

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri*  
(Hemiptera: Psyllidae), mediante PCR de punto final, en  
Guatemala (2013-2014)

Trabajo de investigación presentado por Erick Emanuel Mollinedo  
Chavarría para optar al grado de Licenciado en Biología

Guatemala  
2014



Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri*  
(Hemiptera: Psyllidae), mediante PCR de punto final, en  
Guatemala (2013-2014)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri*  
(Hemiptera: Psyllidae), mediante PCR de punto final, en  
Guatemala (2013-2014)

Trabajo de investigación presentado por Erick Emanuel Mollinedo  
Chavarría para optar al grado de Licenciado en Biología

Guatemala  
2014

Vo. Bo.:

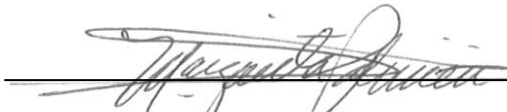
(f)



Licda. Margarita Palmieri

Tribunal Examinador:

(f)




Licda. Margarita Palmieri

(f)



Licda. Elena Dardón

(f)



Ing. Kuo Lin Huang

Fecha de aprobación: Guatemala, 11 de diciembre de 2014

## **PREFACIO**

Como estudiante de Biología, además de apasionarme por mucho de lo aprendido a lo largo de mi carrera, siempre tuve en mente que es importante contribuir en lo posible a la solución de los problemas existentes en el país. En un inicio, al considerar la enfermedad de Huanglongbing (HLB) como tema de mi trabajo de graduación, no me encontraba familiarizado con tal. La única parte conocida por mí de este tema eran los aspectos técnicos y moleculares, pero con el paso del tiempo y de mucha lectura aprendí sobre el tema y me di cuenta de la importancia no sólo a nivel nacional, sino también a nivel mundial.

Tengo en mente que los productos obtenidos y presentados en este trabajo serán de mucha utilidad para mejorar la detección de HLB en el país, por ende, contribuir en una pequeña parte a la resolución de un problema. También no es de olvidar que este estudio no hubiera sido posible sin la ayuda de varias personas e instituciones, los cuales brindaron apoyo logístico, técnico y moral.

Primero quiero agradecer a todo el personal del Laboratorio de Protección Vegetal por abrirme las puertas, por haberme brindado todos los reactivos, materiales y equipo necesarios para llevar a cabo este estudio que simplemente sin ese apoyo no hubiera sido posible.

Agradecimiento especial a Mirna Díaz y Julio Granados por su ayuda en cuanto al uso de equipo de laboratorio y logística de trabajo en el laboratorio. También gracias al Lic. Jeffrey Reina por su apoyo en las pruebas piloto de este proyecto y al Lic. Jonathan Morales por su ayuda en cuanto a consultas técnicas y sus constantes ánimos durante mi trabajo en el laboratorio.

Mis más sinceros agradecimientos a la Licda. Elena Dardón y a la Licda. Margarita Palmieri, por su asesoría en la parte práctica y escrita de este trabajo, sin sus consejos y observaciones casi semanales este proyecto no hubiera sido posible y no hubiera podido seguir adelante.

A Werner Rosales y Walter Welman, los cuales me proporcionaron muestras provenientes de Alta Verapaz y demostraron entusiasmo en cuanto a este estudio. De igual forma gracias a Sergio Blanco por proveer otras muestras de Alta Verapaz y a personas particulares y asociadas al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación por proporcionar colectas de diferentes regiones del país.

Al señor Kuolin Huang, por sus conocimientos en cuanto al tema de HLB, su experiencia en cuanto a la detección molecular de esta enfermedad y por brindar protocolos y sugerencias que cimentaron las bases de este trabajo.

A mis amigos cercanos, especialmente a Alina Castañeda, Miguel Morales, Mónica Villatoro y David Archila por sus ánimos y por acompañarme en cualquier momento posible durante la realización de este estudio.

Finalmente gracias a mi familia por su constante y peculiar apoyo. A mi tío Rodrigo González que a pesar de la distancia me ayudó en la resolución de problemas técnicos. A mi abuela porque sé que estuve en sus oraciones todo el tiempo, no sólo durante este trabajo, sino en los años de mi carrera. A mi hermana por su carisma y buenos deseos, al igual que a mis padres, los cuales me demostraron su apoyo incondicional en mis años de carrera y especialmente en la realización del presente estudio. Gracias a ellos por educarme con los valores y principios necesarios que me han llevado a ser la persona que soy actualmente.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>A. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>B. Justificación.....</b>	<b>14</b>
<b>C. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>II. MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>A. Procedimiento.....</b>	<b>17</b>
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>A. Comparación entre protocolos de extracción.....</b>	<b>23</b>
<b>B. Optimización de la reacción de amplificación.....</b>	<b>26</b>
<b>C. Optimización de condiciones de electroforesis y visualización.....</b>	<b>29</b>
<b>D. Confirmación de identidad de productos amplificados mediante secuenciación.....</b>	<b>31</b>
<b>E. Casos detectados de HLB en Guatemala.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>A. Comparación entre protocolos de extracción.....</b>	<b>33</b>
<b>B. Optimización de la reacción de amplificación.....</b>	<b>34</b>
<b>C. Optimización de condiciones de electroforesis y visualización.....</b>	<b>35</b>
<b>D. Confirmación de identidad de productos amplificados mediante secuenciación.....</b>	<b>36</b>
<b>E. Casos detectados de HLB en Guatemala.....</b>	<b>36</b>
<b>F. Discusión final.....</b>	<b>37</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>

<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>41</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1: Promedio y desviación estándar de la pureza y concentración de ADN obtenida mediante tres protocolos de extracción .....	23
Cuadro 2: Concentración de reactivos para la mezcla de amplificación para un volumen de master mix de 20 $\mu$ l.....	27
Cuadro 3: Programa final de reacción para los cebadores HLB 1999 y OIc-OI2c.....	28
Cuadro 4: Comparación entre dos pares de cebadores mediante la prueba estadística $\chi^2$ .....	29

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Síntomas característicos de Huanglongbing en naranja.....	2
Figura 2: Micrografía de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	6
Figura 3: Huevos de <i>Diaphorina citri</i> en brote vegetal .....	8
Figura 4: Fotografía en estereoscopio de <i>Diaphorina citri</i> .....	8
Figura 5: Esquema de las etapas del ciclo de vida de <i>Diaphorina citri</i> de huevo a adulto.....	9
Figura 6: Proceso genal cónico en <i>Diaphorina citri</i> .....	18
Figura 7: Esquema de trabajo para la optimización del método de detección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en <i>Diaphorina citri</i> mediante PCR de punto final y análisis de muestras de departamentos.....	22
Figura 8: Gel de integridad de ADN extraído de psílicos de Izabal mediante el protocolo de Hung y colaboradores+proteinasas K.....	24
Figura 9: Gel de integridad de ADN extraído de psílicos de Zacapa mediante el método de Hung y colaboradores+proteinasas K.....	24
Figura 10: Gel de integridad de ADN extraído de psílicos de Izabal mediante el método de Beard & Scott .....	25
Figura 11: Gel de integridad de ADN extraído de psílicos de Zacapa mediante el método de Beard & Scott .....	25
Figura 12: Gel de productos de la muestra P062-2 (2) y control positivo (C+) con variaciones en la concentración de dNTPs .....	26
Figura 13: Gel de productos de la muestra P061-11, P061-13 y control positivo mediante gradiente de la Temperatura de hibridación ( $T_m$ ) para los cebadores HLB 1999.....	28

Figura 14: Gel de productos de amplificación de muestras de Alta Verapaz mediante condiciones no optimizadas de electroforesis .....	30
Figura 15: Gel de productos de amplificación de muestras de Alta Verapaz mediante las condiciones estandarizadas de electroforesis .....	30
Figura 16: Casos de HLB detectados mediante PCR de punto final en <i>Diaphorina citri</i> provenientes de cultivos de cítricos de Guatemala .....	32
Figura 17: Comparación entre productos amplificados mediante dos pares de cebadores separados .....	53
Figura 18: Geles de casos positivos de HLB en <i>Diaphorina citri</i> provenientes de Alta Verapaz (arriba) y Jutiapa (abajo).....	55
Figura 19: Geles de casos positivos de HLB para <i>Diaphorina citri</i> provenientes de Santa Rosa (arriba) e Izabal (abajo).....	56
Figura 20: Fotografías en estereoscopio de <i>Diaphorina citri</i> provenientes de algunos departamentos de Guatemala .....	58

## RESUMEN

Huanglongbing (HLB) es una enfermedad que afecta a diversas especies de cítricos; a nivel mundial produce pérdidas monetarias debido a la baja producción de frutos y a la baja calidad de los mismos. El agente causal en Guatemala es la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, la cual es transmitida por el insecto vector *Diaphorina citri*. Este trabajo tiene como objetivo principal detectar a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el vector mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Puesto que esta enfermedad es de difícil manejo, es importante desarrollar métodos para su detección; la detección en el vector provee resultados más puntuales en comparación a la detección en tejido vegetal, en cuanto a presencia de dicha enfermedad. La detección de *C. Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri* fue posible mediante PCR de punto final; en 250 individuos analizados se detectaron 82 casos positivos de HLB, siendo los porcentajes más altos en Santa Rosa (54.17%), Escuintla (46.67%) y Alta Verapaz (45.61%). Se realizó la optimización de dos protocolos de extracción de ADN del insecto, el protocolo de Beard & Scott es el más recomendado en cuanto al promedio de pureza y concentración de ADN obtenidas. Mediante el número de casos de HLB detectados se seleccionó el par de cebadores HLB 1999 como los más adecuados. Se seleccionó la receta de la mezcla de reacción y la temperatura de hibridización óptima para dichos cebadores basado en la calidad del ADN amplificado. A pesar de optimizar el proceso de detección, la intensidad del producto amplificado varía principalmente por la concentración de bacteria que cada insecto puede tener. Se recomienda continuar este estudio aplicando el procedimiento optimizado en este trabajo y analizar más individuos provenientes de varias regiones del país.

## ABSTRACT

The Huanglongbing disease (HLB) affects many citrus species, it produces economic losses worldwide because of the low productivity and the low quality of the fruits. The causal agent in Guatemala is the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which is transmitted by the insect vector *Diaphorina citri*. This work has as the main objective to detect the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the vector via traditional polymerase chain reaction (PCR). Since the disease is hard handling it is important to develop methods for its detection; the detection in the vector organism provides more precise results in comparison to vegetal material as regard to presence of the disease. Detection of *C. Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* was possible via traditional PCR; 82 positive cases of HLB were detected off 250 analyzed individuals, being the higher percentage of positives in Santa Rosa (54.17%), Escuintla (46.67%) and Alta Verapaz (45.61%). The optimization of two DNA extraction protocols was made; the protocol of Beard & Scott is the most recommended because of the mean of the DNA purity and concentration. By the number of HLB positive cases detected, the HLB 1999 primer pair was selected as the most adequate. The optimal recipe for the master mix and the optimal melting temperature was selected for the mentioned primers, based on the quality of the amplified DNA product. Despite of the final optimized detection process, the intensity of the amplified DNA varies mostly because of the bacteria concentration in the vector is variable. It's recommended to continue this study using the optimized procedure obtained in this work and analyze more individuals coming from different country regions.

# I. INTRODUCCIÓN

## A. Antecedentes

**1. Descripción de la enfermedad de Huanglongbing.** Enfermedad también denominada como “Greening”, enverdecimiento o moteado foliar, la cual afecta a varias especies de cítricos. Esta enfermedad es causada por una bacteria fastidiosa, *Candidatus Liberibacter*, que se cree originaria de China, lugar de donde proviene su nombre “Huanglongbing” que significa enfermedad del dragón amarillo. La mayoría de especies de cítricos, especialmente cultivares e híbridos son infectados anualmente por este patógeno; sin embargo, consumir productos de plantas infectadas con este patógeno no produce daños a la salud humana. Actualmente se sabe que la enfermedad se presenta en al menos 40 países, distribuida en el continente africano, asiático, americano y en Oceanía. Es la enfermedad más peligrosa para los cítricos, además, se caracteriza por presentarse en lugares con climas cálidos (Timmer *et al.* 2002, Bové 2006).

**a. Sintomatología.** Los síntomas característicos de esta enfermedad son el apareamiento de un brote y moteado amarillo en las hojas (Figura 1). Las ramas también pueden presentar color amarillento, todos estos síntomas debido a la dispersión de la bacteria en la planta. Estos síntomas en un estadio temprano pueden confundirse con deficiencias de nutrientes como la falta de zinc. Otros síntomas son el tamaño pequeño de los frutos, falta de coloración en el lado opuesto al pedúnculo, mientras que el pedúnculo se mantiene de color amarillento. Los frutos poseen un sabor anormalmente amargo, así como un alto contenido en ácidos y bajo contenido en sólidos solubles.

Otro síntoma del fruto es la asimetría en el mismo (Figura 1), así como la presencia de semillas pequeñas abortadas; puede haber coloración café en el eje central del fruto y a veces al presionar con un dedo se puede formar una marca de color plateado. Daños en cítricos por esta enfermedad pueden predisponer a una fácil infección de hongos o a la presencia de coleópteros como *Anoplophora chinensis*, los cuales en estadio

adulto se alimentan de las hojas de cítricos y en estadio larval habitan en el interior del tronco (Timmer *et al.* 2002, Bové 2006, da Graça 2008).

**Figura 1:** Síntomas característicos de Huanglongbing en naranja.

Moteado amarillento no simétrico en las hojas (izquierda) y asimetría del fruto y semillas color café (derecha)



(Bové 2006)

**b. Transmisión.** La enfermedad puede transmitirse por el cultivo mediante el uso de injertos, sin embargo la llegada a los parentales puede darse por medio de dos especies de insectos del orden Hemiptera, los cuales actúan como vectores de la enfermedad (Timmer *et al.* 2002). *Trioza erytreae* es el insecto que transmite la enfermedad en África y *Diaphorina citri* es el que la transmite en Asia y regiones de América (Halbert & Manjunath 2004). La adquisición del patógeno por el vector puede suceder en un tiempo de 30 minutos de alimentación del insecto sobre una planta infectada; sin embargo, pueden pasar de 8 a 12 días hasta que el patógeno sea transmisible de un vector a una planta sana, por esto se establece que la transmisión es de forma persistente. No existe evidencia que afirme que la transmisión de la bacteria sea transovárica, o mediante una línea parental del vector; la vía principal es mediante secreciones salivales del vector (Roistacher 1991, Halbert & Manjunath 2004). En cuanto a la ubicación de la bacteria en la planta, ésta se aloja únicamente en el floema y los síntomas se han reportado más fuertes en áreas secas y cálidas (Bové 2006).

**c. Detección y prevención.** La vía más fácil de detección es mediante la observación de los síntomas característicos de HLB, así como la observación de la

presencia de cualquiera de los vectores. La primera técnica utilizada para detectar al patógeno en el laboratorio fue la microscopía electrónica, la bacteria es fácil de detectar si se observan los haces vasculares que presentan síntomas más evolucionados, ya que ésta posee una pared celular gruesa. Otros métodos de detección incluyen ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), mediante el uso de anticuerpos monoclonales, hibridización de ADN y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Halbert & Manjunath 2004, Bové 2006).

Existen dos pares de cebadores que son los más utilizados para la detección de las especies de *C. Liberibacter*. Hung y colaboradores (1999) desarrollaron un par de cebadores; el cebador forward 5'-CACCGAAGATATGGACAACA-3' y el cebador reverse 5'-GAGGTTCTTGTGGTTTTTCTG-3', para amplificar un fragmento conservado de 226 pares de bases de ADN genómico de la especie *C. Liberibacter asiaticus*. Teixeira y colaboradores (2005) por otro lado, desarrollaron un set de cebadores que puede discriminar entre las tres especies de *C. Liberibacter*. Dichos cebadores amplifican un fragmento del gen 16S ARN ribosomal, el cual consiste en 1160 pares de bases para las especies *C. Liberibacter asiaticus* y *C. Liberibacter africanus*. Dicho par consiste en el cebador forward 5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3' y el cebador reverse 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'. Técnicas más recientes incluyen la amplificación mediante PCR en tiempo real, demostrando mayor sensibilidad que un PCR convencional (Li *et al.* 2007).

