

EFFECTO DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EN LA SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE)

Ana Karen Ramírez-Sánchez¹, Laura Delia Ortega-Arenas¹✉, José Joaquín Velázquez-Monreal² y Jorge Manuel Valdez-Carrasco¹

¹Fitosanidad, Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km. 36.5 Carretera México- Texcoco, 56230, Montecillo, Texcoco, estado de México, México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Tecomán, 28100. Tecomán, Colima.

✉ Autor de correspondencia: ladeorar@colpos.mx

RESUMEN. *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) mantiene una asociación compleja con su vector, el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) que causa la enfermedad de huanglongbing (HLB) en cítricos. Para entender mejor estas relaciones, se comparó la supervivencia y reproducción de *D. citri* entre plantas de naranja, sanas e infectadas con CLas para determinar el efecto de la bacteria sobre su vector. La naranja tanto sana como infectada resultó favorable para el desarrollo del psílido, puesto que más del 70 % de los individuos supervivió desde huevo a adulto. La mayor mortalidad (d_x) se presentó en huevo (14-15 %), que fue equivalente a la mortalidad acumulada del resto de los estados ninfales (15-18 %). La infección de la bacteria CLas redujo la duración del ciclo del psílido, pero no afectó la longevidad de los adultos portadores de la bacteria. Las hembras criadas en plantas de naranja infectadas redujeron su tiempo generacional y depositaron ligeramente más huevos respecto de las desarrolladas en plantas sanas, lo que indica que la tasa intrínseca de crecimiento natural, y en consecuencia la tasa infinita de crecimiento (λ), fue favorable hacia los psílicos portadores.

Palabras clave: Psílido Asiático de los Cítricos, HLB, interacción, plantas hospederas.

Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on the survival and reproduction of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae)

ABSTRACT. *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) maintains a complex relationship with its vector, the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera), which causes the disease huanglongbing (HLB) in citrus. To better understand these relationships, the survival and reproduction of *D. citri* were compared between healthy and CLas infected orange plants, to determine the effect of bacteria on its vector. The orange host was favorable for the development of the psyllid, since more than 70% of individuals survived from egg to adult. The highest mortality (d_x) arose in egg (14-15%); which was equivalent to the accumulated mortality of immature states (15-18%). The development time of psyllids from egg to adulthood was affected on bacteria infected plants. Females developed in infected plants reduced their generational time and deposited slightly more eggs with respect to those developed in healthy plants, indicating that the rate intrinsic natural growth, and therefore infinite growth (λ) rate, was favorable towards the psyllids carriers.

Keywords: Psyllid Asian Citrus, HLB, interaction, host plants.

INTRODUCCIÓN

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae), también conocida como Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), se considera la plaga más importante de los cítricos en el mundo por su capacidad de transmitir bacterias *Candidatus Liberibacter* spp., agentes causales del huanglongbing (HLB) (Bové, 2006). En circunstancias óptimas, los adultos y ninfas de 4° y 5° ínstar adquieren la bacteria en 15 min de alimentación y 5 a 7 h son suficientes para la transmisión efectiva del patógeno (Xu *et al.*, 1988; Hung *et al.*, 2004; Pelz-Stelinski *et al.*, 2010). La bacteria se multiplica en la hemolinfa y glándulas salivales de los psílicos (Pelz-Stelinski *et al.*, 2010) por

lo que la dispersión del HLB es dependiente de la densidad y movimiento de *D. citri* entre árboles infectados y no infectados, así como de la disponibilidad de brotes jóvenes, indispensables para que el insecto cubra sus requerimientos nutricionales y pueda completar su desarrollo (Tsai *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2013). El psílido mantiene una relación estrecha con la bacteria de modo que prefiere alimentarse al inicio de plantas infectadas (Mann *et al.*, 2012) debido a que estas liberan volátiles como el metil salicilato y D-limoneno que median la preferencia del psílido, y la infección bacteriana mejora la calidad nutricional de la planta. Sin embargo, algunos estudios sugieren también que las poblaciones de *D. citri* portadoras de las bacterias son más susceptibles a insecticidas (Tiwari *et al.*, 2011) y hongos entomopatógenos (Orduño-Cruz *et al.*, 2015), desventaja que fue correlacionada con un gasto energético por síntesis de esteroides y reducción de nutrientes (costo fisiológico), lo cual finalmente afectó la aptitud biológica del insecto.

