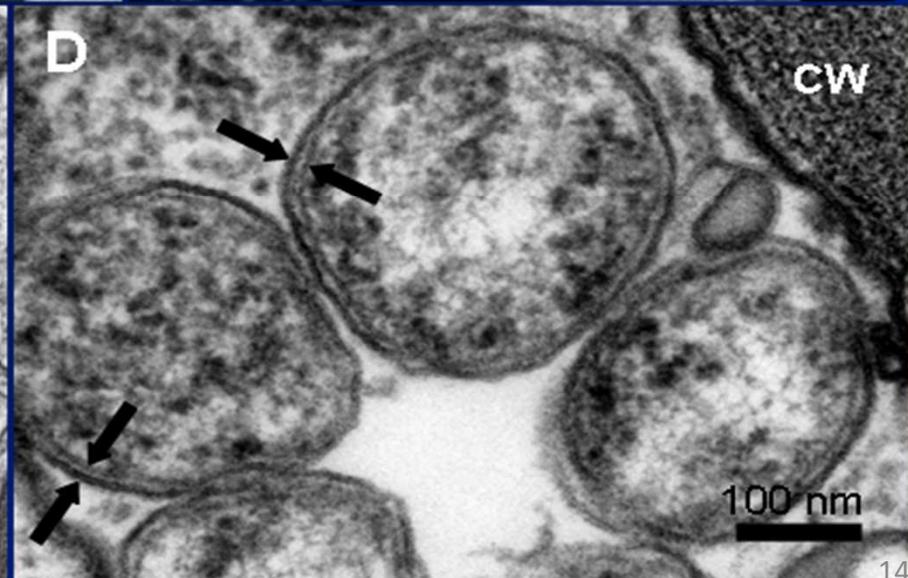
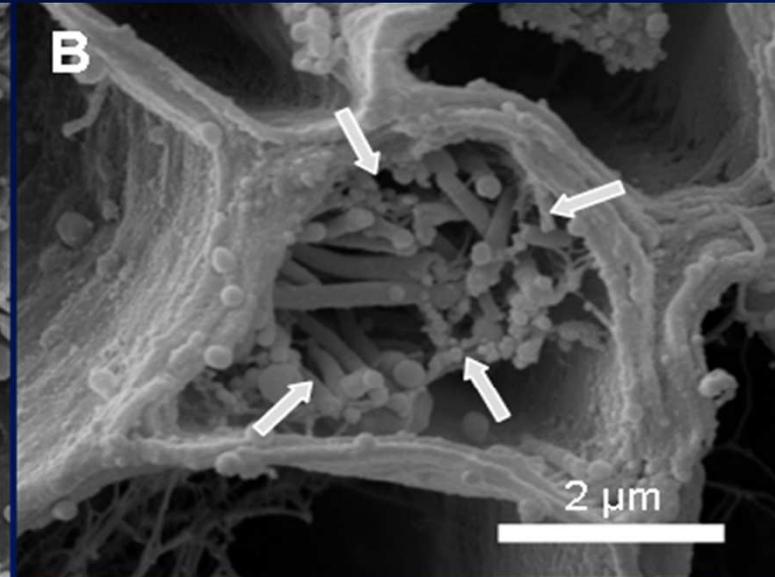
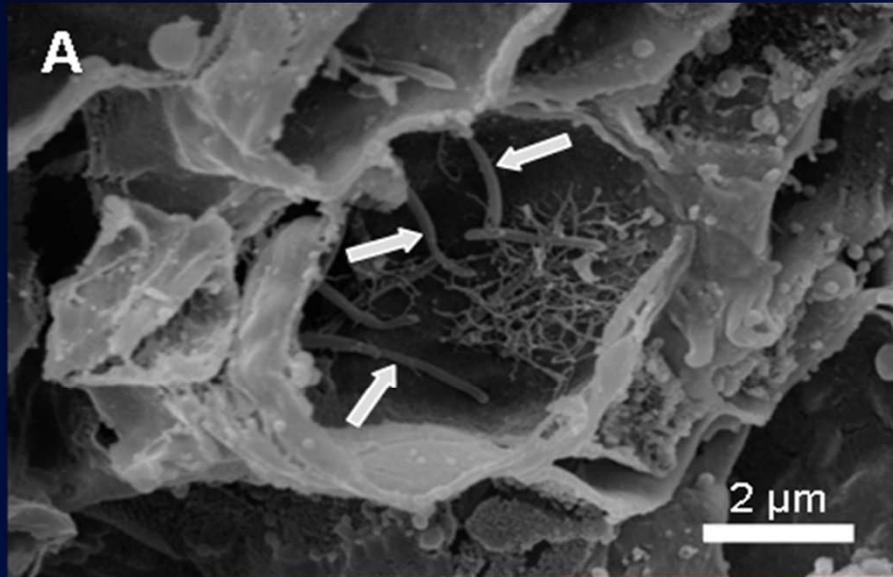
Síntomas	PCR en tiempo real ("spot" + DNA)		
	Positivo	Negativo	Total
Desarreglos	53	271	324
Normal	26	152	178
Total	79	423	502