HLB es una de las peores enfermedades de cítricos, puesto que actualmente no existe un método para controlarla o revertir los daños; la única manera de combatirla es evitar la dispersión. No existe una cura para dicha enfermedad, las únicas estrategias han sido la eliminación sistematizada de plantas infectadas y el tratamiento químico del vector, es decir, la aplicación de pesticidas. Sin embargo, se ha demostrado que la inyección de antibióticos en las plantas puede ayudar a reducir los síntomas temporalmente. El diagnóstico mediante observación de síntomas se hace difícil, puesto que tiene un período de latencia entre 6 y 12 meses en el cual las plantas infectadas no muestran síntomas. En ocasiones, la detección por técnicas moleculares puede ser difícil,

puesto que las hojas sin síntomas aparentes pueden tener una muy baja concentración de la bacteria (Bové 2006).

En algunas especies de cítricos existe mayor tolerancia a la enfermedad; limas y limones se han demostrado como las más tolerantes, mientras que naranjas y mandarinas son las más susceptibles. Además del control químico existe el control biológico, existen ciertas especies de coleópteros y hongos que pueden atacar a los vectores. *Tamarixia radiata* ha sido una especie de coleóptero efectivo para el control poblacional de *D. citri* en la isla Reunión, en cercanías de Madagascar. Aunque se ha intentado replicar este método de control poblacional, no ha sido efectivo en otras partes del mundo puesto que en esa isla no existían depredadores inmediatos del coleóptero. Especies de hongos como *Cladosporium* spp. pueden ser efectivas para la eliminación de psílidos, sin embargo requieren de condiciones húmedas adecuadas para la dispersión fungal (Halbert & Manjunath 2004).

**d. Situación del HLB a nivel mundial.** Los primeros casos de HLB fueron estudiados a principios del siglo XX en la región de Guangdong, China; sin embargo se estima que la enfermedad se originó a mediados del siglo XIX en esa misma región. Fue hasta 1935 que se convirtió en una amenaza no sólo para China, sino también para otros países asiáticos; se menciona también el apareamiento de los primeros casos de HLB en plantaciones de cítricos en África, quizá por el comercio de los mismos de Asia a África (da Graca 2008, Deng *et al.* 2012). Actualmente se han encontrado más casos positivos de HLB en cultivos de cítricos de varias regiones de Asia, por lo cual la producción de cítricos se ve en decaída (Deng *et al.* 2012). En el caso de América, los primeros casos de HLB en Brasil se detectaron en el 2004, mientras que en Florida en el 2005. Se sabe que el vector estaba presente desde antes que apareciera la enfermedad, pero no se sabe exactamente cómo llegó ésta. Se sabe que las pérdidas monetarias serían devastadoras para los cultivos de cítricos en la región de Sao Paulo, aproximadamente 5.6 mil millones de dólares ocurren de ingresos al año por el comercio de cítricos en esta región. Si bien se sabe que la enfermedad se encuentra en al menos 3 continentes, los métodos para

controlarla no han sido totalmente efectivos hasta el momento (Halbert & Manjunath 2004, Bové 2006, Galvao *et al.* 2012).

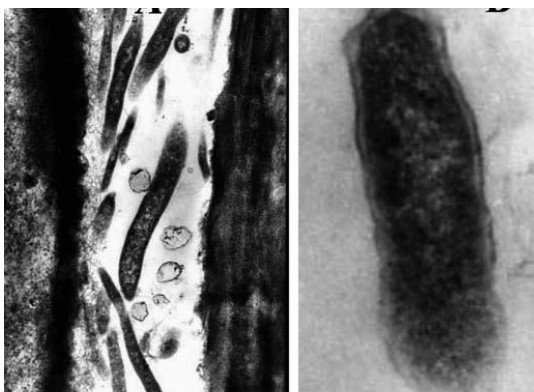
**e. Situación del HLB en Guatemala.** La enfermedad pudo haber ingresado al país en el 2009, pero fue hasta el 2010 que ésta fue detectada y se promulgó una alerta fitosanitaria mediante el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). Se detectaron las primeras plantas enfermas en la región norte del país, siendo Alta Verapaz, Petén e Izabal los primeros departamentos afectados. En el año 2012 y en el 2013 se confirmó la presencia de la enfermedad en plantaciones comerciales y comunitarias de Zacapa, más tarde su expansión a El Progreso y Chiquimula y en el 2014 se detectó por primera vez en Santa Rosa. Es así como se implementaron medidas para controlar la enfermedad, principalmente los productores en El Progreso y Zacapa han contribuido en planes de acción para eliminar plantas infectadas, a medida de evitar la propagación de la enfermedad a plantas sanas. Más de 5000 hectáreas a nivel nacional se encuentran bajo vigilancia y posible control, mientras que se ha iniciado la detección de la bacteria causante de la enfermedad en cortes de tejidos de las plantas mediante PCR de punto final en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Un aspecto interesante es la perspectiva pública de la enfermedad, puesto que se tiene el concepto que es un virus y no una bacteria; a pesar que la enfermedad afecta a varias plantaciones, no se ha dado una gran divulgación pública de la situación nacional actual (*Prensa Libre* 2010, Tapia 2010, *El Periódico* 2012, *La Hora* 2013, Villagrán 2014).

**2. *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** El término *Candidatus* se refiere a bacterias que no han podido ser cultivadas, de esta forma se le atribuye la característica de “fastidiosa”. *Candidatus Liberibacter* es un género de bacterias gram negativas; anteriormente el género que describía a dichas bacterias era *Liberobacter*. Existen tres especies de *C. Liberibacter*: *C. Lib. asiaticus*, que se distribuye en Asia, regiones de centro y sur América y Florida; *C. Lib. africanus* en África y *C. Lib. americanus* que fue reportada por primera vez en Brasil. Son bacterias restringidas al floema, dentro de los vasos conductores de las plantas (Garnier *et al.* 2000, Halbert & Manjunath 2004, Bové 2006).

*C. Liberibacter asiaticus* (Figura 2), al igual que *C. Liberibacter africanus* pertenecen a la subdivisión  $\alpha$  de la clase Proteobacteria. Dicha clase engloba a bacterias patógenas de animales y plantas como *Bradyrhizobium* spp, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bartonella* spp. y *Brucella* spp. Es una bacteria que se encuentra más relacionada a la familia Rhizobiaceae, por lo cual se la podría incluir en el orden Rhizobiales. Ambas bacterias representan un linaje único, además que comparten la característica de utilizar un vector dentro de su ciclo infectivo; sin embargo, una manera de diferenciar a *C. Liberibacter asiaticus* de la especie africana es por la resistencia a calor, puesto que la asiática puede tolerar temperaturas mayores de 30 °C (Bové 2006, Duan *et al.* 2009).

**Figura 2:** Micrografía de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Corte de tubo vascular de naranja con individuos de *C. Liberibacter asiaticus* (izquierda) y micrografía electrónica de un individuo de *C. Liberibacter asiaticus* (derecha)



(Bové 2006)

El genoma completo de *C. Liberibacter asiaticus* ha sido secuenciado, ayudando a determinar la posición filogenética de dicha bacteria en la clase Proteobacteria. El genoma de dicha bacteria es circular con el tamaño de 1,227,204 pares de bases y contenido GC del 36.5%; se han predeterminado 1186 genes, de los cuales a 1136 se les ha estimado su función. Ha sido la primera proteobacteria no cultivable con el genoma totalmente secuenciado, posteriormente se ha realizado lo mismo para las especies africana y americana. Se ha determinado así mismo, que existe alta variabilidad entre la

especie asiática, dada por la alta plasticidad que puede darse entre dos regiones hipervariables de su genoma (Duan *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2011).

**3. *Diaphorina citri* Kumayawa.** Es un artrópodo perteneciente al suborden Sternorhyncha, dentro del orden Hemiptera; pertenece a la familia Psyllidae y el nombre común para esta especie es psílido asiático o psílido asiático de los cítricos (García 2009). *Diaphorina citri* es considerada una de las peores plagas para los cítricos; dicha clasificación se debe a que puede acarrear patógenos, entre los que destaca *C. Liberibacter asiaticus* (Halbert & Manjunath 2004).

**a. Especies de *Diaphorina* y descripción.** Existen 6 especies pertenecientes al género *Diaphorina*, las cuales son separadas principalmente por el patrón de maculación en las alas anteriores y la forma de los conos genales. *D. citri* puede diferenciarse de las otras 5 especies por aspectos como la fórmula tarsal, el patrón de las alas, así como la coloración de las alas posteriores, la cual es oscura para *Diaphorina communis*. Otra diferencia es la forma del ala, para lo cual se diferencia claramente de *Diaphorina punctulata*; mientras que *Diaphorina zebrana* se diferencia en que ésta posee un patrón de rayas en las alas anteriores. Para diferenciar *D. citri* del vector de HLB en África, *Trioza eritreae*, es fácil observar la punta de las alas posteriores con punta pronunciada, mientras que *D. citri* posee las puntas curvadas. *D. citri* generalmente se posiciona en un ángulo de 45° sobre la superficie, haciendo fácil su identificación visual; además, el ápice de las antenas es más oscuro que el de las otras especies y posee coloración marrón claro en la parte media (Halbert & Manjunath 2004, García 2009).

**b. Ciclo de vida.** El ciclo vital de este insecto puede dividirse en 7 estadios, desde huevos, pasando por 5 estadios de ninfa y finalmente el adulto (Figura 5). El tiempo total del ciclo puede durar de 15 a 47 días dependiendo de la temperatura, siendo de 25°C a 28°C la temperatura óptima de desarrollo. Las hembras colocan los huevos en hojas desplegadas o en los brotes nuevos; los huevos son de aproximadamente 0.3 mm, ovalados de color amarillento y con una punta prolongada (Figura 3), se tornan anaranjados con el paso del tiempo. El tiempo de eclosión de los huevos es de 2 a 4 días,

y la puesta generalmente ocurre en primavera, coincidente con el período de brotes de la mayoría de cítricos (Halbert & Manjunath 2004, Grafton-Cardwell 2006, García 2009).

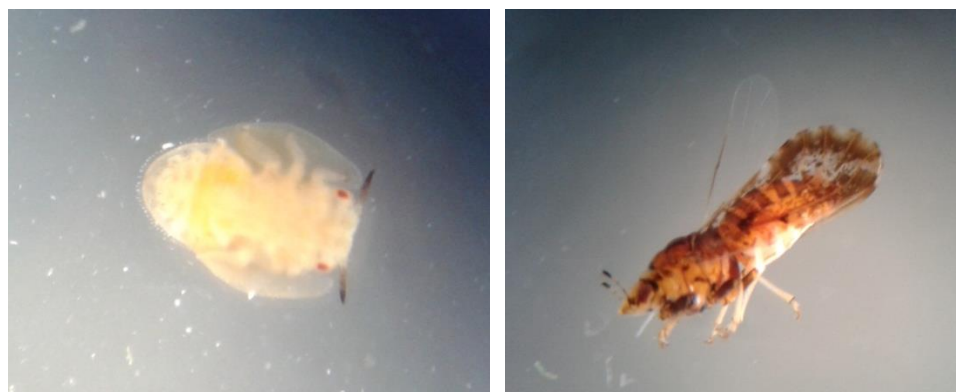
**Figura 3:** Huevos de *Diaphorina citri* en brote vegetal



(García 2009)

**Figura 4:** Fotografía en estereoscopio de *Diaphorina citri*.

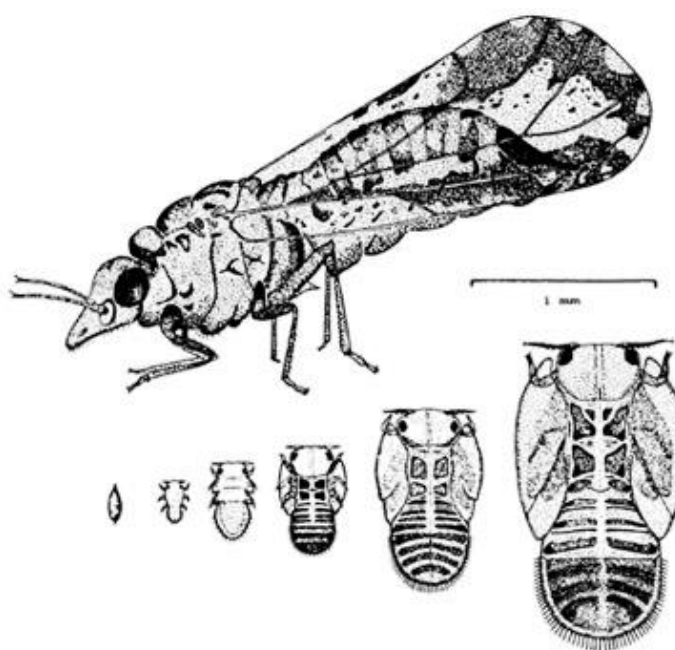
Estadío 4 de ninfa (izquierda) y adulto (derecha)



Las ninfas son aplanadas dorsoventralmente, de color amarillo a anaranjado (Figura 4, izquierda); poseen dos ojos compuestos, alas pequeñas en formación, filamentos en el abdomen y dos antenas pequeñas. Conforme pasa el tiempo de desarrollo éstas crecen; en el primer estadío el largo es de aproximadamente 0.3 mm, llegando a 1.60 mm en el quinto estadío y en este último estadío se observan las alas más desarrolladas. El tiempo de desarrollo de ninfa puede durar de 11 a 15 días. En este estadío puede haber movilidad lenta, y generalmente se ubican en las partes tiernas de la planta para alimentarse de la materia en los haces vasculares. Al momento de alimentarse, las ninfas pueden producir una secreción dulce pegajosa, la cual queda en la planta y

puede propiciar el crecimiento de hongos. Finalmente la maduración ocurre con la transformación a adulto, una hembra puede llegar a poner 800 huevos. El tamaño del adulto es de 3 a 4 mm (Figura 4), siendo la hembra generalmente 1mm más larga que el macho; el abdomen de la hembra tiene una punta muy pronunciada, a diferencia del macho. Los adultos pueden volar distancias cortas, no tienen alta capacidad de vuelo (Grafton-Cardwell 2006, García 2009).

**Figura 5:** Esquema de las etapas del ciclo de vida de *Diaphorina citri* de huevo a adulto  
De huevo a estadio 5 de ninfa (Abajo de izquierda a derecha) y adulto (Arriba)



(Mead & Fasulo 2014)

**c. Hábitat y distribución.** *D. citri* habita generalmente en ambientes cálidos a bajas altitudes; las altitudes con mayor abundancia son entre 1000 y 1200 msnm, aunque pueden extenderse hasta los 1600 msnm. Puede que la tolerancia de esta especie a climas cálidos sea representación de coevolución con su hospedero, *C. Liberibacter asiaticus* (Halbert & Manjunath 2004). Esta especie se encuentra en las regiones tropicales de Asia, especialmente en el sureste asiático y medio oriente; también puede encontrarse en la isla Reunión y Mauricio. En América, *Diaphorina citri* se ha registrado en Estados Unidos, Suramérica (principalmente Brasil), Centroamérica (principalmente

Honduras, Guatemala y Costa Rica) y la cuenca del Caribe (Bové 2006, Grafton-Cardwell 2006, García 2009).

**d. Interacción vector-patógeno.** La interacción entre *D. citri* y *C. Liberibacter* representa un buen ejemplo de coevolución. La adquisición del patógeno es más alta desde el tercer al quinto estadio larval del vector, siendo incluso más alto que el adulto. Se sabe que la transmisión de la bacteria a la planta se da cuando el insecto se alimenta de ésta; tanto las ninfas del tercer y cuarto estadio y el adulto pueden transmitirla. Un aspecto importante es que los adultos que adquieren la bacteria en este estado pueden tardar de 1 a 25 días para poder transmitir la bacteria a una planta; sin embargo, un adulto que adquirió la bacteria en estadio de ninfa puede transmitirla al momento de eclosión al estado adulto. Al momento de adquirir la bacteria, ésta puede replicarse en el tracto alimentario y en las glándulas salivales. Mediante el uso de hibridación *in situ*, se ha determinado que la bacteria puede localizarse en el tracto digestivo, hemolinfa, tejido muscular y glándulas salivales del insecto. La transmisión del patógeno a la planta mediante un solo individuo es muy baja, representando del 4 al 10% de la enfermedad de la planta, por lo cual se asume que la infección de una planta se debe más al conjunto de individuos portadores (Manjunath & Halbert 2008, Hall *et al.* 2012).