Dado que *D. citri* y el HLB están presentes en México (SENASICA, 2014) y que las pérdidas a nivel nacional pueden exceder el 50 % de la producción cítrica proyectada, representando un fuerte impacto negativo para las unidades productivas (Salcedo *et al.*, 2012), es importante entender las interacciones entre el patógeno (CLAs), el vector (*D. citri*) y la planta hospedera (cítricos) para determinar las implicaciones que ello tendría en la definición de una estrategia de manejo. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue comparar la supervivencia y reproducción de *D. citri* en plantas de naranja dulce var. Valencia sanas e infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* para determinar el efecto de la bacteria en el vector.

MATERIALES Y MÉTODO

La investigación se realizó en el Campo Experimental Tecomán del INIFAP, ubicado en el km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, donde se detectó la presencia del HLB en abril de 2010 (SENASICA, 2014).

La cría masiva de *D. citri* se estableció en plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) var. Valencia en el Campo Experimental Tecomán-INIFAP, con ~1000 adultos provenientes de la cría existente en el Área de Insectos Vectores del Programa en Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, colectados inicialmente en huertos de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck Rutaceae) var. Valencia de la comunidad de Cazonas de Herrera, Veracruz, y mantenidas aisladas en invernadero desde 2009. Los adultos se mantuvieron sobre las plantas con brotes durante una semana. Una vez lograda la oviposición en éstas, los adultos se retiraron utilizando un aspirador bucal y las plantas infestadas se mantuvieron en las jaulas de alambre de acero (30 x 30 x 30 cm) cubiertas con malla antiáfidos a una temperatura de 27 ± 3 °C y 12:12 h de fotoperiodo hasta alcanzar la emergencia de los adultos. Las plantas infestadas se colocaron en jaulas libres de adultos con el fin de tener material biológico nuevo y poblaciones con edades controladas.

Para realizar las pruebas se utilizaron plantas de naranja dulce *C. sinensis* var. Valencia de 18 meses de edad, adquiridas en el vivero comercial certificado El Edén, en Tecomán, Col., sembradas en bolsas polietileno negras (18 x 30 cm) con suelo tipo migajón como medio de soporte, estas plantas se propagaron en portainjertos de limón *C. volkameriana*.

Para la obtención de plantas positivas al HLB se recolectaron varetas de árboles de naranja dulce var. Valencia con evidentes síntomas de la enfermedad en una huerta comercial ubicada en el municipio de Cabo Corrientes, Jalisco; las varetas se injertaron individualmente sobre plantas sanas para la realización de las pruebas.

La supervivencia de *D. citri* se determinó a través de tablas de vida de cohorte. Para ello se utilizaron cuatro plantas sanas y cuatro enfermas (con evidentes síntomas) de dos años de edad; en cada planta se seleccionaron dos brotes jóvenes que se aislaron, individualmente, con una pequeña