## Análisis de varianza

	LR	Chisq Df	Pr (> Chisq)
"Ca. L. sol."	143,38	2	< 2 <sup>-10</sup>
Fitoplasmas	0,34	2	0,84

Se demuestra la asociación estadística de los síntomas encontrados en apio con la presencia de 'Ca. Liberibacter solanacearum' y no con fitoplasmas

# Microscopía electrónica de barrido (A y B) y microscopía electrónica de transmisión (C y D)



# Transmisión experimental por *Cuscuta campestris* en invernadero

Apio → *Vinca rosea*  
→ *Tomate*  
Zanahoria → Zanahoria  
→ *Vinca rosea*  
→ *Tomate*



# **Puesta a punto de métodos de diagnóstico y detección**

# Puesta a punto de un sistema sensible y fiable de detección de PCR en tiempo real

		Ext. Vegetal +	1/10	1/10 <sup>2</sup>	1/10 <sup>3</sup>	1/10 <sup>4</sup>	1/10 <sup>5</sup>	1/10 <sup>6</sup>
convencional	Liefting <i>et al.</i> , 2009	+	-	-	-	-	-	-
	Li <i>et al.</i> , 2009 (Lsof/OI2c)	+	-	-	-	-	-	-
	Ravindran <i>et al.</i> (adk)	+	-	-	-	-	-	-
	Ravindran <i>et al.</i> (TX)	+	+	+	+	-	-	-
T. Real	Li <i>et al.</i> 2009	22,82	25,78	28,49	33,71	34,57	-	-
	<b>IVIA</b>	<b>23,66</b>	<b>26,53</b>	<b>28,31</b>	<b>31,68</b>	<b>32,53</b>	-	-

Protocolo de PCR en tiempo real para la detección de 'Ca. L. solanacearum' que se puede utilizar con métodos directos de preparación de muestras (sin extracción previa del ADN)