**e. Manejo de *Diaphorina citri* y control de la enfermedad.** El control de las poblaciones de *Diaphorina citri* puede ser difícil, puesto que no existe un insecticida totalmente efectivo. Además, si un insecticida es efectivo para matar a toda una población de psílidos, es probable que la enfermedad ya se haya transmitido a los cultivos de la zona. Es por esto que no existe un consenso, según el cual se da un estricto control de las poblaciones de *D. citri* para prevenir el esparcimiento de la enfermedad. De todas formas, se ha recomendado el uso de insecticidas generalizados, aunque otras medidas más efectivas son la eliminación de plantas infectadas y la plantación de árboles certificados libres de la enfermedad. Sin embargo, las medidas de control varían por región, no se cuentan con estudios sobre si el control poblacional de psílidos es una buena opción, pero en Asia y África se sabe que el control poblacional de psílidos ha reducido el número de plantas infectadas (Brlansky & Rogers 2007).

**4. Descripción y distribución de la familia Rutaceae.** Rutaceae es una familia de plantas angiospermas del orden Sapindales; esta es la familia de plantas afectada por la enfermedad HLB. La familia está conformada por árboles o arbustos aromáticos, los cuales poseen glándulas oleíferas especialmente en las hojas y en los frutos. Muchas especies pertenecientes a esta familia poseen espinas generalmente para defensa contra depredadores. Las hojas pueden ser opuestas o alternas según el eje de la rama; pueden encontrarse simples o entre 1 y 3 folíolos, adoptando una forma digitalmente compuesta. Las flores pueden ser solitarias o encontrarse en inflorescencia axilar o terminal, aunque poseen el mismo patrón floral, el cual consiste de 3 a 5 pétalos y sépalos y pueden tener hasta 2 veces el número de estambres que el de pétalos. El fruto es variable, la forma general consiste en un cuerpo carnoso con pulpa comestible el cual es denominado hesperidio, aunque puede ser también una baya redondeada o una drupa (Standley & Steyermark 1946, Parker 2008).

Cuatro características morfológicas establecidas por Swingle y Reece (1967) de esta familia son: Presencia de glándulas oleíferas, ovario elevado sobre el disco floral, presencia de puntos negros en las hojas (puntos pelúcidos) y fruto con placentación axilar. Los cítricos se distribuyen en regiones tropicales y templadas alrededor del mundo, entre las latitudes 40°N y 40°S (Davies & Albrigo 1994, Parker 2008). Los países con mayor producción de cítricos son España, Italia, Grecia, Marruecos, Turquía, Egipto, Argelia, China, Japón y para América, Estados Unidos, México, Belice, Brasil, Argentina y Uruguay (Davies & Albrigo 1994). En Guatemala existen 13 géneros de cítricos, de los cuales 10 son árboles (Parker 2008).

## **5. Principales cítricos cultivados en Guatemala**

**a. Limón criollo.** *Citrus aurantifolia*, a veces también denominado *Citrus limona*. Árbol pequeño con ramas irregulares, posee espinas de 5 a 7.5 cm de largo y las flores son blancas, pequeñas y a veces ubicadas en las partes axilares. El fruto es verde-amarillento en maduración y mide de 3 a 6 cm de diámetro; es un cítrico mayormente

cultivado aunque también ha sido naturalizado en ciertas localidades (Standley & Steyermark 1946). Según estadísticas del MAGA (2013), en el país se utilizaron aproximadamente 9700 manzanas para el cultivo de limón en el año 2011, estimando un área de 9500 manzanas para el año 2013. Los departamentos con mayor producción de limón son: Escuintla (17%), Santa Rosa (16%), Retalhuleu (11%), Suchitepéquez (11%), El Progreso (7%), San Marcos (7%) y Alta Verapaz (6%) (MAGA 2013).

**b. Limón persa.** *Citrus latifolia*. Árbol de mediano tamaño con ramificación irregular; las flores son pequeñas de color blanco a rosado con aroma peculiar. El fruto es verdoso ovalado de entre 4 y 7 cm de diámetro, dicho fruto no posee semillas. Es un cultivo de crecimiento en el país, a partir de los años 2000 y 2001 se ha dado un incremento en las áreas de producción y la cantidad exportada. El 58% de la producción de limón persa se da en Escuintla, siendo Zacapa y Santa Rosa los segundos mayores productores. Sin embargo, Alta Verapaz, Suchitepéquez y Baja Verapaz son también productores de este fruto (Anacafé 2004).

**c. Naranja.** *Citrus sinensis*. Árbol de mediana estatura con ramificación regular; puede o no tener espinas y éstas pueden ser flexibles. Las flores son de corola blanca y medianas, el fruto es globoso de más de 10 cm de diámetro, de color anaranjado y posee un sabor entre dulce y ácido. Es una fruta introducida luego de la conquista, actualmente es uno de los cultivos más importantes para el país (Standley & Steyermark 1946). En el 2011 se utilizaron aproximadamente 8200 manzanas para el cultivo de esta planta en el país; siendo Suchitepéquez (31%), Escuintla (14%) y Santa Rosa (13%), los departamentos con mayor producción (MAGA 2013).

**6. Aspectos económicos de los cítricos.** Muchas especies son importantes por la fuente de madera para construcción; sin embargo la mayor fuente de ingresos se da por el comercio de frutos comestibles, especialmente los del género *Citrus* (Parker 2008). En Guatemala, de la población económicamente activa, el 32.3% se dedica a actividades de agricultura y el 29% al comercio; representando así los porcentajes más altos sobre el

desarrollo económico de la población económicamente activa según cifras del 2012. El producto interno bruto para el rubro de agricultura, silvicultura, caza y pesca representa 29,000 millones de quetzales, según cifras estimadas para el año 2012. De ese monto, aproximadamente 10.5 millones de quetzales corresponden al ingreso anual por comercio de cítricos hasta cifras del 2010, representando un área de cultivo de 12,000 hectáreas para estas plantas. Además la industria citrícola ha representado hasta 11,278 empleos en el país según cifras del 2011, para al menos los cultivos de naranja, limón, lima y mandarina. En cuanto a la región centroamericana y de República Dominicana los empleos llegan a ser hasta 177,524 según datos del Organismo Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). Estos cultivos son en su mayoría exportados a otros países, principalmente a Estados Unidos y otros países de Centroamérica, representando un alto ingreso económico en millones de dólares (*El Economista* 2013, MAGA 2013).

En Guatemala, la alta demanda y exportación de cítricos, al menos naranja y limones, trae como consecuencia un incremento en los precios locales, por lo cual es importante mantener los cultivos de manera productiva (MAGA 2014). Un aspecto que ha reducido la productividad de estas plantas en los últimos años ha sido el esparcimiento de enfermedades causadas por virus como la Tristeza de cítricos, y enfermedades causadas por bacterias como Clorosis variegada y HLB. Se ha señalado que el tiempo de la industria citrícola está contado si no se toman las medidas correspondientes para el control del HLB (*El Economista* 2013).

## B. Justificación

HLB puede catalogarse como la peor enfermedad de cítricos (Bové 2006), de acuerdo a aspectos epidemiológicos como la alta susceptibilidad de los cultivos, el poco control y el hecho de que no existe una cura. Se sabe además que esta enfermedad puede transmitirse a otras plantas que no son de la familia de los cítricos (Halbert & Manjunath 2004). Es una enfermedad que no causa daños a la salud humana pero en los cítricos genera características visuales y de sabor que no son apreciadas por las personas. Es así como los riesgos de esta enfermedad son en cuanto a la productividad y consecuentemente la economía bajo el rubro de la producción de cítricos. Se ha determinado que el riesgo de infección es mayor en árboles jóvenes, puesto que los nuevos brotes de ramas en general atraen al vector para la puesta de huevos. Además, el dosel para árboles jóvenes es menor, por lo cual la enfermedad se puede propagar rápidamente en toda la planta (Bassanezi & Bassanezi 2008).

En Guatemala existe cierta dependencia económica por el comercio de cítricos, principalmente por pequeños productores y empresas dedicadas a la compra-venta de los frutos. La expansión de la enfermedad de Huanglongbing hacia más departamentos, principalmente a los de mayor producción, puede suponer riesgos en cuanto a la economía interna. La enfermedad fue detectada por primera vez a finales del 2009 en la frontera con Belice y posteriormente en Alta Verapaz; en el 2013 se ha determinado que la enfermedad se presenta en Izabal, Alta Verapaz, Jutiapa, Zacapa y El Progreso, departamentos que poseen las más grandes áreas de producción de cítricos (*Prensa Libre* 2013, *El Periódico* 2014). Actualmente 5,487 hectáreas se encuentran bajo vigilancia para controlar el esparcimiento de la enfermedad, el MAGA ha implementado medidas para capacitar a los agricultores y controlar la enfermedad, principalmente mediante fumigaciones para atacar al vector y recientemente control biológico mediante la avispa *Tamarixia radiata* (Tapia 2010, *Prensa Libre* 2014)

En cuanto una planta es infectada es imposible curarla; cabe mencionar que los síntomas pueden expresarse hasta 6 meses o un año después de la infección, por lo cual detectar la enfermedad en estadio inicial es difícil. Además, la enfermedad no es sistémica, la bacteria puede no estar en todas las partes de la planta, por lo cual al momento de tomar una parte de la planta para la detección puede que dicha parte demuestre un resultado negativo. Es por esto que la detección debería realizarse en *Diaphorina citri*, éste puede contener a la bacteria desde un estadio juvenil y se puede realizar extracción de ADN con el individuo completo. Esto también puede dar una idea de cómo se distribuye la enfermedad en el campo, en representación por las poblaciones del vector. Se sabe que *C. Liberibacter asiaticus* es una bacteria un tanto enigmática, por lo que su detección mediante anticuerpos monoclonales y microscopía electrónica ha dado resultados ambiguos (Bové 2006); es por esto que se han utilizado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

La detección de la bacteria en el vector puede traer como ventaja dar una idea global y más real sobre la incidencia de HLB en el país, puesto que como ya se mencionó anteriormente, no todos los árboles demuestran los síntomas de dicha enfermedad. Es así como la presencia de la bacteria en las poblaciones del vector dan una idea más exacta sobre la presencia de la misma. Los protocolos finales que se obtendrán de este trabajo fortalecerán las técnicas de detección a nivel molecular de la bacteria *C. Liberibacter asiaticus* en el vector a nivel nacional. De esta forma los hallazgos en cuanto a presencia del patógeno en distintos lugares pueden contribuir para futuras asesorías en cuanto al manejo de los cultivos y medidas para controlar el esparcimiento de la enfermedad.

## C. Objetivos

### 1. General

- Detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en el vector *Diaphorina citri*, causante de la enfermedad en cítricos llamada Huanglongbing.

### 2. Específicos

- Protocolo optimizado de extracción de ADN a partir de un solo individuo del vector *Diaphorina citri* con la calidad necesaria para un PCR de punto final.
- Reacción de amplificación optimizada para la detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el vector mediante PCR de punto final, cuyo producto sea secuenciable.
- Detección de la presencia de Huanglongbing con el método de extracción y PCR de punto final en muestras de *Diaphorina citri* provenientes de diferentes regiones citricultoras del país.

## II. MÉTODOS

### A. Procedimiento

**1. Descripción de muestras y almacenamiento.** Las muestras consisten en insectos de la especie *Diaphorina citri*, familia Psyllidae, almacenados en viales o frascos con etanol al 80%. Dichas muestras son provenientes de diversas colectas en el año 2013 y 2014 de los departamentos de Alta Verapaz, Escuintla, Izabal, Jutiapa, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa. Estas corresponden a colectas de personas individuales, productores de empresas citrícolas o entidades asociadas al monitoreo científico de HLB en el país. Las muestras fueron almacenadas en un cuarto frío, a temperatura de 4°C en el Laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

**2. Colecta de muestras.** Adicionalmente a las muestras presentes en el Laboratorio de Protección Vegetal, se realizaron otras colectas, dichas colectas se realizaron en Alta Verapaz en el mes de abril del 2014. Los insectos fueron capturados de forma manual o utilizando aspiradores. En la forma manual se atrapa al insecto y se deja caer en un frasco con etanol al 70% o 80%. El aspirador consiste en un vial de vidrio conectado a dos tubos de hule, de los cuales un tubo es para aspirar y el otro para permitir la entrada del insecto al vial mediante la acción aspiradora. Luego de aspirar el insecto, éste cae en el frasco colector, para luego agregarle etanol al 80% y cerrar rápidamente.

Cada frasco de colecta fue rotulado con la fecha de colecta, colector y lugar de colecta. A cada muestra se le asignó un código de identificación; dicho código consiste en la letra “P” (inicial de Psyllidae) seguida de tres dígitos, iniciando desde el número 1. Por ejemplo, empezando desde la primera muestra, las primeras tendrían el código P001, P002, P003 y así sucesivamente. Las muestras utilizadas para la optimización del método fueron de la P061 a la P063, puesto que provienen de Alta Verapaz, una zona muy afectada por HLB y porque se contaron con muchos individuos para cada muestra.

La selección de individuos antes de iniciar con el proceso de extracción se realizó en base a la observación de características morfológicas bajo un estereoscopio. Primero se observó la inclinación del tórax y abdomen, la cual es de aproximadamente entre 40 y 45° al considerar el posicionamiento de las patas sobre una superficie (Anexos: Inciso O). El patrón de maculación de las alas se observó similar para todos los individuos, al igual que la presencia de pigmentación café irregular. Finalmente la forma de la cabeza, la cual es levemente aplanada dorsoventralmente y los procesos genales en forma cónica según García-Pérez *et al.* (2013) (Figura 6).

**Figura 6:** Proceso genal cónico en *Diaphorina citri*



(García-Pérez *et al.* 2013)

**3. Optimización de la extracción de ADN.** La extracción de ADN se realizó con un sólo insecto; la estandarización fue basada en dos protocolos de extracción diferentes, sin embargo, a uno de ellos se le realizó una modificación pequeña para contar con tres métodos finales para evaluar. Antes de iniciar con el procedimiento de extracción, los insectos se sacaron del frasco de colecta y se colocaron sobre una servilleta de papel para remover el exceso de etanol.

**a. Protocolo de Beard & Scott.** Este protocolo publicado en el 2013 es el utilizado para la extracción de ADN de psílidos de la papa, inicialmente se le realizaron las siguientes modificaciones. Se utilizó un solo individuo y en lugar de macerar los insectos en seco antes se agregó buffer CTAB 2X (2% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl) y luego se procedió a macerar y centrifugar a 12,000

rpm por 20 minutos en lugar de 16,000 g. Luego de lavar el pellet en etanol al 70%, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos.

**b. Protocolo de Hung *et al.* 2004.** Este protocolo es utilizado para la extracción de ADN de psíidos de los cítricos, y se realizaron las siguientes modificaciones iniciales. Se realizó un lavado con aproximadamente 500  $\mu$ l de buffer de extracción (Tris-Base 0.1M; EDTA 0.1M; NaCl 0.25M, pH 8.0) dentro del tubo de 1.5 ml. Se agregó el sarkosyl al 10% separado del buffer de extracción, correspondiendo así un volumen de 270  $\mu$ l de buffer y 30  $\mu$ l de sarkosyl 10%. No se realizó el lavado con etanol al 70%, y la elución del ADN se realizó en buffer TE, aproximadamente 30  $\mu$ l.

**c. Protocolo de Hung *et al.* con adición de proteinasa K.** Basado en el protocolo descrito anteriormente, sin embargo se realizó la digestión de proteínas utilizando la enzima Proteinasa K (20 mg/ml). La enzima se agregó luego de agregado el buffer de extracción y el sarkosyl, permitiendo su actividad en el paso de incubación a 55°C.

**4. Cuantificación e integridad de ADN.** El ADN extraído de las muestras utilizadas para la estandarización fue cuantificado mediante un espectrofotómetro UV. Se realizaron diluciones de cada muestra en una proporción ADN/Agua destilada (1:99) en tubos Eppendorf de 0.6 ml, correspondiente al rango de lectura apropiado para el espectrofotómetro. La calibración para las mediciones se realizó utilizando agua destilada como control, midiendo dicho control cada 2 o 3 muestras. Para determinar la concentración de ADN se utilizó la fórmula:  $(\text{ng}/\mu\text{l}) = (A_{260} - A_{320}) * 50 * 100$ , donde “A” indica la absorbancia a la longitud de onda indicada, “50” el factor de conversión y “100” es el factor de dilución. Adicionalmente se determinó la pureza del ADN extraído mediante el cociente entre las absorbancias 260 y 280 ( $A_{260}/A_{280}$ ). Con base en la concentración y pureza determinadas para las muestras se realizaron las diluciones respectivas en agua ultrapura para contar con soluciones que contengan entre 50 y 100 ng/ $\mu$ l de ADN.

