**Argumentario técnico sobre "Candidatus Liberibacter Solanacearum"**

# Introducción: "Candidatus Liberibacter Solanacearum" ("CLso")

1. "Candidatus Liberibacter solanacearum" ("CLso" o "Lso") es una bacteria Gram-negativa, que pertenece a la clase Alphaproteobacteria, que a día de hoy no puede cultivarse "in vitro". Esta se describe como un agente fitopatógeno limitado al floema que puede provocar síntomas en las Solanáceas (enfermedad Zebra chip en la patata) o en las Apiáceas cultivadas como la patata, el tomate, el pimiento, el tabaco, el apio o la zanahoria.
2. La bacteria se describe como esencialmente transmitida por los psílidos, insectos que pertenecen a la familia Psyllidae. La gama de huéspedes de la bacteria está limitada por la gama de huéspedes del insecto vector que se conoce por estar limitado a algunas plantas filogenéticamente cercanas (Haapalainen 2014). Los estudios de Munyaneza et al. (2016) y Antolinez et al. (2017) muestran por otra parte que los riesgos de contaminación cruzada entre la patata y la zanahoria son despreciables.
3. En las apiáceas, los síntomas se caracterizan por un desarrollo anárquico en el cuello, un rizado y/o la decoloración (amarillo, bronce a violeta) de las hojas, un retraso del crecimiento de la raíz principal y una proliferación de raíces secundarias. Estos son síntomas que pueden compararse con los de otras enfermedades: psílido de la zanahoria, amarilleo del aster (Aster Yellows phytoplasma) o Spiroplasma citri (Munyaneza, 2012).
4. Las bacterias "CLso" se dividen en nueve haplotipos: A, B, C, D, E, F, G, H y U (Haapalainen et al. 2020). El haplotipado se basa en la presencia de mutaciones en ciertos genes. Los haplotipos difieren según el huésped, el vector y la localización geográfica. Los haplotipos [C], [D], [E] y [U] se han identificado en apiáceas y se han localizado en Europa. Los haplotipos [A], [B] y [F] se han identificado en las solanáceas y se han reportado en EE. UU. y en Nueva Zelanda. Los haplotipos identificados en Francia son el D y el E (Hajri et al., 2017).
5. Desde hace algunos años, se han tomado medidas en contra de "CLso" en ciertos países, que tienen un fuerte impacto en las importaciones de semillas de zanahorias desde Francia. No obstante, desde 2017, numerosos estudios han podido afirmar que no está demostrada la transmisión de la bacteria de la semilla al cultivo para el consumo. De esta manera, las autoridades de los países de importación no tienen más argumentos científicos racionales para prohibir la introducción de semillas de zanahorias.

# Historial de estudios

Desde 2015, se han realizado numerosos estudios sobre la transmisión de la bacteria "Candidatus Liberibacter Solanacearum" por las semillas de zanahorias:

* En 2015, la publicación Bertolini et al. (2015) concluyó que podía transmitirse "Lso" de las semillas a las plantas de zanahorias.

Esta publicación ha tenido como consecuencia la implementación de medidas estrictas en las importaciones de semillas de zanahorias procedentes de Europa, de entre los cuales Francia, en algunos países.

No obstante, posteriormente, numerosos estudios han permitido aportar nuevas pruebas científicas sobre la no transmisión de la bacteria por las semillas de zanahoria:

* La ANSES, Agencia Nacional de Seguridad Sanitaria y Alimentaria de Francia, ha realizado trabajos de ampliación sobre la "Lso": los resultados de los dos estudios de Loiseau et al. 2017a y b no han permitido demostrar la transmisión de "Lso" de la semilla a las plantas y muestran que la semilla no es un vector de la enfermedad.
* Numerosos estudios realizados por investigadores japoneses también sostienen que la transmisión de la bacteria por la raíz es poco probable.
* El estudio israelí, Mawassi et al. (2018), el estudio finlandés, Haapalainen, M. et al. (2018) al igual que el estudio italiano, Carminati et al. (2019), también han obtenido resultados similares que concluyen la no transmisión de "CLso".