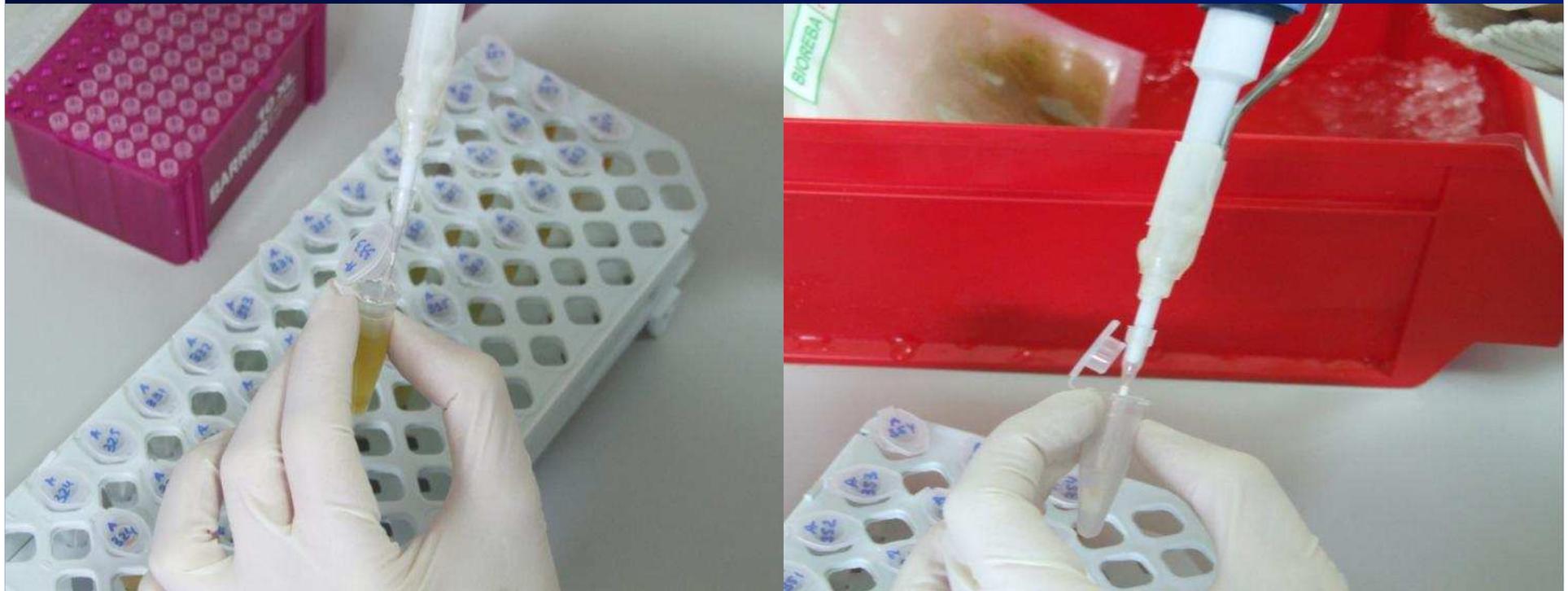
# Preparación de extractos

- 1) Añadir la muestra y PBS, pH 7,2 (aprox. 1 peso : 5-10 volúmenes).
- 2) Homogenización semi-automática utilizando el Homex 6 (Bioreba).
- 3) Usar 1,5 mL del extracto o almacenarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.



# Método directo de preparación de muestras para PCR a tiempo real: “Spot”

- 1) Preparar un extracto
- 2) Depositar 5  $\mu$ l en una membrana de papel dentro de un tubo Eppendorf



**4) Transferir 3  $\mu$ l del extracto (como muestra) directamente para amplificación por PCR en tiempo real (1,5 horas)**



**3) Añadir 100  $\mu$ l de agua destilada y agitar**



**'Ca. Liberibacter solanacearum'  
(Ref. CaLsol/100)**



Se ha puesto a punto un kit completo de detección en colaboración con Plant Print Diagnostics ([www.plantprint.net](http://www.plantprint.net)) para análisis de numerosas muestras de una forma sencilla, económica y precisa



EUPHRESKO tool book - Tool



## EUPHRESKO Call

# *Potato phytoplasmas and 'Ca. Liberibacter solanacearum'*

 <p>MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD</p>	 <p><b>INIA</b> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria</p>	<p><i>Subdirección General de Prospectiva y Coordinación de Programas</i></p>
<p>Cofinanciado con el:</p>  <p>FONDO EUROPEO DE DESARROLLO REGIONAL</p>		

**CÓDIGO PROYECTO:** RTA2011-00142

**TÍTULO:** Etiología, epidemiología y control de desarreglos vegetativos en cultivos hortícolas. Evaluación de riesgos para cítricos y otros cultivos estratégicos.

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Mariano Cambra

**ENTIDAD SOLICITANTE:** Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

**CENTRO:** Protección Vegetal y Biotecnología

**ANUALIDAD (1ª o 2ª):** 1º

**FECHA DEL INFORME:** 28/09/2012



GENERALITAT  
VALENCIANA

CONSELLERIA D'AGRICULTURA,  
PESCA I ALIMENTACIÓ

IVIA

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**PERFORMANCE STUDY N° 1:**  
**“*Candidatus Liberibacter solanacearum*” DETECTION BY REAL-TIME PCR**  
**USING PLANT PRINT DIAGNOSTICS S.L. COMPLETE KIT**

Performance test kit components:

- 1) 2 vials (blue cap) containing 1 mL distilled sterile water DN/RNases free: one for master mix preparation and the other for sample extraction/preparation.
- 2) 1 vial (yellow cap) containing lyophilized complete (TaqMan FAM/TAMRA) master mix for “*Ca. Liberibacter solanacearum*” amplification. Contains enough master mix for 50 reactions using 9  $\mu$ L/reaction.
- 3) 10 numbered Eppendorf tubes, containing 10 different immobilized blind positive and negative samples.
- 4) 1 detailed protocol of conventional kit (for additional information).