Para evaluar la integridad del ADN extraído en base a los protocolos, se realizaron geles de agarosa al 1%, cargando 2.5  $\mu$ l de escalera de marcadores para PCR (50-2000 pb) y 4  $\mu$ l de cada muestra en pozos separados. El tiempo de corrida de la electroforesis fue de 80V por 50 minutos.

**5. Optimización de la reacción de amplificación.** La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Se utilizaron dos pares de cebadores separados para amplificar el producto y comparar el resultado entre ambos; estos son los propuestos por Hung *et al.* (1999) y los de Texeira y colaboradores (2005). Se evaluó si existe diferencia significativa entre ambos pares de cebadores en cuanto a muestras amplificadas mediante el análisis de  $X^2$ , utilizando un intervalo de confianza del 95%.

La mezcla de amplificación base, para volumen de 25  $\mu$ l, consiste en los siguientes componentes: Agua tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC), buffer de amplificación sin  $MgCl_2$  1X,  $MgCl_2$  4mM, dNTP's 0.2 mM, cebador forward 0.2 $\mu$ M, cebador reverse 0.2  $\mu$ M, 0.75 U de Taq polimerasa y 1  $\mu$ l de ADN. En base a las concentraciones presentadas, se variaron las concentraciones de algunos componentes a manera de obtener mejores resultados durante la amplificación.

Las condiciones de amplificación iniciales en el termociclador son las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 3 min para desnaturalización; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min; y un ciclo de 72°C por 10 min para la extensión final. Se realizó un PCR utilizando gradiente para determinar la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) óptima para los cebadores HLB 1999, dicho gradiente se programó en el termociclador T-100 de BioRad® y consistió en un intervalo de aproximadamente 16°C como punto central 57°C la cual es la  $T_m$  teórica para dichos cebadores.

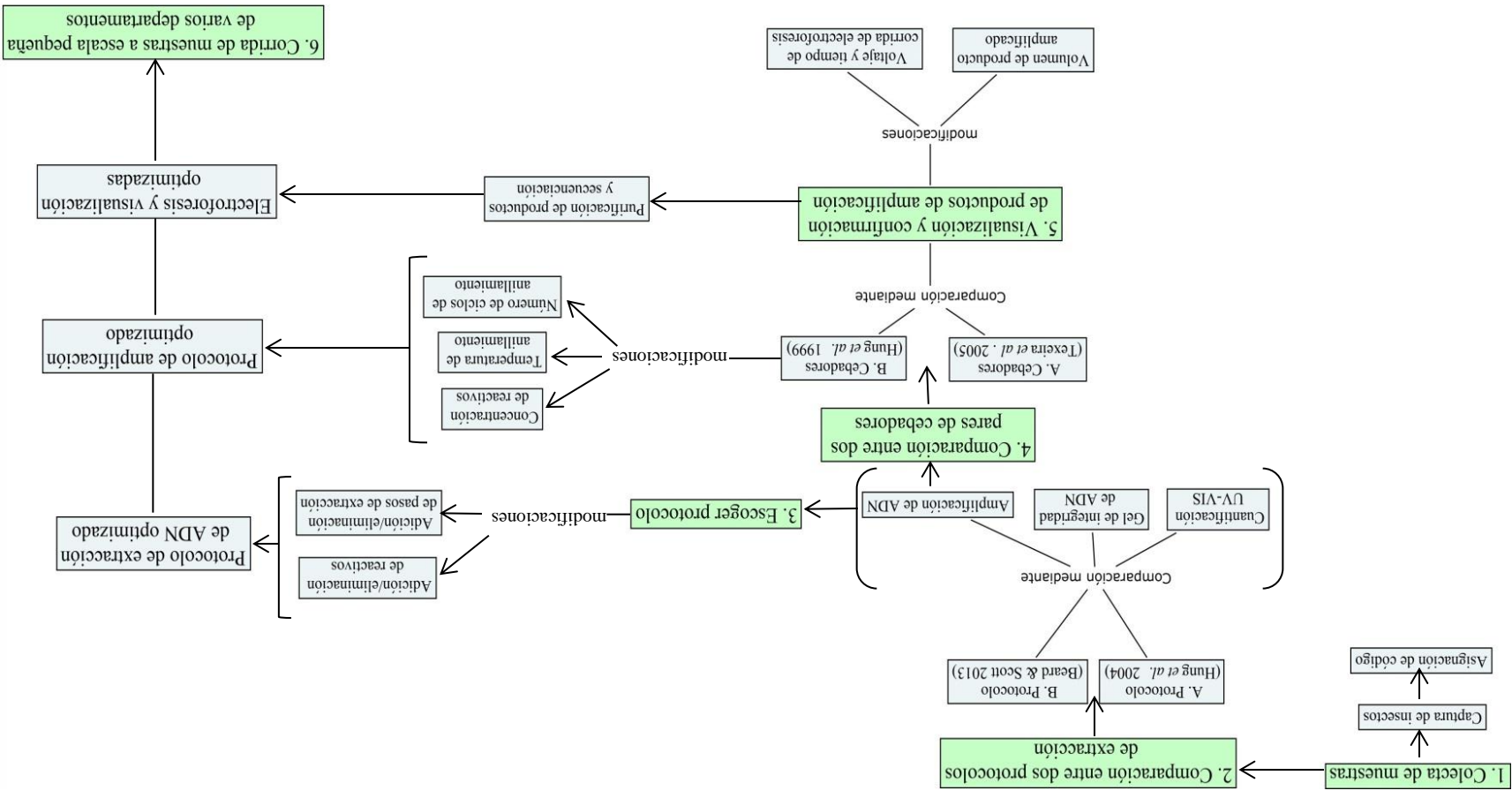
**6. Electroforesis y visualización.** La visualización de los productos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se realizaron corridas con geles de 1.5% y 2% de agarosa para los productos de los cebadores de Hung *et al.* (1999) y al 1% para los

productos de los cebadores de Texeira *et al.* (2005) debido al tamaño de los productos de cada par de cebadores (Ver Anexos, inciso K). Otra variable a probar fue el volumen de producto de amplificación cargado, siendo el inicial 5  $\mu$ l y variando luego dependiendo de las condiciones observadas en el porcentaje de agarosa. Luego de los resultados observados con las variables anteriores, se realizaron pruebas para cambiar el voltaje, siendo el inicial de 85 V. Los geles fueron observados en un transiluminador UV, se capturaron en fotografía y se almacenaron en digital para posterior análisis y registro.

**7. Monitoreo pequeño de HLB en Guatemala.** Luego de haber obtenido las condiciones óptimas desde el procedimiento de extracción de ADN, la reacción de amplificación y la electroforesis y visualización, se realizó la corrida de psíidos provenientes de 8 departamentos de Guatemala. Dichos departamentos fueron Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Jutiapa, Escuintla, Santa Rosa, Suchitepéquez y San Marcos. Puesto que provienen en su mayoría de colectas no estandarizadas, el resultado se transformó a porcentaje de casos positivos según el número de individuos por departamento.

**8. Purificación de muestras positivas y secuenciación.** Para confirmar la identidad de los productos, se purificaron algunas muestras en triplicados utilizando el kit de purificación de Novagen, número de catálogo 70976-3AT. Se adaptó el volumen de cada reactivo utilizado en la purificación para un volumen total de producto amplificado en triplicado de 50  $\mu$ l. Luego, dichas muestras purificadas se corrieron en electroforesis de agarosa; 20  $\mu$ l del producto final se separaron en un tubo diferente y se destinaron para ser secuenciados. Con los resultados de cada muestra se llegó a una secuencia consenso mediante el programa Sequencher 5.1<sup>TM</sup> y se realizó un BLAST ® para confirmar la identidad de la misma.

**Figura 7:** Esquema de trabajo para la optimización del método de detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaaphorina citri* mediante PCR de punto final y análisis de muestras de departamentos



### III. RESULTADOS

#### A. Comparación entre protocolos de extracción

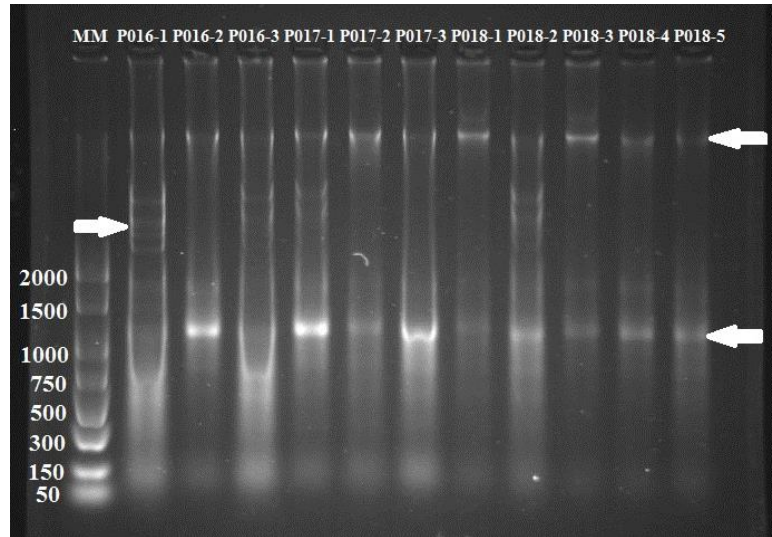
**1. Pureza y concentración de ADN según tres protocolos.** Para evaluar la calidad de ADN obtenido de cada protocolo, se calculó el promedio y la desviación estándar de la pureza y concentración obtenidas mediante cada método de extracción (Cuadro 1). Los promedios presentados en el Cuadro 1 para cada método se dieron en base a doce muestras extraídas bajo su respectivo método de extracción.

**Cuadro 1:** Promedio y desviación estándar de la pureza y concentración de ADN obtenida mediante tres protocolos de extracción

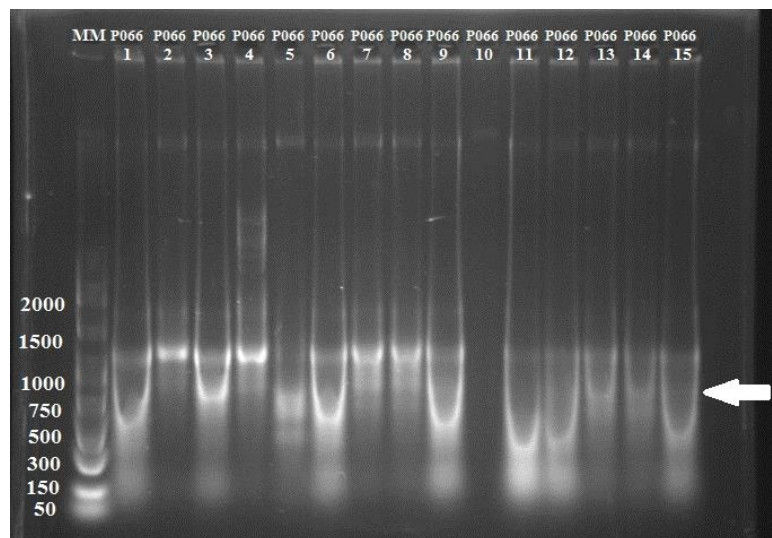
Protocolo	Pureza (A260/A280)		Concentración (ng/μl)	
	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	S
<b>Hung <i>et al.</i></b>	2.13	0.22	740.83	335.75
<b>Hung <i>et al.</i>+prot. K</b>	2.06	0.66	476.17	333.20
<b>Beard &amp; Scott</b>	1.91	0.26	118.25	42.6

**2. Integridad.** Al comparar la integridad de ADN extraído mediante los protocolos evaluado, en cuanto a los productos mediante el método de Hung y colaboradores con proteinasa K, se observan patrones de bandas de ADN (Figuras 8 y 9). En algunas muestras se observan otras bandas de distintos tamaños (Ver Figura 8, flecha a la izquierda), así como degradación del ADN total puesto que se observa un barrido constante mayormente visible en la Figura 9 (ver flecha).

**Figura 8:** Gel de integridad de ADN extraído de psíldos de Izabal mediante el protocolo de Hung y colaboradores + proteinasa K



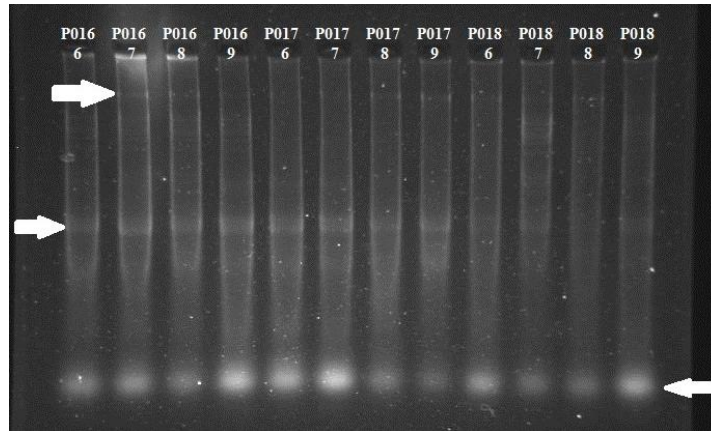
**Figura 9:** Gel de integridad de ADN extraído de psíldos de Zacapa mediante el método de Hung y colaboradores + proteinasa K



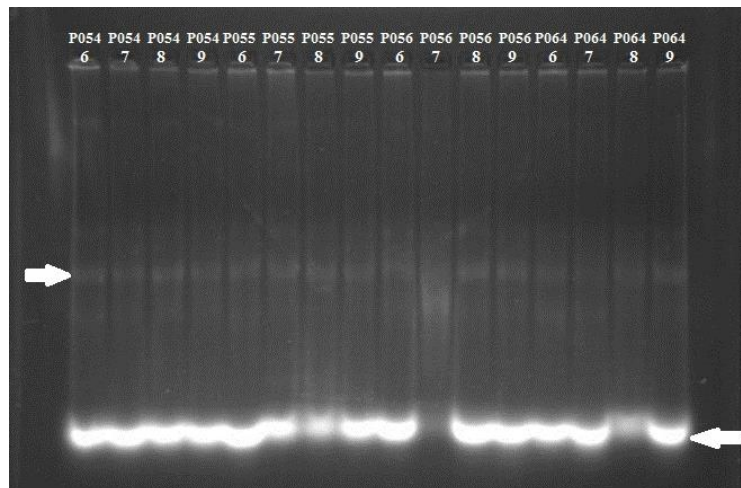
Las muestras extraídas mediante el método de Beard & Scott demuestran al igual que las presentadas mediante el otro protocolo, un patrón de bandeo o fragmentación de ADN. Sin embargo, en este método sólo se observan dos bandas (Flechas superiores, Figura 10); aunque podría considerarse otro fragmento de ADN de mayor tamaño a la altura del pozo de carga de muestra. En este método es fácilmente visible la presencia de

ARN (Flechas inferiores, Figura 10 y 11), comparado con las muestras en las Figuras 8 y 9.

**Figura 10:** Gel de integridad de ADN extraído de psílicos de Izabal mediante el método de Beard & Scott



**Figura 11:** Gel de integridad de ADN extraído de psílicos de Zacapa mediante el método de Beard & Scott

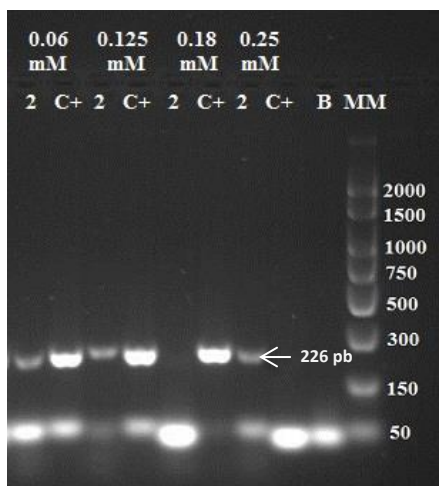


## B. Optimización de la reacción de amplificación

La optimización de la reacción de amplificación se realizó en paralelo con la optimización del procedimiento de extracción de ADN y electroforesis. Este procedimiento se divide en la estandarización de la receta del master mix, la optimización de la temperatura de hibridación y la comparación entre dos pares de cebadores.