jaula, construida con un recipiente cilíndrico de plástico liso transparente de 150 ml de capacidad con un orificio lateral de 2 x 2 cm, cubierto con tela de organza para permitir la ventilación. Con ayuda de un pequeño microaspirador bucal, por otro orificio lateral menor, se introdujeron 20 psílidos adultos de la cría, en una proporción de machos y hembras de 1:1, de tres a seis días de emergidos y con 2 h en ayuno previo. Después de un periodo de alimentación-adquisición de 48 h (tanto en plantas sanas como enfermas), los adultos se retiraron y se contabilizó el número de huevos ovipositados bajo un microscopio estereoscópico. Del total de estos huevos se seleccionaron 100 (cohorte) por cada brote y el resto se removió con un alfiler entomológico. Cada brote infestado con 100 huevos se aisló nuevamente como se indicó, para evitar infestaciones secundarias. Las plantas se dispusieron al azar en las jaulas similares a la de la cría, descritas anteriormente. Cada 24 h los brotes se revisaron, con un estereomicroscopio, para cuantificar el número de huevos y ninfas vivas y muertas, y el ínstar en que se encontraban en el momento. El registro culminó cuando en las plantas sanas el 95 % de ninfas alcanzó el estado adulto. Además, los adultos emergidos se colectaron diario, y transfirieron a brotes de nuevas plantas sanas de la misma especie (naranja dulce). Cada planta se aisló con una jaula cilíndrica de 30 x 20 cm construida con alambre y envuelta con tela tul. Cada 24 h y hasta su muerte, se registró el número de adultos vivos y muertos y su sexo. El estudio se realizó en las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa en que se mantuvo la cría. El diseño experimental fue completamente al azar con ocho repeticiones por hospedero y condición y su respectivo testigo, el cual constó de una planta de naranja, sana o enferma y libre de *D. citri*.

Las tasas de reproducción de cada cohorte se determinaron por medio de tablas de fertilidad, que se elaboraron anotando cada 24 h el número de huevos depositados por pareja (hembra y macho) que llegaron al estado adulto de los insectos emergidos en las pruebas anteriores. Se realizaron 30 réplicas por hospedero y para facilitar el conteo cada pareja se transfirió diario y hasta su muerte, a un brote nuevo y aislado de forma individual; los ensayos se realizaron en condiciones controladas a 27 ± 3 °C, 70 % de HR y 12 h de fotoperiodo.

A partir de datos obtenidos de los estudios biológicos se determinó el ciclo biológico y se construyeron las tablas de vida y fertilidad para realizar comparaciones con base en los parámetros estimados (tasa neta de reproducción (R_0), tiempo de generación (T), tasa intrínseca de incremento (r_m), tiempo de duplicación (d) y tasa infinita de crecimiento (λ), mediante el uso de SAS, utilizando el método de Jackknife, propuesto por Maia *et al.* (2000). También se obtuvieron las curvas de supervivencia mediante la prueba no paramétrica de Logrank (Mantel-Cox) con una significancia de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo de desarrollo promedio de huevo a adulto de *Diaphorina citri* fue de 15.61 ± 0.9 días con un intervalo de 15.15 a 16.07 días. La infección de la bacteria CLas redujo significativamente ($p \leq 0.05$) la duración del ciclo de psílidos criados en plantas infectadas, pero no afectó la longevidad de adultos (Cuadro 1).

Más del 70 % de los individuos supervivió desde huevo a adulto en los tratamientos, y la mayor mortalidad (d_x) se presentó en huevo (14-15 %) que fue casi equivalente a la mortalidad acumulada del resto de los estados ninfales (15-18 %) (Cuadro 2). Se obtuvieron curvas de supervivencia tipo III, lo cual indica que la mortalidad se concentra en los primeros estados de desarrollo, de modo que la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) detectó diferencias ($\chi^2 = 29.25$, $gl = 1$, $p \leq 0.000$) entre insectos portadores y no portadores (Fig. 1).

Cuadro 1. Duración de cada etapa de desarrollo de *Diaphorina citri* criada en plantas de naranja dulce *C. sinensis* var. Valencia sanas e infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Estado de desarrollo	<i>C. sinensis</i> var. Valencia			
	Sana	Infectada		
Huevo	4.26±0.03 b	5.15±0.03 a		
Ninfa I	1.99±0.03 a	1.70±0.03 b		
Ninfa II	2.18±0.04 a	1.34±0.04 b		
Ninfa III	1.99±0.03 a	1.74±0.03 b		
Ninfa IV	2.31±0.04 b	2.58±0.04 a		
Ninfa V	4.50±0.04 a	3.70±0.04 b		
Total	16.07±0.65 a	15.15±1.19 b		
Longevidad Adulto	34.07±0.47 a	33.62±0.48 a		
Longevidad Adulto	♀	♂	♀	♂
* sexo (x ±SD)	35.5 ± 11.8a	32.6 ± 12.8a	35.0 ± 13.1a	32.2 ± 13.1a