# Ring-Test del kit diseñado en IVIA

- **27 Laboratorios / 17 países:** Austria, Argentina, Bolivia, Brasil, Costa Rica, Francia, Grecia (2), Hungría, Israel, Italia, Nueva Zelanda, Países Bajos, España (9), Turquía, Reino Unido, Uruguay y EEUU (2)
- **10 muestras ciegas** (5 positiva y 5 negativas) inmovilizadas en papel un mes antes y almacenadas a temperatura ambiente.
- **Kit completo** enviado por correo a temperatura ambiente en noviembre 2012.
- **Total 44 resultados / 440 datos**

**Plantain**  
Diagnòstics, S.L.

COMPLETE KIT® FOR "*Candidatus Liberibacter*" spp. ASSOCIATED TO CITRUS HLB DISEASE. RAPID SCREENING TEST BY REAL-TIME PCR

Kit CaLspp/100 components:

- 1) 2 vials (white cap) containing 50 pieces (0.2 cm<sup>2</sup>/piece) of Whatman 3MM paper.
- 2) 1 package containing 2 paper membranes (7x13cm) (Whatman 3MM).
- 3) 1 vial (blue cap) containing 1mL distilled sterile water DN/RNases free for master mix preparation.
- 4) 1 tube x 12 mL of distilled water DN/RNases free for sample preparation.
- 5) 2 vials (yellow cap) containing lyophilized complete master mix (universal primers and TaqMan FAM/TAMRA probe) for "*Ca. Liberibacter*" spp. amplification (each tube contains enough master mix for 50 reactions using 9 µL/reaction).
- 6) 2 vials (red cap) containing 1 immobilized positive control spotted on a piece of membrane (5 µL per spot of "*Ca. Liberibacter asiaticus*" infected plant crude extract).
- 7) 2 vials (green cap) containing 1 immobilized negative control spotted on a piece of membrane (5 µL per spot of healthy plant crude extract).
- 8) 1 detailed protocol.

Complete kit. Spanish-EU Patent N° 2.377.690 (201001157/08-09-2010). IVIA-FUNDECITRUS. E. Bertolmi, M. Cambra, P. Serra, M.M. López, N. Duran-Vila, J. Ayres and J.M. Bové. Direct procedure for specific detection of "*Ca. Liberibacter*" spp. by immobilized targets and real-time PCR. Kit for its detection.



# PARÁMETROS DE DIAGNÓSTICO

Parameter

Value

SE

lo CI 95%

Prevalence:

0.5

0.0238

0.4533

Sensitivity:

0.9

0.0143

0.8604

Specificity:

1

0

1

False positive rate:

0

0

0

False negative rate:

0.1

0.0143

0.0604

Positive predictive value:

1

0

1

Negative predictive value:

0.9091

0.0137

0.8729

Positive likelihood ratio:

Infinity

--

NaN

Negative likelihood ratio:

0.1

--

0.0673

**PRECISIÓN (VP+VN/Total)= 95 %**

# CONCLUSIONES PARTE I:

- La sintomatología observada en zanahoria se asocia con la detección de '*Ca. L. solanacearum*' y fitoplasmas.
- La sintomatología observada en apio se asocia sólo con la detección de '*Ca. L. solanacearum*'. Apio nuevo huésped.
- Se ha puesto a punto un eficaz sistema de diagnóstico (PCR en tiempo real) que permite la detección fiable y específica de la bacteria en 2 horas en material vegetal e insectos vectores.
- Existe un kit comercial validado que permite la detección directa, precisa y económica de la bacteria que contribuirá al mejor conocimiento epidemiológico y al control de la enfermedad.

# Epidemiología

# Muestreo sistemático en parcelas experimentales 2011-2021



## Zanahoria:

Parcelas experimentales (al menos una de cada ciclo de cultivo):

-En algunas parcelas no se observaron síntomas ni se detectó 'Ca.L.solanacearum'

-En otras parcelas, frecuentes síntomas fueron observados y se detectó 'Ca.L.solanacearum' en más del 65 % de las plantas cultivadas al aire libre.

-No se detectó 'Ca.L.solanacearum' en plantas cultivadas bajo malla, ni tampoco se observaron síntomas.