**1. Optimización de la mezcla de amplificación.** Las condiciones iniciales de amplificación se adaptaron en base a la publicación de Hung y colaboradores (1999), en la cual se propuso al par de cebadores utilizados en este estudio, para amplificar una región genómica de 226 pares de bases de la bacteria *C. Liberibacter asiaticus*. Los reactivos que se variaron en cuanto a concentración fueron el cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), dNTPs, los cebadores y la enzima Taq polimerasa. Para la evaluación de la mejor concentración de dNTPs se realizó una escalera de mezclas de reacción, tomando 4 concentraciones diferentes de dicho reactivo y observando la calidad de las bandas amplificadas. En la Figura 12 se observa que la intensidad de las bandas es similar entre cada muestra, por lo cual las cuatro concentraciones de dNTPs para una reacción son igual de funcionales para la amplificación del producto.

**Figura 12:** Gel de productos de la muestra P062-2 (2) y control positivo (C+) con variaciones en la concentración de dNTPs



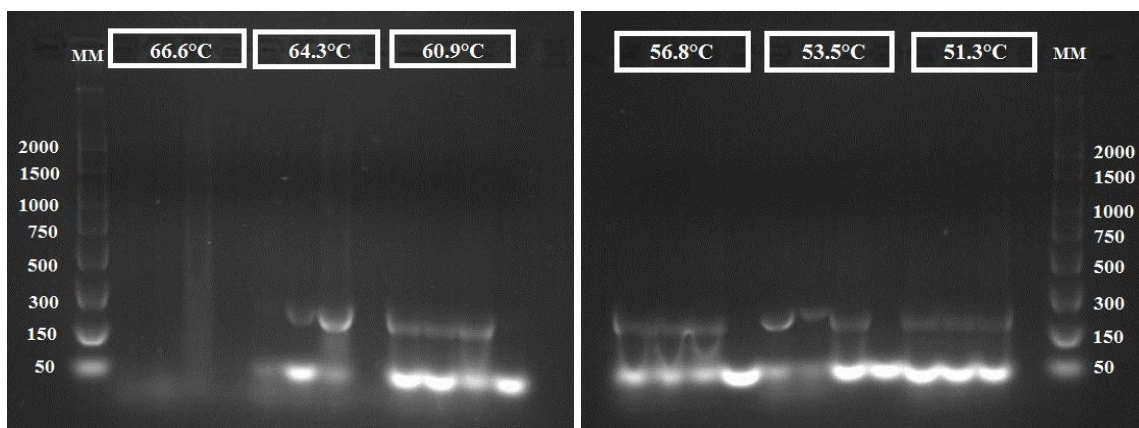
Mediante pruebas adicionales se llegó al protocolo de reacción descrito en el Cuadro 2. Entre las observaciones principales está la reducción del volumen de reacción de 25  $\mu\text{l}$  a 21  $\mu\text{l}$ , siendo en total 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción sin el ADN templado. El volumen de muestra a cargar generalmente es de 1  $\mu\text{l}$ , si se trabaja con ADN extraído del protocolo de Beard & Scott modificado.

**Cuadro 2:** Concentración de reactivos para la mezcla de amplificación para un volumen de master mix de 20  $\mu\text{l}$

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración stock</b>	<b>Concentración 1 reacción</b>
H <sub>2</sub> O DEPC	----	----
Buffer	10X	1.25X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.8 mM
dNTPs	2.5 mM	0.125 mM
HLB 1999 F	8.25 $\mu\text{M}$	0.20 $\mu\text{M}$
HLB 1999 R	8.25 $\mu\text{M}$	0.20 $\mu\text{M}$
Taq. Pol	5U/ $\mu\text{l}$	1U
ADN		50-100 ng/ $\mu\text{l}$
<b>Volumen Total</b>		<b>21 <math>\mu\text{l}</math></b>

**2. Optimización de la temperatura de hibridación.** La temperatura de hibridación ( $T_m$ ) teórica para los cebadores HLB 1999 se encuentra entre los 56°C y 57°C, por lo cual se esperaba mantener la temperatura original descrita en la publicación de Hung y colaboradores (1999). A  $T_m$  alta no se obtuvo amplificación alguna (Ver Figura 13) por lo cual temperaturas mayores a 65°C quedaron descartadas. En las temperaturas restantes, si bien ocurrió amplificación, se observa cierta degradación o variabilidad en la curvatura de las bandas.

**Figura 13:** Gel de productos de la muestra P061-11, P061-13 y control positivo mediante gradiente de la Temperatura de hibridación ( $T_m$ ) para los cebadores HLB 1999



El programa de amplificación para los cebadores HLB 1999 se cambió levemente, el principal cambio fue la  $T_m$  establecida en 60°C pero también se añadieron 2 ciclos de amplificación más además de los 30 originales del programa (Ver Cuadro 3). Luego de varias pruebas se determinó que este programa final de amplificación también es útil para los cebadores OIc-OI2c, de manera que dicho programa queda estandarizado para ambos pares de cebadores.

**Cuadro 3:** Programa final de reacción para los cebadores HLB 1999 y OIc-OI2c

Paso	Temperatura	Tiempo	
1	94°C	3 min	
2	94°C	1 min	} 32X
3	60°C	1 min	
4	72°C	2 min	
5	72°C	10 min	
6	4°C	“hold”	

**3. Comparación entre cebadores.** En total, se corrieron 98 muestras tanto con los cebadores propuestos por Hung *et al.* (1999), cebadores HLB 1999, como con los cebadores propuestos por Texeira *et al.* (2005), cebadores OIc-OI2c. Estos últimos no fueron optimizados puesto que se trabajó con una receta sobre mezcla de reacción ya optimizada para la detección de HLB en muestras de tejido vegetal. De los 98 casos se detectaron 55 mediante los cebadores HLB 1999, mientras que mediante los cebadores OIc-OI2c solo se detectaron 16 (Ver Cuadro 4).

**Cuadro 4:** Comparación entre dos pares de cebadores mediante la prueba estadística  $\chi^2$

Cebadores	Positivos	Negativos	Total
HLB 1999	55	43	98
OIc-OI2c	16	82	98
Resultados prueba $\chi^2$			
$p= 0.0068 \times 10^{-6}$	Intervalo= 95%	G.L.= 1	

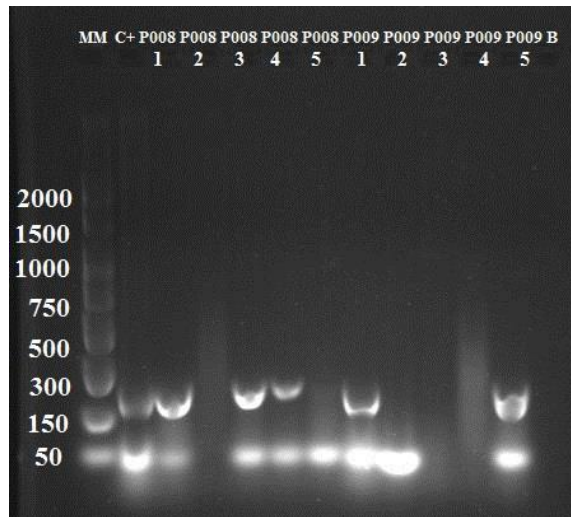
La prueba estadística sugiere que existe diferencia significativa entre la proporción de muestras detectadas por los dos pares de cebadores, a simple vista se sabe que los cebadores HLB 1999 son los más sensibles.

### C. Optimización de condiciones de electroforesis y visualización

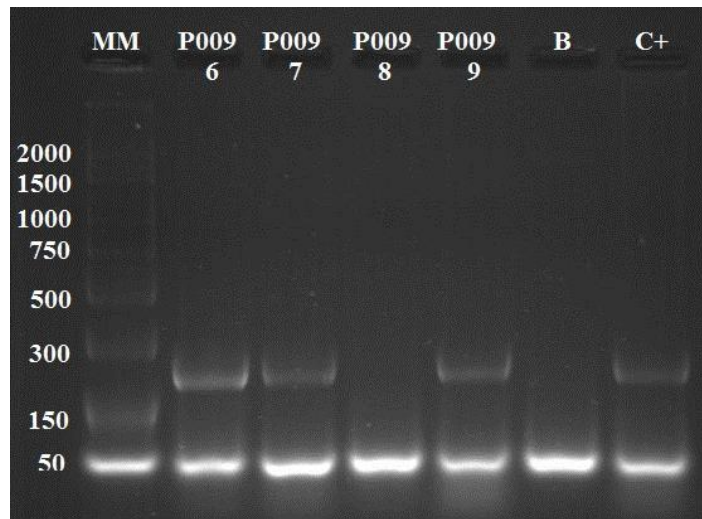
El porcentaje óptimo de agarosa para los productos de los cebadores HLB 1999 al que se llegó fue al 2%, utilizando 0.75  $\mu\text{l}$  de Gelred™ como tinción. El volumen de producto a cargar por cada muestra puede ser entre 4 y 5  $\mu\text{l}$  y de marcador molecular pueden cargarse entre 2.5 y 3  $\mu\text{l}$  (Ver Figura 15). Las condiciones de electroforesis finales son de 75 voltios a 50 minutos para la corrida, además se sugiere utilizar el buffer TAE 1X de corrida a temperatura entre 4 y 10°C. En la Figura 14 se observa un gel con las condiciones iniciales: 1.5% de agarosa, corrido a 85 V por 45 minutos y con buffer a

temperatura ambiente; comparado con un gel con las condiciones estandarizadas mencionadas anteriormente (Figura 15).

**Figura 14:** Gel de productos de amplificación de muestras de Alta Verapaz mediante condiciones no optimizadas de electroforesis



**Figura 15:** Gel de productos de amplificación de muestras de Alta Verapaz mediante las condiciones estandarizadas de electroforesis



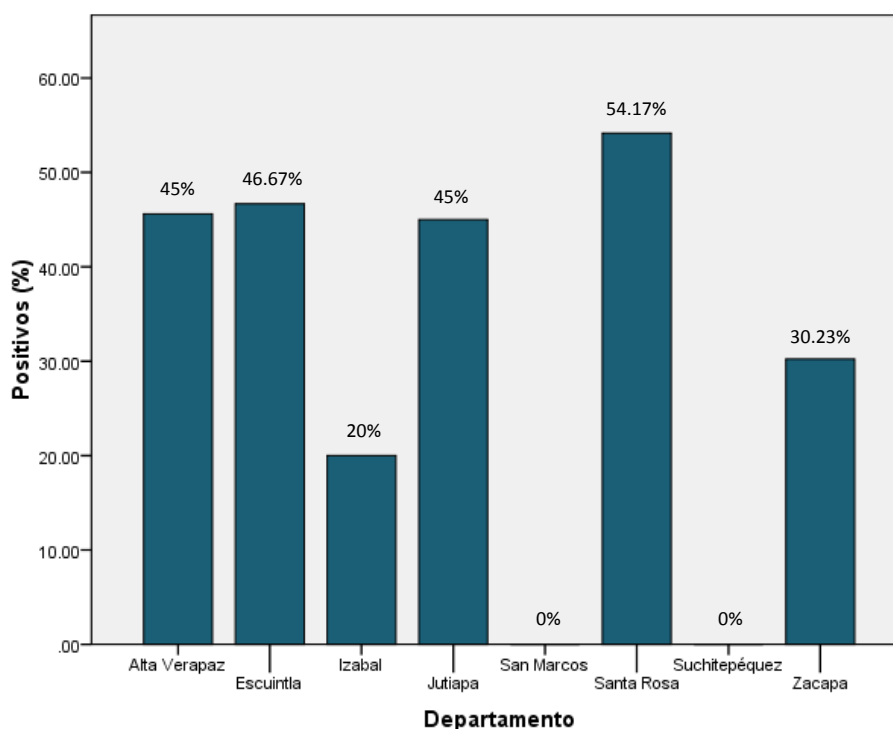
## **D. Confirmación de identidad de productos amplificados mediante secuenciación**

A lo largo del proceso de optimización y durante la corrida de insectos de varios departamentos, se realizó la purificación de un total de 10 muestras positivas, en las cuales dos corresponden a controles positivos diferentes. De esas 10 muestras sólo 4 fueron posibles de llegar a una secuencia consenso mediante el programa Sequencher (Ver Anexos, inciso L). La identidad de dichas secuencias fue confirmada en BLAST® por un porcentaje de identidad del 99% correspondiente a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, lo cual es evidencia adicional que corrobora la amplificación de un producto esperado.

## **E. Casos detectados de HLB en Guatemala**

El análisis de muestras provenientes de 8 departamentos de Guatemala se realizó con las condiciones estandarizadas para los cebadores HLB 1999, luego de determinar que éstos poseen mayor especificidad para la detección de HLB comparado con los cebadores propuestos por Texeira y colaboradores (2005). En total, se analizaron 250 individuos; siendo 57 individuos de Alta Verapaz, 20 de Jutiapa, 43 de Zacapa, 30 de Escuintla, 24 de Santa Rosa, 30 de Izabal, 22 de San Marcos y 24 de Suchitepéquez. A manera de visualizar de mejor manera los casos positivos por departamento, estos se transformaron a porcentaje, para tener una mejor visión sobre el estado de HLB en cada departamento analizado. El departamento con mayor número de positivos fue Santa Rosa (54.17%), seguido por Escuintla (46.67%), Alta Verapaz (45.61%) y Jutiapa (45%) (Ver Figura 16).

**Figura 16:** Casos de HLB detectados mediante PCR de punto final en *Diaphorina citri* provenientes de cultivos de cítricos de Guatemala



La detección de casos positivos de HLB en psílidos se realizó principalmente para corroborar la aplicación del método final optimizado, se tiene claro que este análisis representa una muestra poblacional pequeña ( $n=250$ ) y que para mayor relevancia, el muestreo debería realizarse en varias localidades distribuidas en distintos departamentos. Cabe mencionar que luego de la estandarización del método, en algunos casos el producto amplificado se observa tenue en el gel de agarosa.

## IV. DISCUSIÓN

### A. Comparación entre protocolos de extracción

**1. Pureza y concentración de ADN según tres protocolos.** De los tres métodos de extracción comparados, se observa que la pureza se encuentra en rangos que podrían considerarse aceptables, sin embargo, el método de Beard & Scott es el que produce ADN de mejor calidad en cuanto a pureza. Se puede observar que los tres métodos no producen ADN de la mejor calidad posible, lo que indica impurezas por la presencia de ARN, no se observan valores bajos de pureza, lo cual indica que no existe contaminación con proteínas. La concentración de ADN varió mucho para cada uno de los métodos, aunque el método con menor variación es el de Beard & Scott modificado. Según el Cuadro 1, los mejores métodos de extracción son los de Beard & Scott y el de Hung y colaboradores con adición de proteinasa K; sin embargo hay que recordar que estos métodos presentaron algunas modificaciones de las recetas originales (Ver Anexos A, B, C y D).

**2. Integridad.** Adicionalmente a la pureza y concentración, la evaluación de la integridad del ADN extraído fue un aspecto que ayudó a la decisión de un método o métodos adecuados para la estandarización del método final. La presencia de dos o más bandas en cada muestra podría indicar fragmentación del ADN total o que una banda corresponde al ADN de psílido y la otra a ADN de la bacteria. Aunque dicho patrón se observa en las muestras extraídas usando cualquiera de los dos métodos comparados, el patrón es más estable para las muestras tratadas bajo el protocolo de Beard & Scott.

Guiándose por estos aspectos y los datos de cuantificación y pureza, el mejor método de extracción puede ser el de Beard & Scott, siempre tomando en cuenta las modificaciones finales. Bajo el punto de vista de los costos de extracción, el uso de proteinasa K eleva los costos significativamente, puesto que se trata de una enzima y la cantidad a agregar de la misma por muestra puede ser incluso mayor que la reportada en el protocolo estandarizado de Hung *et al.* 2004 (Anexo D).