En resumen, hoy en día **7 estudios**, realizados por organismos diferentes e independientes, han podido demostrar **la ausencia de transmisión** de la bacteria por las semillas de zanahoria y contradicen el estudio de Bertolini et al. (2015), que es **el único estudio** que sostiene que "CLso" es **transmisible** por la semilla:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Fecha** | **Estudios** | **Conclusión sobre la transmisión de "CLso" por la semilla** |
| 2015 | **Bertolini et al. (2015):**  E. Bertolini; G. Teresani; M. Loiseau; F. Tanaka; S. Barbe; C. Martinez; P. Gentit; M. López y M. Cambra. 2015. Transmission of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in carrot seeds. PlantPathology 64 (2): 276-285, April 2015. First published: 21 May 2014.  Disponible en:  <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12245> | Transmisión |
| 2017 | **Loiseau, M. et al. (2017a):**  M. Loiseau, I. Renaudin, P. Cousseau-Suhard, P.-M. Lucas, A. Forveille y P. Gentit (ANSES). 2017. Lack of evidence of vertical transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' by carrot seeds suggests that seed is not a major transmission pathway. Plant Disease 101(12): 2104-2109, December 2017.  Disponible en:  <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-17-0531-RE> | No hay transmisión |
| 2017 | **Loiseau, M., et al. (2017b):**  M. Loiseau, I. Renaudin, P. Cousseau-Suhard, F. Poliakoff, P. Gentit. 2017. Transmission tests of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' by carrot seeds. Acta Horticulturae (1153): 41-46, March 2017.  Disponible en:  <https://www.ishs.org/ishs-article/1153_7> | No hay transmisión |
| 2017 | **Oishi et al. (2017):**  M. Oishi, S. Hoshino, Y. Fujiwara, S. Ushiku, Y. Kobayashi, I. Namba. 2017. A comparison of protocols to detect Candidatus Liberibacter solanacearum from carrot seeds, research on the effectiveness of propidium monoazide treatment and evaluation of seed transmission in carrot seeds. Res Bull Plant Prot Japan 53:111–117, March 2017.  Disponible en [en japonés]:  <https://www.maff.go.jp/pps/j/guidance/r_bulletin/pdf/rb053_016.pdf> | No hay transmisión |
| 2018 | **Haapalainen, M. et al. (2018):**  M. Haapalainen, J. Wang, S. Latvala, M. T. Lehtonen, M. Pirhonen y A. I. Nissinen. 2018. Genetic variation of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' haplotype C and identification of a novel haplotype from Trioza urticae and stinging nettle. Phytopathology 108(8): 925-934, June 2018.  Disponible en:  <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-12-17-0410-R> | No hay transmisión |
| 2018 | **Mawassi et al. (2018)**  M. Mawassi, O. Dror, M. Bar-Joseph, A. Piasezky, J. M. Sjölund, N. Levitzky, N. Shoshana, L. Meslenin, S. Haviv, C. Porat, L. Katsir, S. Kontsedalov, M. Ghanim, E. Zelinger-Reichert et al. 2018. 'Candidatus Liberibacter solanacearum' Is Tightly Associated with Carrot Yellows Symptoms in Israel and Transmitted by the Prevalent Psyllid Vector Bactericera trigonica. Phytopathology 108 (9):1056-1066, September 2018.  Disponible en:  <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-10-17-0348-R> | No hay transmisión |
| 2019 | **Carminati et al. (2019)**  G. Carminati, E. Satta, S. Paltrinieri, A. Bertaccini. 2019. Simultaneous evaluation of ‘Candidatus Phytoplasma’ and ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ seed transmission in carrot. Phytopathogenic Mollicutes. 9, 141–142, January 2019.  Disponible en:  <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:mollicutes&volume=9&issue=1&article=071> | No hay transmisión |
| 2020 | **Fujikawa, T. et al. (2020):**  T. Fujikawa, K. Yamamura, K. Osaki, N. Onozuka, M. Taguchi, A. Sasaki, M. Sato. 2020. Seed transmission of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ is unlikely in carrot. Journal of General Plant Pathology 86:266–273, May 2020.  Disponible en:  <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-020-00927-1> | No hay transmisión |

# Comparación de los estudios

Hoy en día, el estudio de Bertolini et al. (2015) es **la única publicación** que sugiere la transmisión de "Lso" por las semillas de zanahoria. Sin embargo, sus resultados son controvertidos ya que no han podido confirmarse por los estudios más recientes:

1. En efecto, **las conclusiones** de Bertolini et al. (2015) afirman la transmisión de "Lso" del grano a la planta de zanahoria, no obstante:
   1. El estudio Loiseau et al. (2017) concluyó que no se ha confirmado la transmisión de "Lso" por los granos, aunque los lotes de semillas analizados tengan el mismo origen que los utilizados por Bertolini et al. (2015). Los autores han sugerido que la disparidad en los resultados podría deberse a condiciones agronómicas diferentes.
   2. El estudio Loiseau et al. (2017a) ha llevado a cabo nuevos ensayos, utilizando condiciones de cultivo parecidas a las descritas por Bertolini et al. (2015): esto ha permitido confirmar los resultados obtenidos en el transcurso de su primera experiencia.
   3. El estudio Oishi et al. (2017) no ha señalado plántulas contaminadas por "CLso" y no confirma la transmisión de "CLso" de la semilla a la planta.
   4. Según el estudio Haapalainen et al. (2018), no se ha detectado "Lso" en los cultivos de zanahorias procedentes de lotes de semillas cuya infección por el haplotipo D "Lso" era conocida. Este resultado se ajusta a los resultados de los estudios de Loiseau et al. (2017a, 2017b).
   5. El estudio Mawassi et al. (2018) tampoco ha observado la transmisión de la enfermedad por la semilla. Este sugiere que los psílidos representan los principales vectores de la enfermedad.
   6. El estudio Carminati et al. (2019) tampoco ha observado transmisión de "CLso" por la semilla en el transcurso de los ensayos realizados.
   7. Los ensayos del estudio Fujikawa, T. et al. (2020) han utilizado lotes de semillas infectados procedentes de Francia y se han realizado en las mismas condiciones que los estudios Bertolini y Loiseau. Los resultados han probado que la tasa de transmisión de la bacteria es despreciable.
2. En cuanto a **los resultados** de Bertolini et al. (2015):
   1. Después de 6 meses de cultivo, la tasa de plantas infectadas señalada se muestra heterogénea según los lotes (15 a 42%), no obstante, los resultados de los demás estudios han mostrado:
      * En el estudio Loiseau et al., (2017b), solamente se han señalado 9 plantas positivas a "CLso" de 432 plantas (es decir, el 2% de los casos), mientras que la tasa de infección de los lotes de semillas era del 96% al 100%, superior a la tasa de infección de los lotes utilizados en el estudio Bertolini (del 47 al 94%): por lo tanto, la transmisión de la bacteria se considera rara y difícilmente reproducible.
      * En el estudio Fujikawa, solamente del 2 al 6% de los casos han dado positivo: una proporción muy baja. En particular, el estudio ha permitido evaluar de manera estadística el riesgo de infección que representa "CLso": ha concluido que la transmisión por las semillas es sumamente despreciable.
      * En los estudios Oishi y Carminati, no se ha detectado ningún caso positivo.
      * En el estudio de Mawassi, no se ha detectado ningún caso positivo mientras que el 30% de los lotes de semillas estaban infectados inicialmente.
   2. Asimismo, en el estudio Bertolini, las plantas positivas a "CLso" no presentaban **síntomas visibles** (a excepción de un caso específico que representa menos del 0,7% de las muestras).
      * En los estudios Loiseau et al. (2017a&b) y Fujikawa, T. et al. (2020) no se ha detectado ningún síntoma, incluso en los casos que han dado positivo.
   3. Además, en el estudio Bertolini se han realizado ensayos en campo y se observa que después de 6 meses, el 100% de la parcela estaba infectada por la bacteria: este resultado debe **interpretarse con mucha precaución**, ya que no se ha proporcionado ningún informe de análisis, ni el detalle del protocolo experimental o las condiciones de cultivo: con tan poca información, no es posible concluir que las semillas fueran el factor de la infección de la parcela, pudiendo deberse la infección también a otros vectores, tales como los psílidos.
3. "Candidatus Liberibacter solanacearum" se identifica como una **bacteria vascular limitada al floema**:
   1. La bacteria no puede cultivarse en un medio artificial y únicamente puede sobrevivir en el floema de la planta o un insecto vector (Bové, 2006; Jagoueix et al., 1994; Liefting et al., 2009b). En el caso de las semillas, la bacteria se habría localizado en el floema de los tegumentos de los granos (Bertolini et al., 2015; Mawassi et al., 2018; Haapalainen, M. et al., 2018).
   2. Según el estudio Loiseau et al. (2017b), numerosos informes, que tienen como tema los organismos perjudiciales limitados al floema/xilema, han concluido que la transmisión de este tipo de patógeno es muy rara y difícilmente reproducible (Della Coletta-Filho et al., 2014; Hartung et al., 2014; Lapierre & Signoret, 2004).