## Apio:

Parcelas experimentales (al menos una de cada ciclo de cultivo):

- Sin síntomas y escasas detecciones de 'Ca.L.solanacearum' en 2011-2012

# Muestreo

Se toman hojas de la parte media de la planta (una hoja en plantas pequeñas y 2-3 hojas en plantas adultas)



# Muestreo

Las muestras se introducen en bolsas de plástico de malla fina (Bioreba o Plant Print) y se transportan en frío al laboratorio



# Determinación de las especies de psílicos vectores

**‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’ es transmitida por psilas de forma persistente (adquisición durante su alimentación en una planta enferma y tras un corto período de incubación son capaces de transmitir la bacteria durante toda su vida incluso de forma transovárica).**

**En otros países las especies vectoras descritas son: *Bactericera cockerelli* y *Trioza apicalis* (no presentes en España)**

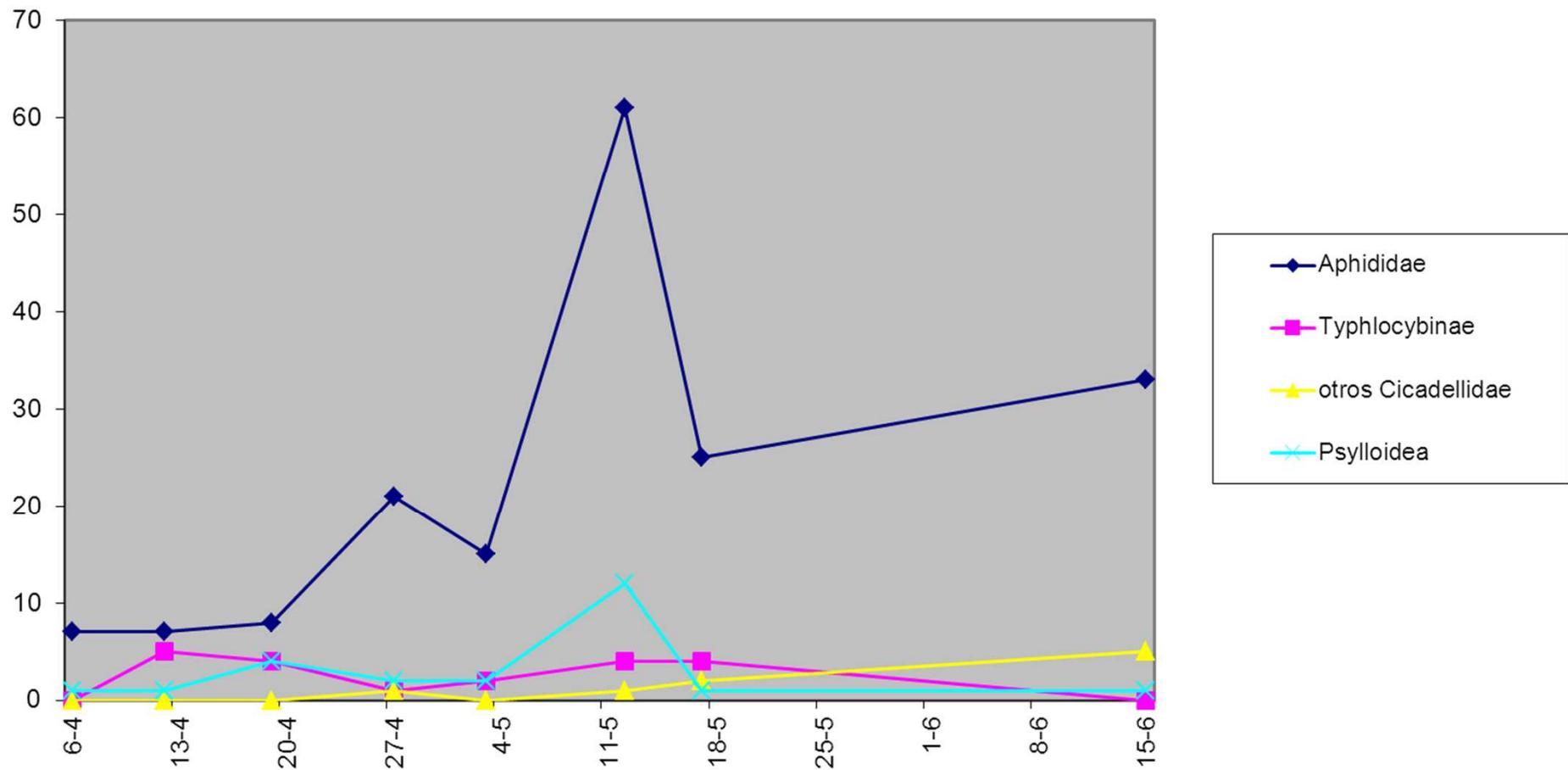
# Método del brote pegajoso

Monitoreo de  
artrópodos que  
visitan/aterrizan en las  
plantas cada 7-10 días