**Medias con la misma letra en una fila no difieren estadísticamente entre sí ($p \leq 0.05$).

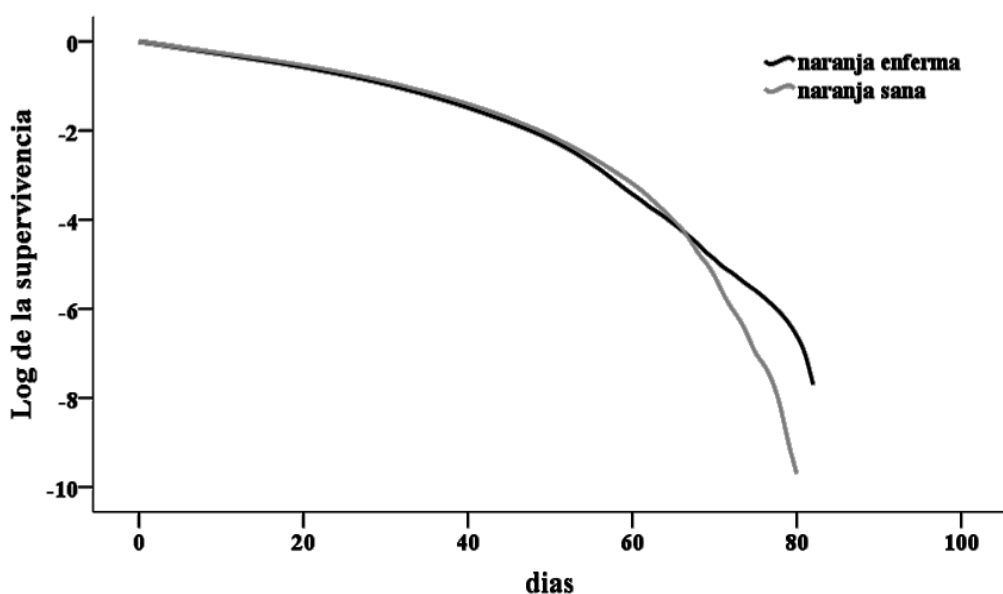


Figura 1. Curvas de supervivencia (Log Rank [Mantel-Cox]) ($\alpha = 0.05$) de cohortes de *Diaphorina citri* criadas en naranja Valencia sanas e infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Las tasas netas de reproducción (R_0) y el tiempo de generación en los tratamientos, calculadas a partir de la elaboración de las tablas de fertilidad (Cuadro 3), muestran que la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) y, por ende la tasa finita de incremento (λ), fueron favorables hacia insectos portadores. A pesar de no encontrar diferencias significativas en la tasa neta de reproducción (R_0), la población criada en plantas infectadas se multiplica 221.73 veces en cada generación, cuya duración es de 41.03 días, mientras que en plantas sanas, el tiempo generacional fue de 42.45 d y el número de descendientes fue de 214.79, lo que indica que la tasa intrínseca de crecimiento natural y de reproducción neta es significativamente mayor y favorable a los psílidos criados en plantas de naranja infectadas (Cuadro 3).

Cuadro 2. Tablas de vida de cohortes ($n = 800$) de *Diaphorina citri* criadas sobre platas de naranja

Valencia (*Citrus sinensis*) sanas e infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Estado de desarrollo	<i>C. sinensis</i> var. Valencia							
	Sana				Infectada			
	l_x	d_x	100_{qx}	e_x	l_x	d_x	100_{qx}	e_x
Huevo	800	112	14	5.34	800	117	15	5.28
Ninfa I	688	9	1	5.13	683	7	1	5.09
Ninfa II	679	9	1	4.19	676	2	0	4.14
Ninfa III	670	44	7	3.24	674	29	4	3.15
Ninfa IV	626	10	2	2.43	645	68	11	2.27
Ninfa V	616	23	4	1.46	577	11	2	1.48
Adulto	593				566			