## **B. Optimización de la reacción de amplificación**

**1. Optimización de la mezcla de amplificación.** De todos los reactivos utilizados para la mezcla de amplificación, se realizaron pruebas de variación de concentraciones generalmente de manera independiente. Aunque en los resultados no se observan geles de electroforesis para comparar concentraciones variadas de cebadores, enzima y cloruro de Magnesio, estos fueron útiles para llegar a la receta optimizada (Cuadro 2). En cuanto a la comparación de diferentes concentraciones de dNTPs, el frente de corrida observado en el gel puede que esté más relacionado a la calidad de extracción de ADN, sin embargo se observa un menor frente de corrida a la concentración de 0.125 mM. No se tiene claro por qué utilizando la misma muestra en diferentes gradientes no se logró obtener un producto amplificado (columna 5 y 8 de la Figura 12). El protocolo descrito se consideró el más apropiado en cuanto a la reducción de la concentración de reactivos, por ende el volumen, y a la menor cantidad de frente de corrida posible obteniendo un producto adecuado para visualizar mediante electroforesis (Ver Figura 15).

Aunque el ADN a agregar por reacción es de la extracción pura, de igual forma puede trabajarse con dicha muestra en dilución con agua ultrapura (1:2); este aspecto puede variar puesto que la concentración de la bacteria en cada insecto es variable, y no puede estimarse mediante cuantificación ya que la cuantificación considera ADN total extraído. Debido a la variación en cuanto a cantidad de ADN objetivo por cada muestra, también podría trabajarse en mayores diluciones, por ejemplo 1:5 y 1:10. La mayoría de alícuotas utilizadas como controles positivos en las reacciones provienen de extracciones de tejido vegetal con presencia de la bacteria. Esto debido a que el ADN extraído de psílido es más susceptible a degradación, a pesar de mantenerlo almacenado a temperaturas de hasta  $-20^{\circ}\text{C}$ , dichas alícuotas eran inservibles luego de 4 semanas.

**2. Optimización de la temperatura de hibridación.** Según fuentes como (Borah 2011) y (Erlandson y Theilmann 2009), la  $T_m$  debe variar entre  $52-58^{\circ}\text{C}$  o entre  $54$  y  $62^{\circ}\text{C}$ , por lo cual aunque se hayan obtenido bandas estables de producto amplificado a  $51.3^{\circ}\text{C}$ , dicha  $T_m$  queda descartada. En el caso de las amplificaciones a  $53^{\circ}\text{C}$  y  $56^{\circ}\text{C}$ , la

desigualdad y curvatura de las bandas probablemente se deba a baja estabilidad para los cebadores a esta temperatura. Es así como mediante el experimento de gradiente de  $T_m$ , revisión literaria y por sugerencia de expertos de Taiwan para la detección de HLB mediante PCR de punto final, se estableció que la  $T_m$  a utilizar sería de  $60^\circ\text{C}$ . Los cambios realizados en el programa de amplificación fueron pocos, esto se realizó puesto que en realidad no se pretendía variar tanto las condiciones de corrida y así no afectar en cuanto a los productos obtenidos. Una posible desventaja de este programa es la duración (2 horas, 45 minutos aproximadamente), por lo que la obtención de resultados lleva más tiempo de lo esperado.

**3. Comparación entre cebadores.** Una de las razones por la cuales no se logró detectar tantos casos de HLB mediante los cebadores de Texeira y colaboradores puede ser a que no se realizó la optimización de dicho protocolo, la aplicación para ADN extraído de tejido animal puede diferir. Otra razón para la poca detección, es que el ADN obtenido de las extracciones se encuentra fragmentado (Ver Figuras 8 a 11). Los cebadores de Texeira y colaboradores amplifican un fragmento de 1160 pares de bases y puesto que en las muestras de ADN se observa fragmentación, es poco probable obtener un producto de tan alto tamaño, contrario a los cebadores HLB 1999 que amplifican un fragmento de 226 pares de bases. Hace falta evaluar si existe alguna razón adicional por la cual la especificidad de los cebadores OIc-OI2c podría ser baja para el ADN de insecto (Ver Anexo: Inciso K).

### **C. Optimización de condiciones de electroforesis y visualización**

El porcentaje de agarosa al cual se llegó se debió a que el producto obtenido de los cebadores HLB 1999 es de tamaño pequeño (226 pb), comparado con geles al 1%, los cuales se utilizan para el producto de los cebadores OIc-Oi2c. El volumen de producto a cargar en el gel se debió a la capacidad que tiene cada pozo y contemplando entre 15 y 16  $\mu\text{l}$  restantes que podrían tomarse en caso de purificación y envío a secuenciación. La temperatura del buffer de corrida se dio por ciertas razones; a un voltaje alto y menor

tiempo de corrida, los productos tienden a revelarse más rápido pero las bandas tienden a verse más curvadas. El alto voltaje tiende a subir la temperatura del buffer de corrida y el gel, por lo cual la corrida no es constante y se altera el equilibrio que debería dar el buffer. Este aspecto fue importante para que las bandas de productos se visualizaran de mejor manera (Ver: Figura 14 y 15), aunque podría recomendarse utilizar otro buffer como el TBE (Tris-Borato-EDTA) el cual puede dar mayor capacidad amortiguadora a temperatura ambiente.

#### **D. Confirmación de identidad de productos amplificados mediante secuenciación**

A pesar de haber confirmado la identidad de la secuencia para 4 muestras, hizo falta tener datos más representativos, es decir mayor número de muestras purificadas. La poca especificidad al llegar a una secuencia consenso en las otras muestras enviadas a secuenciación puede indicar alta contaminación con ADN del vector, por lo cual a pesar de haber realizado un paso previo de purificación, no fue suficiente para eliminar todas las impurezas.

#### **E. Casos detectados de HLB en Guatemala**

Hay que mencionar que existe pseudoreplicación en cuanto al análisis presentado en esta sección, puesto que no se contó con el mismo número de individuos en todos los departamentos y el esfuerzo de muestreo no fue el mismo en todos los casos. Es por esto que los casos positivos fueron transformados a porcentaje, obteniendo un método mejor de comparación. La mayoría de psílicos provienen de colectas realizadas por otros investigadores, de las cuales se contaba con un número variado de individuos por cada frasco, considerándose cada frasco con psílicos como una muestra.

Existen varias razones que pueden explicar por qué no hubo presencia de la bacteria *C. Liberibacter asiaticus* en los departamentos de San Marcos y Suchitepéquez (Figura

16). El número de insectos analizados para estos departamentos fue bajo y en el caso de las muestras provenientes de Suchitepéquez, no se sabe si provienen de una misma plantación. Otra explicación es que estos insectos provengan de cítricos que no muestran los síntomas aparentes de HLB, por lo el PCR en el psílido sólo corroboró la ausencia de la enfermedad. La bacteria puede que se encuentre en concentraciones muy bajas en cada insecto, por lo cual no pudo ser detectada; o la mejor explicación es que corresponden a zonas libres de HLB. A finales del 2014 se reportaron los primeros casos de HLB en el caso de Santa Rosa, por lo cual los resultados presentados en esta investigación conforman evidencia sólida de la expansión de dicha enfermedad a este departamento y a Escuintla. En el caso de San Marcos, se trata del departamento más alejado de todos los analizados, y puede que la enfermedad no haya llegado a ese lugar.

## **F. Discusión final**

A pesar de que las condiciones desde la extracción de ADN hasta la corrida en electroforesis fueron las mismas en todas las muestras, algunos productos no son de la misma intensidad, en ocasiones difíciles de ver en un gel de agarosa (Ver Anexos: Figura 19). Esto puede deberse a que la cantidad de bacteria en el vector es muy variable, a su vez esto depende del estadio en el que el vector la adquirió, la edad del mismo, el tiempo en que la enfermedad lleva presente en la zona y la gravidez de la misma en dicha zona.

Es lógico que al contar con poco ADN de la bacteria, no se logre amplificar lo suficiente; y también hay que considerar que aún hay que lidiar con la presencia de impurezas como ARN en cada muestra extraída. Se estableció que el volumen de ADN a cargar en cada reacción es de 1  $\mu$ l, puesto que mediante el protocolo de extracción de Beard & Scott modificado se obtiene una concentración de ADN aproximada entre 50 y 150 ng/ $\mu$ l. Se sugiere realizar dilución de la muestra en proporción 1:2 en agua ultrapura como segunda opción, esto diluye más la cantidad de ADN y a su vez el ARN y otras impurezas que puedan quedar y así facilitar el copiado de dicho ADN templado. Se podría considerar el uso de kits para purificar ADN o el uso de ARNasas para obtener una mejor muestra, pero el uso de estas opciones aumentaría el costo del análisis.

Finalmente hay que considerar el número de muestras a analizar de manera rutinaria; puesto que se trata de detección de HLB en una zona específica, a manera de agilizar el análisis y bajar el gasto de reactivos se puede considerar correr los insectos en grupos de 5. Si se desea corroborar la identidad del producto amplificado, es recomendable hacer todo el proceso en individuos separados; de esta forma contar con producto para mandar a secuenciar, y ADN de cada insecto en caso se haga un estudio poblacional asociado a marcadores moleculares.

Observando el número de individuos de *Diaphorina citri* a los cuales se les detectó presencia de la bacteria *C. Liberibacter asiaticus*, es importante implementar las medidas adecuadas para evitar la dispersión de la enfermedad. Actualmente las soluciones propuestas se enfocan en el control de poblaciones de psílidos de los cítricos, dichas soluciones se enfocan en el manejo integrado de plagas. En Guatemala ya se implementó la primera parcela para manejo adecuado de cítricos en la región de El Júcaro, El Progreso (Contreras 2014), lo cual servirá para apoyar la investigación de la plaga y promover cultivos libres de HLB. Sin embargo hay que considerar que si este tipo de parcelas se lleva a más grande escala, puede haber un incremento en el precio de cítricos a nivel nacional, debido a las técnicas de control biológico utilizadas para obtener frutos de mejor calidad. Desafortunadamente el uso de agroquímicos no es totalmente efectivo y aún hace falta evaluar el uso de hongos y artrópodos predadores (Bové 2006, Hall *et al.* 2012) para establecer si es un método que controle a la enfermedad en Guatemala o en la región de Centroamérica.

## V. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR de punto final permite detectar a la bacteria causante de la enfermedad Huanglongbing en cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en el vector *Diaphorina citri*
2. Se optimizó el protocolo de Beard & Scott y el de Hung y colaboradores para la extracción de ADN de psílido, siendo el de Beard & Scott el más recomendado por la calidad e integridad de ADN que se obtiene mediante dicho método y la amplificación de ADN de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.
3. Los cebadores HLB 1999 son más sensibles que los cebadores OIc-OI2c en cuanto a la detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri*, puesto que se detectaron más casos con ese par de cebadores ( $p= 0.0068 \times 10^{-6} < 0.05$ ).
4. Se optimizó la receta para la mezcla de reacción y el programa de amplificación para los cebadores HLB 1999, a manera de obtener un producto que puede secuenciarse.
5. Se optimizaron las condiciones de electroforesis para la visualización de los productos amplificados de HLB, lo que incluye el porcentaje de agarosa, tiempo y voltaje de la corrida y temperatura del buffer de corrida.
6. Se detectaron en total 82 casos positivos de HLB para 8 departamentos analizados, correspondiendo al mayor porcentaje de casos positivos en Santa Rosa (54.17%), Escuintla (46.67%), Alta Verapaz (45.61%) y Jutiapa (45%).

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con el análisis de muestras de *Diaphorina citri* provenientes de los departamentos estudiados y de los que no fueron incluidos en este trabajo, de esta forma contar con un panorama mayor sobre la situación del HLB en Guatemala.
2. Se recomienda en futuros análisis en caso se cuenten con muestras con varios insectos, intentar la corrida de las muestras en grupos de 5 individuos para evaluar la efectividad en cuanto a amplificación de ADN objetivo y la pureza y concentración de ADN, de esta forma se podría optimizar la cantidad de materiales y reactivos a utilizar.
3. Evaluar la implementación de un kit de purificación o tratamiento con ARNasas para las muestras extraídas, de esta forma eliminar el ruido o frente de corrida observable luego de cada muestra analizada mediante PCR.
4. Se recomienda probar el procedimiento optimizado en este trabajo para individuos de *Diaphorina citri* en estadio larval, puesto que sólo se utilizaron los adultos.
5. Realizar alícuotas de todos los reactivos utilizados para la mezcla de amplificación, incluyendo el buffer y el MgCl<sub>2</sub>, de esta forma evitar contaminación de grandes volúmenes en condiciones de trabajo de las cuales se tiene poco control.

## VII. LITERATURA CITADA

- Anacafé. 2004. **Cultivo de limón persa**. Programa de Diversificación de Ingresos de la Empresa Cafetalera. Guatemala. 21 pp.
- Anacafé. 2004. **Cultivo de mandarina**. Programa de Diversificación de Ingresos de la Empresa Cafetalera. Guatemala. 11 pp.
- Bassanezi, R.B. and R.C. Bassanezi. 2008. **An approach to model the impact of Huanglongbing on citrus yield**. Proceedings from the International Research Conference on Huanglongbing. Pp 301-304.
- Beard, S.S. and I.W. Scott. 2013. **A rapid method for the detection and quantification of the vector-borne bacterium “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in the tomato potato psyllid, *Bactericera cockerelli***. Entomologia Experimentalis et Applicata 147:196-200.
- Borah, P. 2011. **Primer designing for PCR**. Science Vision 11(3): 134-136.
- Bové, J.M. 2006. **Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus**. Journal of Plant Pathology 88 (1):7-37.
- Brlansky, R.H. and M.E. Rogers. 2007. **Citrus Huanglongbing: Understanding the Vector-Pathogen Interaction for Disease Management**. APSnet Features. Acceso el 09/07/2014: <https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Huanglongbing.aspx>
- Contreras, H. 2014. **Autoridades impulsan combate a plaga de cítricos en El Jícaro**. Prensa Libre. Acceso el 24/07/2015: <http://www.prensalibre.com/el-progreso/El-Jicaró-El-Progreso-plaga-combaten-citricos-0-1259274271>

- Da Graça, J.V. 2008. **Biology, history and world status of Huanglongbing**. Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Sonora, México. 7 pp.
- Davies, F.S. and L. Albrigo. 1994. **Citrus**. CAB International, Wallingford UK. 283 pp.
- Deng, X-ling; Y. Gao; J. Chen; X. Pu; W. Kong and H. Li. 2012. **Current situation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Guangdong, China, where citrus huanglongbing was first described**. Journal of Integrative Agriculture 11(3):424-429.
- Duan, Y.; L. Zhou; D. Hall; W. Li; H. Doddapaneni; H. Lin; L. Liu; C. Vahling; D. Gabriel; K. Williams; A. Dickerman; Y. Sun and T. Gottwald. 2009. **Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, obtained through metagenomics**. Molecular Plant-Microbe Interactions 22(8):1011-1020.
- El Economista (Redacción). 2013. **Guatemala: tratan de establecer cerco a enfermedad de cítricos**. Diario El Economista. Acceso el 25/05/2014: <http://www.eleconomista.net/actualidad/146451-guatemala-tratan-de-establecer-cerco-a-enfermedad-de-citricos-html>
- El Periódico (Redacción). 2012. **Amenaza plantaciones de limón**. Economía, Diario El Periódico. Acceso el 24/05/2014 en <http://www.elperiodico.com.gt/es/20120409/economia/210498/?action=zjfihtvbg>
- Erlandson, M.A. and D.A. Theilmann. 2009. **PCR and virus-specific primer development**. In: Insect Pathogens, Molecular Approaches and Techniques. By. Stock, S.; J. Vandenberg; I. Glazer and N. Boemare. CAB International, United Kingdom.

- Galvao, S.E; A.C. de Oliveira and R.B. Bassanezi. 2012. **Economic impacts of Huanglongbing disease in Sao Paulo State**. Bajo revisión: IAAE, Iguacu, Brasil, Agosto del 2012.
- García, C.S. 2009. ***Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB-Greening)**. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) – Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Buenos Aires, Argentina. 18 pp.
- García-Pérez, F. ; L. Ortega-Arenas ; J. López-Arroyo; A. González-Hernández; J. Lomeli-Flores and J. Romero-Nápoles. 2013. **Morphometry of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on six Rutaceae from Veracruz, México**. Florida Entomologist 96(2): 529-537.
- Garnier, M.; S. Jagoueix-Eveillard, P.R. Cronje, G. Le Roux and J.M. Bové. 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.
- Grafton-Cardwell, E.; K. Godfrey; M. Rogers; C. Childers and P. Stansly. 2006. **Asian citrus psyllid**. Publication 8205. University of California. 8 pp.
- Halbert, S.E. and K.L. Manjunath. 2004. **Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida**. Florida Entomologist 87(3):330-353.
- Hall, D.G.; M. Richardson; E. Ammar and S. Halbert. 2012. **Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease**. Entomologia Experimentalis et Applicata 146: 207-223.