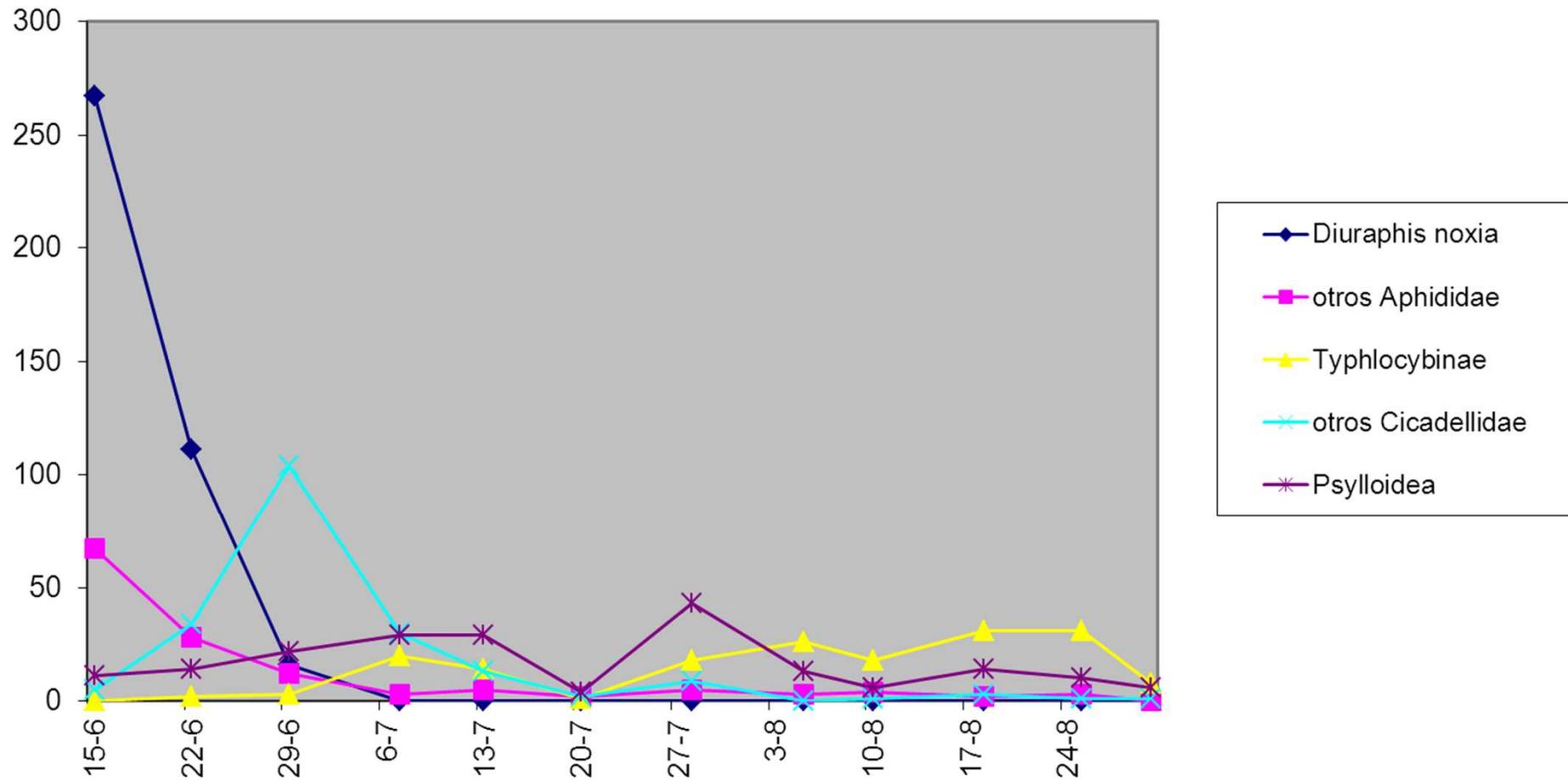
# Monitoreo de artrópodos que aterrizan en apio (ciclo temprano)