Cuadro 3. Tasas de reproducción y tiempo de generación de colonias de *Diaphorina citri* criadas sobre plantas de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) sanas e infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Parámetros	<i>C. sinensis</i> var. Valencia	
	sana	infectada
Tasa Neta de Reproducción (R_0)	214.79 a (194.79 -234.80)	221.73 a (213.69-229.79)
Tiempo de Generación (T)	42.45 b (41.86- 43.06)	41.03 a (40.61- 41.46)
Tasa intrínseca de incremento (rm)	0.12 a (0.124 - 0.129)	0.13 b (0.130 - 0.133)
Tiempo de duplicación (d)	5.48 a (5.38-5.58)	5.26 a (5.21-5.32)
Tasa infinita de crecimiento (λ)	1.13 b (1.132-1.137)	1.14 a (1.139-1.142)

*Medias con la misma letra en una fila no difieren estadísticamente entre sí ($p \leq 0.05$).

El crecimiento mejorado de *D. citri* en plantas infectadas por la bacteria parece ser resultado de la alteración del estado nutricional de la planta y la supresión de los mecanismos de defensa contra el vector. Hodkinson (2009) menciona que la baja calidad de nutrientes, especialmente nitrógeno y aminoácidos, puede aletargar el desarrollo de las ninfas. Se ha demostrado que la infección causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* altera el metabolismo de carbohidratos y afecta la eficiencia del fotosistema II de las plantas, lo que favorece el comportamiento reproductivo del psílido. Sin embargo, Mann *et al.* (2012) señalan que el grado de afectación depende del tiempo de coevolución e interacción entre el patógeno y el vector.

CONCLUSIÓN

La presencia de la bacteria tuvo un efecto benéfico para *D. citri*, debido a que redujo el tiempo generacional y aumentó la fecundidad de las hembras criadas en plantas con HLB, lo cual en términos biológicos significa un mayor número de descendientes en un menor tiempo.

Agradecimientos

Al Consejo de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante los estudios de Maestría del primer autor.

Literatura Citada

- Bové, J. M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88:7-37.
- Hodkinson, I. D. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History*, 43:1-2, 65-179.
- Hung, T. H., S. C. Hung, C. N. Chen, M. H. Hsu and H. J. Su. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: Application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology*, 53(1):96-102.
- Mann R. S., J. G. Ali., S. L. Hermann, S. Tiwari, K. S. Pelz-Stelinski, T. H. Alborn, and L. L. Stelinski. 2012. Induced Release of a Plant-Defense Volatile 'Deceptively' Attracts Insect Vectors to Plants Infected with a Bacterial Pathogen. *PLOS Pathogens*, 8(3): e1002610.
- Orduño-Cruz N., A. W. Guzmán-Franco and E. Rodríguez-Leyva. 2015. *Diaphorina citri* populations carrying the bacterial plant pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* are more susceptible to infection by entomopathogenic fungi than bacteria-free populations. *Agricultural and Forest Entomology*, 1-4. DOI: 10.1111/afe.12138.
- Ortega-Arenas, L. D., A. Villegas-Monter, A. J. Ramírez-Reyes and E.E. Mendoza-García. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazonos, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 29(2): 317-333.
- Pelz-Stelinski, K. S., R. H. Brlansky, T. A. Ebert and M. E. Rogers. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(5): 1531-1541.
- Salcedo, D., I. Raúl, G. Mora, I. Covarruvas, F. Deapolis y S. Mora. 2012. Evaluación de Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana, Inter American Institute for Cooperation on Agriculture IICA, México, D.F.
- SENASICA. 2014. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos en México. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=2906>; fecha de consulta: 30-VII- 2014.
- Tsai, J. H., J. J. Wang and Y. H. Lui. 2002. Seasonal abundance of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist*, 85 (3):446-441.
- Tiwari, S., K. S. Pelz-Stelinski, and L. L. Stelinski. 2011. Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, to selected insecticides. *Pest Management Science*, 67(1), 94-99.
- Xu, C. F., Y. H. Xia, K. B. Li, and C. Ke. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: *Proceedings of 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, pp. 243–248. L.W. Timmer, S. M. Garnsey and L. Navarro (Eds). Riverside, CA, USA: University of California, Riverside.