- Hung, T.H.; M.L. Wu and H.J. Su. 1999. **Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction.** Journal of Phytopathology 147:599-604.
- 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.
- Li, W.; J. Hartung and L. Levy. 2007. **Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing.** Plant Disease 91:51-58.
- López, A.R. 2011. **Determinación de la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* como posible agente causal de la enfermedad llamada “papa rayada” en cultivos de papa, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Tesis de Licenciatura en Biología, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 60 pp.
- MAGA. 2013. **El agro en cifras 2013.** Dirección de Planeamiento del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala. 63 pp.
- MAGA. 2014. **Comportamiento de precios: Principales productos agropecuarios (Marzo 2014).** Dirección de Planeamiento del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala. 37 pp.
- Mead, F & T.R. Fasulo. 2014. **Asian citrus psyllid.** FDACS/DPI Entomology Circular No. 180. University of Florida. <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/citrus/acpsyllid.htm>
- Parker, T. 2008. **Trees of Guatemala.** The Tree Press, Texas. 1033 pp.

- Prensa Libre (Redacción). 2010. **Confirman virus de HLB en Guatemala**. Periódico Prensa Libre. Acceso el 25/05/2014: [http://www.prensalibre.com/economia/Confirman-virus-HLB-Guatemala\\_0\\_240575984.html](http://www.prensalibre.com/economia/Confirman-virus-HLB-Guatemala_0_240575984.html)
- Prensa Libre (Redacción). 2013. **Clima impactará al agro en el 2014**. Periódico Prensa Libre. Acceso el 25/05/2014: [http://www.prensalibre.com/economia/Clima-impactara-agro\\_0\\_1007299264.html](http://www.prensalibre.com/economia/Clima-impactara-agro_0_1007299264.html)
- Prensa Libre (Redacción). 2014. **Plagas siguen dañando al agro guatemalteco**. Periódico Prensa Libre. Acceso el 24/05/2014: [http://www.prensalibre.com/economia/Plagas-siguen-danando-agro\\_0\\_1082291770.html](http://www.prensalibre.com/economia/Plagas-siguen-danando-agro_0_1082291770.html)
- Roistacher, C.N. 1991. **Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome. 286 pp.
- Standley, P.C. and J.A. Steyermark. 1946. **Flora of Guatemala**. Vol. 24, pt.5. Chicago Natural History Museum, Illinois. 502 pp.
- Swingle, W.T. and P.C. Reece. 1967. **The botany of citrus and its wild relatives**. In: Reuther, W.; L.D. Batchelor and H.J. Webber. The Citrus Industry. Vol 1. University of California Press, California 611 pp.
- Tapia, G. 2010. **Situación actual, regulación y estrategias para el control del Huanglongbing (HLB) en la región del OIRSA**. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). 5 pp.
- Teixeira, D.C.; J. Danet, S. Eveillard ; E. Martins *et al.* 2005. **Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil : PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease**. Molecular and Cellular Probes 19:173-179.

- Timmer, L.W.; S.M. Garnsey and J.H. Graham. 2002. **Compendium of Citrus diseases**. Second edition. The American Phytopathological Society, Saint Paul USA 95 pp.
- Villagrán, G. 2014. **Cítricos están en alerta fitosanitaria**. Diario de Centroamérica [Guatemala]. 13/10/2014.
- Zhou, L.; C. Powell; M. Hoffman; W. Li; G. Fan; B. Liu; H. Lin and Y. Duan. 2011. **Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats**. Applied and Environmental Microbiology 77(18):6663-6673.

## VIII. ANEXOS

### A. Protocolo de extracción de ADN original según estudio de Beard & Scott (2013)

Colocar psílido en tubo de 1.7 ml y macerar con un pistilo; agregar 100 µl de buffer CTAB 2X (2% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl) e incubar por 2 horas a 65°C. Agregar 100 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), agitar muestra por 2 a 5 minutos y centrifugar por 15 minutos a 6,000 g. Remover sobrenadante (80 µl) y colocar en tubo nuevo de 1.7 ml con 80 µl de isopropanol, mezclar por inversión e incubar a -20°C por 2 horas. Centrifugar por 15 minutos a 16,000 g, descartar sobrenadante y lavar precipitado con etanol 70%, dejar secar el precipitado a temperatura ambiente y resuspender en 50 µl de buffer EB (10mM Tris-HCl pH 8.5).

### B. Protocolo de extracción de ADN original según estudio de Hung *et al.* (2004)

Secar psílido a temperatura ambiente por 10 minutos, luego macerar en tubos de 1.5 ml con 300 µl de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% N-lauroylsarcosinel) e incubar a 55°C por 1 hora. Agregar 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar por vortex y centrifugar a 4°C por 10 minutos a 12,000 g. Transferir sobrenadante (200 µl) a tubo nuevo de 1.5 ml con 500 µl de etanol 100%, mezclar por inversión y centrifugar a 4°C por 10 minutos a 14,000 g. Lavar precipitado en etanol 70% y luego resuspender en 15 µl de agua y almacenar a -20°C.

### **C. Protocolo de extracción de ADN final basado en el estudio de Beard & Scott (2013)**

1. Sacar psílido de frasco con etanol y colocar en servilleta de papel para dejar secar por aproximadamente 10 minutos.
2. Colocar psílido en tubo de 1.5 ml.
3. Agregar 100  $\mu$ l de buffer CTAB 2X (2% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1.4 mM NaCl).
4. Macerar con pistilo estéril.
5. Incubar a 65°C por 1 hora.
6. Agregar 100  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), agitar fuerte o en vortex.
7. Centrifugar por 15 minutos a 7,000 rpm.
8. Remover sobrenadante (75  $\mu$ l) y agregarlo a tubo nuevo de 1.5 ml.
9. Agregar 1 volumen de isopropanol, mezclar por inversión.
10. Incubar a -20°C por 1 hora u “overnight”.
11. Centrifugar por 20 minutos a 12,000 rpm.
12. Descartar sobrenadante y agregar 100  $\mu$ l de etanol 70%.
13. Centrifugar por 5 minutos a 10,000 rpm.
14. Descartar sobrenadante y dejar secar pellet a temperatura ambiente.
15. Resuspender pellet en 25  $\mu$ l de buffer TE

Almacenar ADN extraído a 4°C si se va a trabajar en al menos uno de los siguientes 6 días después de su extracción, de lo contrario almacenar a -20°C.

#### **D. Protocolo de extracción de ADN final basado en Hung *et al.* 2004, con añadido de proteinasa K**

1. Sacar psílido de frasco con etanol y colocar en servilleta de papel para dejar secar por aproximadamente 10 minutos.
2. Colocar psílido en tubo de 1.5 ml.
3. Agregar 500  $\mu$ l de buffer de extracción (Tris-Base 0.1M; EDTA 0.1M; NaCl 0.25M, pH 8.0) o agua destilada para lavar mediante agitación, descartar líquido.
4. Agregar 270  $\mu$ l de buffer de extracción (Tris-Base 0.1M; EDTA 0.1M; NaCl 0.25M, pH 8.0)
5. Macerar psílido con pistilo estéril.
6. Agregar 30  $\mu$ l de sarkosyl 10%.
7. Agregar 3  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml), mezclar bien con la pipeta.
8. Incubar a 55°C por 1 hora.
9. Agregar 200  $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar fuerte.
10. Centrifugar por 10 minutos a 12,000 rpm.
11. Trasladar sobrenadante (200  $\mu$ l) a tubo nuevo y agregar 500  $\mu$ l de etanol 95%. Mezclar por inversión.
12. Centrifugar por 15 minutos a 12,000 rpm.
13. Descartar líquido y dejar secar pellet a temperatura ambiente.
14. Resuspender pellet en 30  $\mu$ l de buffer TE.

Almacenar ADN extraído a 4°C si se va a trabajar en al menos los siguientes 6 días después de su extracción. Almacenar a -20°C si se trabajará 1 semana después de su extracción, tiempo de vida a esta temperatura es de aproximadamente 1 mes.

## **E. Protocolo para purificación de productos de PCR**

1. Calentar volumen de buffer C a 70°C (50 µl por cada muestra en triplicado).
2. Transferir triplicado de productos de PCR (15 µl/cada uno) a un tubo de 1.5 ml.
3. Agregar 200 µl de buffer A, mezclar por vortex.
4. Colocar columna con filtro a tubo colector de 2 ml.
5. Transferir mezcla de productos a la columna con filtro y centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm.
6. Remover columna y descartar líquido del tubo colector.
7. Colocar columna nuevamente en tubo colector y agregar 200 µl de buffer A.
8. Centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm, descartar líquido de tubo colector.
9. Colocar columna nuevamente sobre tubo colector, agregar 150 µl de buffer B dentro de la columna.
10. Centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm, descartar líquido de tubo colector.
11. Colocar nuevamente columna a tubo colector y centrifugar por 2 minutos a 10,000 rpm.
12. Transferir columna a tubo receptor de 1.5 ml.
13. Agregar 50 µl de buffer C precalentado a la columna, directamente sobre el filtro.
14. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm para recibir ADN purificado.

Del volumen total purificado, se guardan 20 µl a 4°C para enviar a secuenciar; el volumen restante se guarda a -20°C.

## **F. Preparación de solución stock de buffer TAE (1 Litro, 50X)**

1. Pesar 242 g de Tris-Base
2. Disolver Tris-Base en aproximadamente 750 ml de agua destilada
3. Pesar 18.6 g EDTA y agregar (O agregar 100 ml de EDTA 0.5M), disolver
4. Agregar 57.1 ml de ácido acético glacial
5. Ajustar volumen a 1 Litro en caso se necesite con agua destilada
6. Ajustar pH entre 8.0 y 8.5, esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

## **G. Preparación de buffer TE (1 Litro, 10X)**

1. Medir 100 ml de Tris-HCl
2. Agregar 20 ml de EDTA 0.5M
3. Agregar 880 ml de agua destilada o el volumen necesario para llenar 1 litro
4. Medir y ajustar pH a 8.0. Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

## **H. Preparación de buffer de extracción (400 ml)**

1. Pesar 4.840 g de Tris-Base (0.1 M)
2. Pesar 14.898 g de EDTA (0.1 M)
3. Pesar 5.840 g de NaCl (0.25 M)
4. Agregar 400 ml de agua destilada, mezclar
5. Ajustar pH a 8.0. Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente

**I. Preparación de buffer de extracción CTAB 2X (100 ml)**

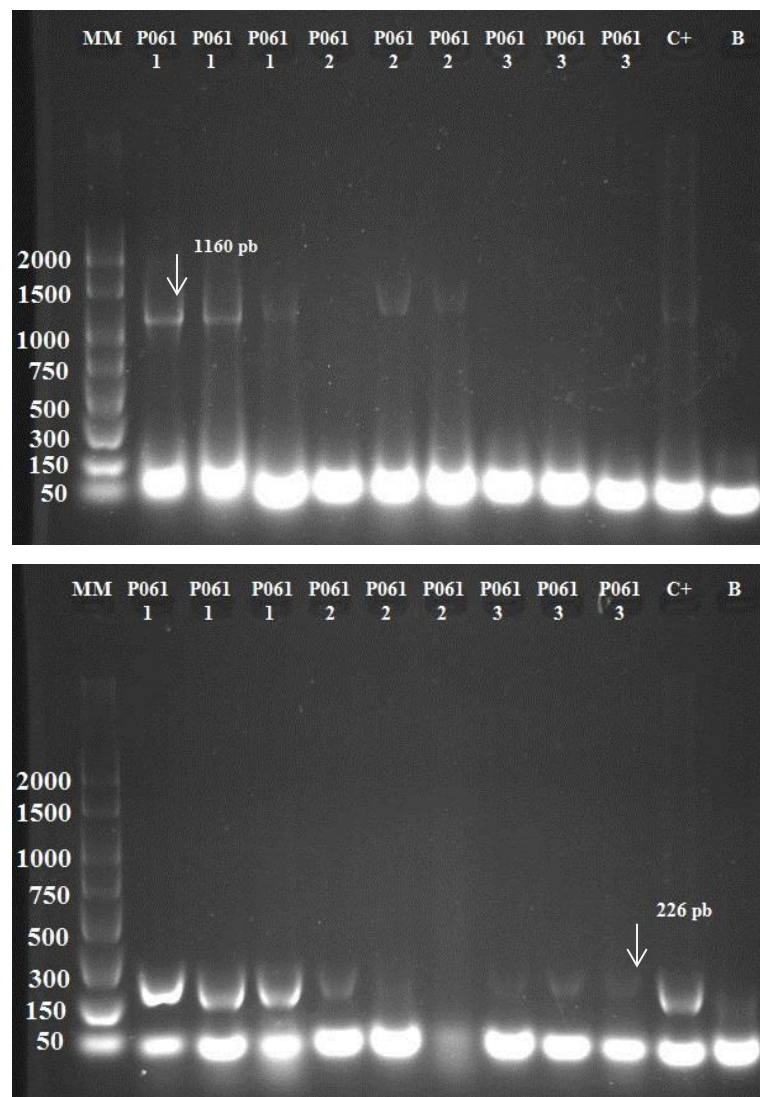
1. Medir 5 ml de Tris-HCl 1M (pH 8.0)
2. Agregar 2 ml de EDTA 0.5M (pH 8.0)
3. Agregar 28 ml de NaCl 5M
4. Pesar y agregar 2 g de CTAB en polvo o agregar 2 ml de CTAB en solución
5. Ajustar volumen a 100 ml con agua destilada
6. Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente

**J. Preparación de sarkosyl al 10% (70 ml)**

1. Pesar 7 g de Sarkosyl (N-lauroilsarcosina)
2. Mezclar en 70 ml de agua destilada
3. Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente

## K. Geles de comparación de producto amplificado mediante los cebadores HLB 1999 y los cebadores OIc-OI2c

**Figura 17:** Comparación entre productos amplificados mediante dos pares de cebadores separados



Producto de cebadores OIc-OI2c (arriba) y producto de cebadores HLB 1999 (abajo)

Cabe señalar de la Figura 17, que las condiciones de corrida de electroforesis utilizadas en estos casos no fueron a las cuales se llegó mediante la optimización. Se utilizó la misma muestra en triplicados para determinar a su vez el efecto de cargar la muestra en dilución (1:2), muestra pura (1 µl) y el doble de muestra (2 µl); dicha modalidad de carga se realizó en este mismo orden de izquierda a derecha en los geles observados.