Nº of arthropods (Villena, 2011, celery, sticky plant, plot 08)



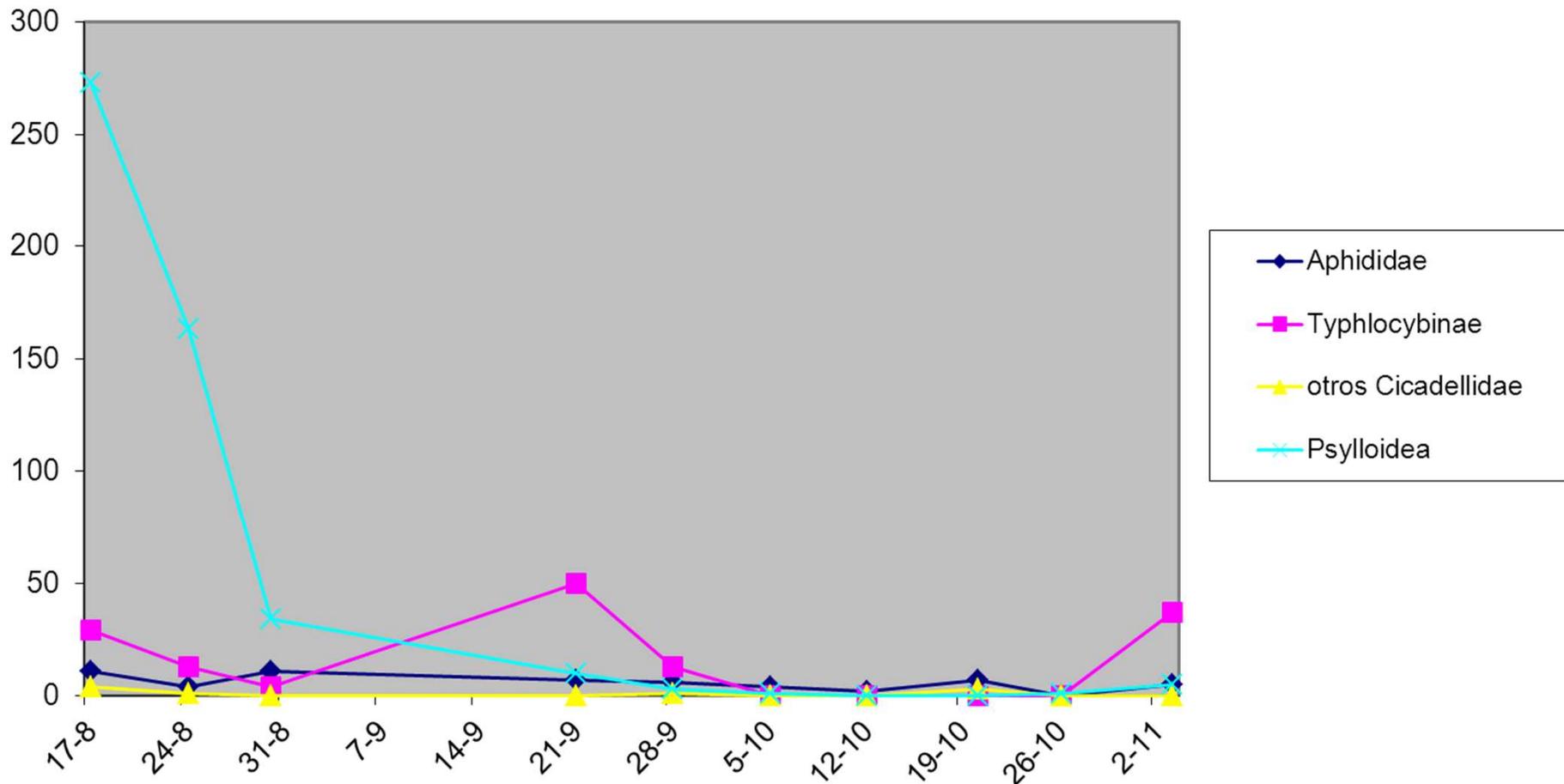
# Monitoreo de artrópodos que aterrizan en apio (ciclo medio)

Nº of arthropods (Villena, 2011, celery, sticky plant, plot 26)



# Monitoreo de artrópodos que aterrizan en apio (ciclo tardío)

Nº of arthropods (Villena, 2011, celery, sticky plant, plot 01)



# Principales picos de vuelo anual (2011)

**Aphididae:** 2 picos principales (mitad de mayo y mitad de junio).

**Cicadellidae Typhlocybinae:** 2 picos principales ( final de septiembre e inicio de noviembre).

**Cicadellidae no Typhlocybinae:** 1 pico principal (final de junio).

**Psylloidea:** 2 picos principales (final de julio y mitad de agosto).

# Monitoreo de artrópodos



Psylloidea	Trampas amarillas		Planta pegajosa
	2009	2010	2011
<b>Triozidae:</b>	95 %	99,37 %	99,43 %
<i>Bactericera</i> sp.	85 %		
<i>Bactericera tremblayi</i>		99,14 %	
<i>Triozia</i> sp.	10 %		
<i>Triozia chenopodii</i>		0,22 %	
<i>Triozia urticae</i>		0,01 %	
<b>Psyllidae:</b>	5 %	0,63 %	0,57 %
<i>Cacopsylla pyri</i>	5 %	0,56 %	
<b>TOTAL</b>	<b>25.836</b>	<b>26.140</b>	<b>527</b>

Villaescusa et al. (2011). Boletín Sanidad Vegetal, Plagas 37, 163-171.

## DetECCIÓN de 'Ca. Liberibacter solanacearum' en psílicos individuales por "squash real-time PCR"

Villena / apios sin síntomas cultivados en área próxima a zanahorias con síntomas / 2011

Nº capturas	Identificados	Escachados	Detección
715	527	211 Triozidae (probablemente <i>B.tremblayi</i> )	10 (4.7%)

Sto. Domingo de la Calzada (La Rioja) / zanahorias sintomáticas / 2012

Nº capturas	Identificados	Escachados	Detección
63	63	25 <i>B. tremblayi</i> 38 <i>B. nigricornis</i>	24 (96.0%) 36 (94.7%)

Por lo menos tres especies diferentes de *Bactericera* han sido detectadas como posibles vectores de 'Ca.L.solanacearum' (dianas de 'Ca.L.solanacearum' amplificadas por "squash real-time PCR): *B. tremblayi* y *B. nigricornis* en la península y *B. trigonica* en las Islas Canarias.

# ¿La infección primaria de zanahorias se debe a la transmisión por semilla de ‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’?

La detección simultánea de síntomas en zanahoria en diversos países (oficial en Finlandia, España y Francia) y transmitidos por distintas especies de psílidos hace sospechar que la infección primaria provenga de semillas.

# PROTOCOLO PARA DETECCION DE '*Ca.L.solanacearum*' EN SEMILLAS



- **1 g (aprox. 500 semillas de zanahoria)**

- Machacadas en AFT pH 7,2 en bolsas de plástico
- Purificación de DNA CTAB
- PCR en tiempo real

- **1 semilla**

- Machacada en un tubo con 50  $\mu$ L de AFT pH 7,2
- Spot 5  $\mu$ L en papel Whatman 3MM
- PCR en tiempo real



Se realizan semilleros con lotes positivos para determinar la posible transmisión por semilla. Están pendientes de finalización los ensayos.



# Control de la enfermedad

# Ensayo de productos químicos

(realizados por Consellería de Presidencia y de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua en 2009)

Tratamientos	Plantas síntomas/plantas totales
Azadiractin	41/90
Abamectina	44/90
Imidacloprid	38/89
Tiametoxan	40/89
Control	40/90
Malla	18/90



No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos químicos.

Sin embargo, en cultivo bajo malla disminuyeron significativamente las plantas con síntomas



# CONCLUSIONES PARTE II:

- Al menos tres especies de psíldos son posibles vectores de la bacteria en Canarias y en la península.
- La lucha química reduce el nivel de población de vectores pero no evita la transmisión.
- El cultivo bajo malla reduce significativamente la prevalencia de la enfermedad. Su coste impide que se utilice de forma generalizada.
- Si se confirma la transmisión por semilla, el control sanitario de los lotes debería efectuarse.
- Si el problema persiste se deberían iniciar programas de mejora para obtener variedades tolerantes/resistentes.

**MUCHAS GRACIAS POR  
SU ATENCIÓN**