## **L. Secuencias consenso obtenidas mediante Sequencher 5.1**

### Control positivo:

5'-ACCGAAGATATGGACAACATAATTATTACAACAACAATAACCGAAACCAAACCTCACTC  
CGAGACGGCCAGAATATCTTCTTAGACTCATCCCTAACTTGCTTAAAAAAATTTAACACAGCC  
AACCTATTAACCTCCCATCAAAGGAGAACTCTCCAATCTTAGAACACGCCTTGATGTATAAAG  
CAAGAAAAAACACCAAAGAATCAGAAAAACCACAAGAACC-3'

### Control positivo:

5'-ACCGAAGATATGGACAACATAATTATTACAACAACAATAACCGAAACCAAACCTCACTCCGA  
GACGGCCAGAATATCTTCTTAGACTCATCCCTAACTTGCTTAAAAAAATTTAACACAGCCAAC  
CTATTAACCTCCCATCAAAGGAGAACTCTCCAATCTTAGAACACGCCTTGATGTATAAAGCAA  
GAAAAAACACCAAAGAATCAGAAAAACCACAAGAACCCTCAA-3'

### Muestra P074-2 (Escuintla):

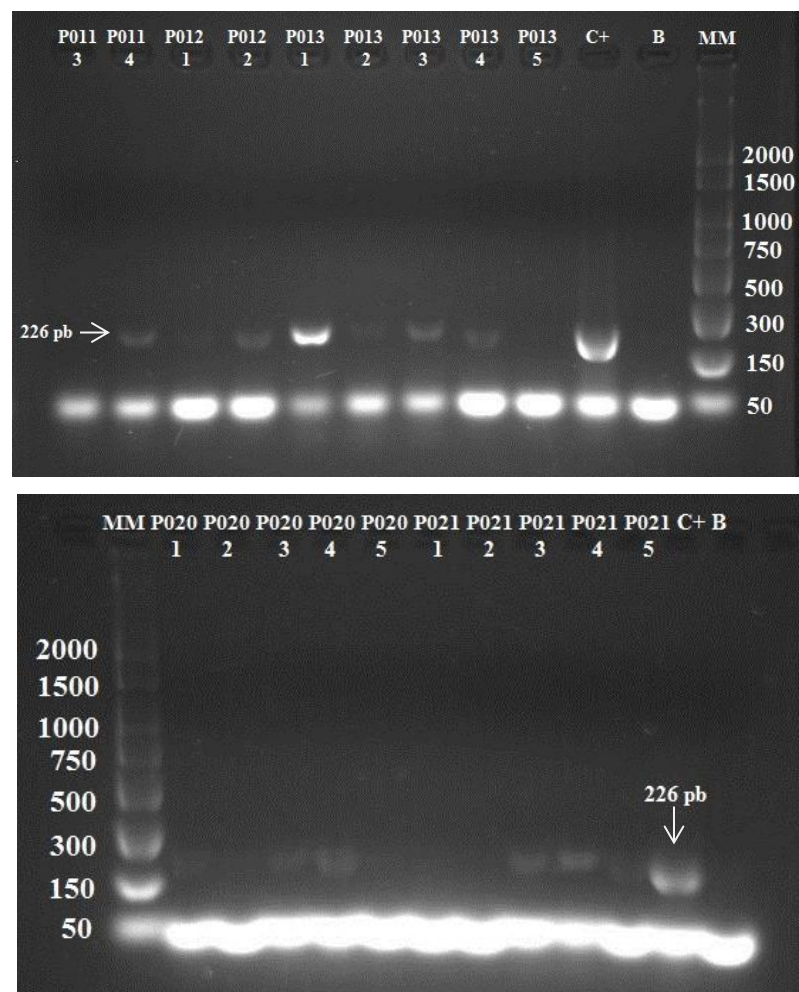
5'-GGAGAGTTTCTCCTTTGATGGGAGTTAATAGGTTGGCTGTGTTAAATTTTTTTAAGCAAGTT  
AGGGATGAGTCTAAGAAGATATTCTGGCCGTCTCGGAGTGAGGTTTTGGTTTCGGTTATTGTT  
GTAATAATTATGTTGTCCATATCTTCGGTGA-3'

### Muestra P018-9 (Izabal):

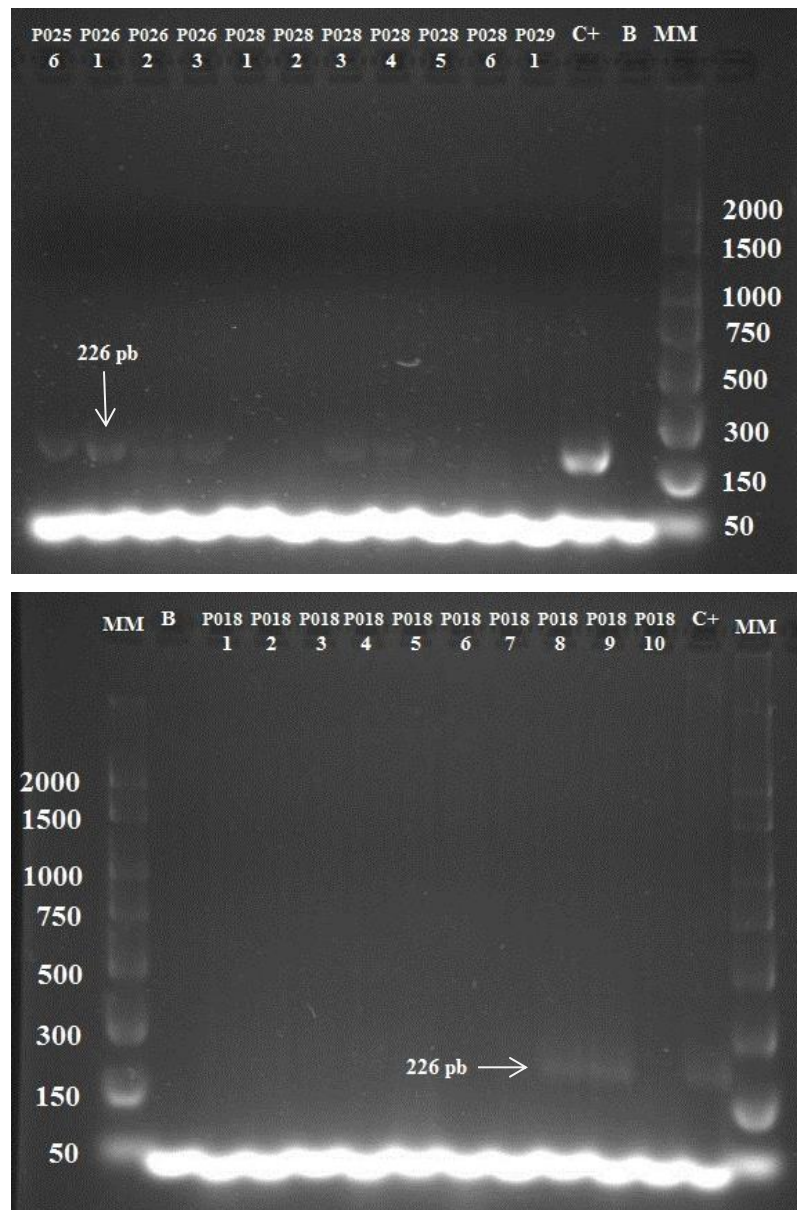
5'-GCACCGAAGATATGGACAACATAATTATTACAACAACAATAACGGAAGCCAAAACGTCACTCC  
GAGACGGCCAGAATATCTTCNTAGACTCATCCCTAACTTGCNTAAAAAAATTTAACACAGCC  
AACNTATNAANTCCCATCAAAGGAGAACTCTCCAATCTTAGAACACGCCTTGATGTATAAA  
GCAAGAAAAAACACCAAAGAATCAGAAAAACCACAAGAACCCTCAACTCA-3'

## M. Geles representativos de casos positivos en los departamentos estudiados

**Figura 18:** Geles de casos positivos de HLB en *Diaphorina citri* provenientes de Alta Verapaz (arriba) y Jutiapa (abajo)



**Figura 19:** Geles de casos positivos de HLB para *Diaphorina citri* provenientes de Santa Rosa (arriba) e Izabal (abajo)



## N. Sitio de unión de cebadores HLB 1999 (Fragmento parcial)

>gi|346722692|ref|NC\_012985.3| Candidatus Liberibacter asiaticus str. psy62 chromosome, complete genome (De 30150-32700 pb)

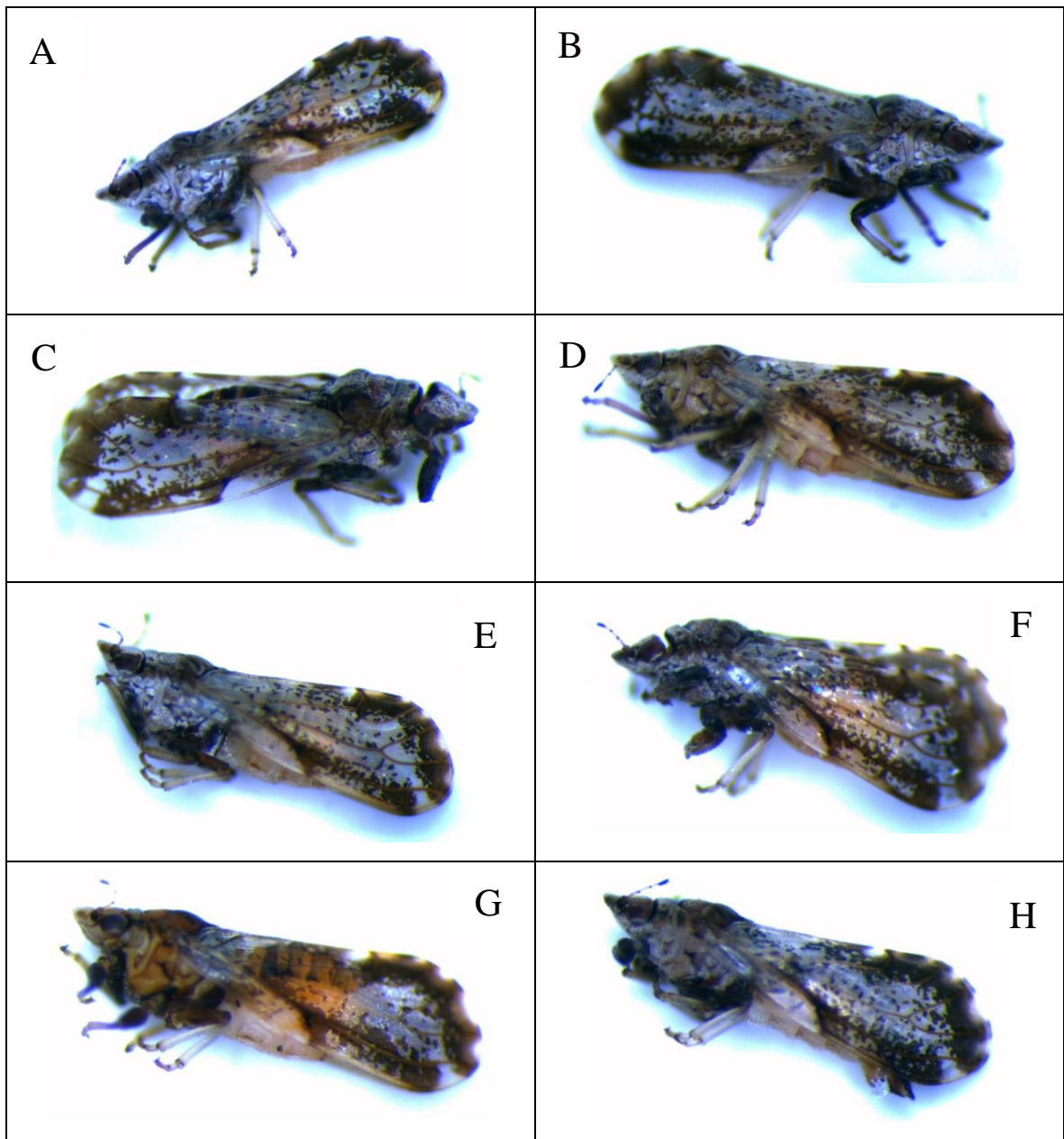
TGTTTCATCAAACCTAGCCGTAGCACGCTCTTTAAGCATAACCACAGCATCACTTAACCCATATAACGCTGA  
 ACGATCAATCCCCTGAGAAATCTGCTGCATACGTTTTCGAAATTTTAGACACCATATTAATCCACCACACTTA  
 TACCCATTGAACAGGCCGAACCTTCCACCATACGCATAGCCCCTTCAATATCAATAGCCCCATATCTTGCA  
 TCTTTAACTGTGCAATTTTTCTAATATTTTCCCGAGTAATCGAACCGCAAGACTCCTTACCAGGAAGTTTAG  
 ATCCCGACTTAATCCCCACCTCTTTTTTAAGAAAAAGCTTACAGGTGGCTGACTCATCGTAAAAGTAAAAG  
 ACTTATCTTTATAACAAGTCACAGTAGTTGGGATGGGAATACCCTTTTCCATACCCTCAGTTGCCGCATTAA  
 ACGCCTTACAAAACGCCATAATGGGAATACCAGCCTGTCCAATTGCAGGACCAACCGGCGGCGAAGGCTTTG  
 CAGAACCCGACTCTATCTGCAACTTAACTATACGAGAACTACTTTAGCCATCCCTAGCCTTTCTAAAAAAC  
 AACCAACCTACTATATAAAACAAACACAAAAGCAATAATAATACGCCACTCATGACCGAAATCAAAATATC  
 ATACGATCTTCTCAACTTGATTGTATGCTAACTCTACTGGTGTGACACGACCAAAAATCACAACCTTCTACAT  
 GAACGCGAGATTTTTCTTCATCGACATTCTTTACAATACCATTAAGAAGCAAACGGACCATCAGAGACAC  
 AAACCCGCTCACCAACCTCGAAGAAAACAGACGATACAGGCCTTTGGACAGCTGCTTCAACTTGATTCATGA  
 TATGCTCAATTTTCGGAATCTGTGACTGGGGATGGATTTTCCCCTGTTCCAAGAAAACCTATAACCTTTGGCG  
 TATCCTTGATAGTGTGATACACCTTATCAGTCATAACTGCCTTAATCAACACATATCTGGGAAAAATCTAC  
 GCTCAGAATTAACCTTACGCCCTTTGCGAACACTGACCACCCTCTCGGAGGGGATGGTGATCTCGGTGACCA  
 AGTGATCTAATCCAGACCTACTCAACCTTCCACCAATTGACTCAACTGCCTTCTTTTACAGTTAGAATAAA  
 CTTGGACTATATACCAGCGAGGCGTCATTTTATCACCATTACCCAACAATTATCTACCAATACCCAAAATAA  
 AATGCATCAGCCATCTATTGACTGATCAATTACCAAAAAAAA **CACCGAAGATATGGACAACATAATTATTA**  
**CAACAATAACCGAAACCAAACCTCACTCCGAGACGGCCAGAATATCTTCTTAGACTCATCCCTAACTTGGCT**  
**TAAAAAAATTTAACACAGCCAACCTATTAACCTCCATCAAAGGAGAAACTCTCCAATCTTAGAACACGCCTT**  
**GATGTATAAAGCAAGAAAAAAACACCAAAGAAT CAGAAAAACCAAGAACCTC**TTTCGTGAAATAATTCTGG  
 CAGGAGCAGAGGGGATCGAACCCACGACCTGCGGTTTTGGAGACCGCCGCTCTACCACTGAGCTATACTCCT  
 TTTCTCAAAACTTATCTATAAACGATATATTTCTTATTAATATGGACAGACGTATTATTCTATAATTTCAA  
 GAATCAAACCAGCCCCTACCGTCTTTCTCCTTACGCATAGAAAAAGTCTGATTTGGCTCCATCGCAATTG  
 GATAAATAAGTTCTACCTCTAAATCCACCCTATCACCAGGCATTACCGCTTGAGATCCAGGACTCAGAATGA  
 TCCTTCCCCTAACATCCGCCGTATCCATAAAGAAGTGTGGGCGATAATTATCCATAAATCCTGTAGTACGAC  
 CACCTTCACTAGCTGTGAGAATATAAACACTCGCCCTAAACCTAGAATACTCTTGAATCGAACCGAGGAC  
 AAACAACCCTACCCCTTGGAACATCCGCACGATTTACTCCACGAAGAAGCAAACCTACATTATCACCCGCTA  
 TCGCTTCGTCTAATTTCTTACGAAACATCTCCACATCTGTACACTTGACCTTAAGCTTCTTACCACCATA  
 CAATTAATTTCAACGTGAGATCCAGCTTTAATCCTACCACGCTTGATACAACCAGTAACAACAGTACCACGCC  
 CTTCAATCCCACAAGAACCCTCTATATGCATTAATAAAGGAGCATCCAAGAACGCTGAGGAGTAGGAATAT  
 GAGTATCAACAGCCTTCATCAAAGCATGAATAGAATCCTCACCCAATTCCTTATTAGTACCCTGCAATGCAC  
 AAAGAGCAGAACCACGAATAATAGGCGTATCATCAGAATATTTATGTTCCCTTTAAAAGGTCACGAATCTCAT  
 ATTCAGAAATATCCAATAATTCATCGTCATCAACAGCGTCAACCTTATTCATATAAAACACTATCGACGAAA  
 TACCTATTTGACGCGCTAAAAGAATATGTTCCCTCGTCTGCGGCTTAGGACCATCCTCTGCAGCACAAACA  
 GTATAGCACCATCAGCCTGCGTCGCACCCAG

- Sitio de unión cebador Forward
- Sitio de unión cebador Reverse
- Producto amplificado (incluye sitio de unión de ambos cebadores)

### O. Imágenes de *Diaphorina citri*

**Figura 20:** Fotografías en estereoscopio de *Diaphorina citri* provenientes de algunos departamentos de Guatemala

(A y B= Alta Verapaz, C y D= Izabal, E y F= San Marcos, G y H= Zacapa)



(Imágenes por Luis Arévalo y Erick Mollinedo, septiembre 2014)