   3. Según el estudio Haapalainen, M. et al. (2018), es posible que las bacterias detectadas en las semillas no sean viables o aptas para pasar de los tegumentos del grano al embrión: el suspensor que conecta el embrión con el funículo no contiene floema (Standler et al., 2005). Por lo tanto, "CLso" estaría limitado a las células del floema (Nissine et al., 2014).
   4. Estos datos proporcionan por tanto la prueba de que la transmisión de la bacteria por la semilla es poco probable.
4. Los estudios concluyen que **"CLso" se transmite por otro vector** distinto de las semillas: **Los psílidos**:
   1. Según numerosos estudios (Munyaneza, 2012; Munyaneza, 2016; Haapalainen et al., 2017; Nissinen et al., 2014) y la OEPV, la bacteria es conocida por transmitirse por los psílidos.
   2. Se ha observado que los psílidos son particularmente abundantes en las zonas donde se sabe que hay "CLso", lo que constituye el vector principal del patógeno (OEPV; Mawassi et al., 2018).
   3. Cuando los psílidos se nutren del contenido del floema, estos introducen la bacteria "Lso" en el tejido del floema del tegumento del grano (MPI Pest Risk Assessment, 2015; Monger y Jeffries, 2016). Los agentes patógenos transmitidos por las semillas deben detectarse a partir del embrión de las semillas (Singh y Mathur, 2004).
5. La **distribución geográfica de los haplotipos de "CLso"** en el mundo sugiere que las semillas no transmiten la bacteria en los países importadores.
   1. En efecto, los tres haplotipos conocidos que infectan la zanahoria (C, D y E) se localizan como tal: el haplotipo C al norte de Europa (Suecia, Noruega, Finlandia y Alemania) y se transmite por T. apicalis; los haplotipos D y E al sur de Europa/Mediterráneo (España, Francia, Islas Canarias, África e Israel) transmitidos por B. trigonica (Alfaro-Fernandez et al. 2012a, b; Hajri et al. 2017; Munyaneza et al. 2010, 2012, 2015; Tahzima et al. 2014).
   2. Asimismo, trabajos recientes han puesto en evidencia la presencia de la bacteria en los lotes de semillas europeas desde los años 1970 (Monger y Jeffries, 2018). Debido a la intensidad del comercio internacional, la bacteria tendría que haberse propagado por todo el mundo. Sin embargo, se puede suponer que aún no se ha señalado la presencia de "CLso" en los países importadores.
   3. Los trabajos de Haapalainen et al. (2018) en Finlandia han identificado el haplotipo D en 2 de 34 lotes de semillas de zanahoria importados. Nunca se había observado este haplotipo en los cultivos en Finlandia, donde solo se ha indicado el haplotipo C. Teniendo en cuenta que las semillas de zanahorias no se producen en Finlandia, estas son exclusivamente importadas: de esta manera, habría sido probable identificar los otros haplotipos de "CLso" en los cultivos finlandeses, no obstante, nunca se ha dado el caso. De esta manera, tal como han concluido los autores de esta publicación, esta sugiere que las semillas de zanahoria no son una fuente importante de transmisión de "Lso".
   4. Los trabajos de Mawassi et al. (2018) han identificado la presencia del haplotipo D en los cultivos de zanahorias en Israel. Todavía no se conoce el origen de "CLso" en este país. Se han contemplado múltiples escenarios en este estudio: "CLso" podría provenir de materiales vegetales importados, de la migración de psílidos o bien la bacteria podría estar presente en Israel desde hace mucho tiempo. Entonces, se han llevado a cabo ensayos en los lotes de semillas importados que datan de hace 20 años: estos han revelado la presencia de un haplotipo similar al haplotipo E. Israel importa semillas de zanahoria de países conocidos por tener "CLso": de esta manera, sería probable que los haplotipos C, D y E estuvieran presentes en los cultivos israelís. Sin embargo, por el momento no se han encontrado los haplotipos C y E en los cultivos de zanahoria en Israel.
6. Para concluir, los resultados del estudio Bertolini et al. (2015) se han constatado por los siete estudios presentes. De esta manera, el estudio no representa por sí solo una prueba suficiente para demostrar con claridad la transmisión de "CLso" por las semillas.
   1. Los resultados positivos obtenidos por Bertolini et al. (2015) se deben muy probablemente a una contaminación cruzada en el transcurso de la extracción del ADN o de la amplificación por PCR y/o a una amplificación no específica de organismos estrechamente ligados a las Liberibacter.

# Otros argumentos

1. La transmisión por la semilla no se ha demostrado claramente para las otras especies Liberibacter (Hilf et al. 2013, Hilf 2011, Van Vuuren et al. 2011).
   1. En la patata, esta bacteria no se transmitiría por las semillas auténticas (Munyaneza, 2012).
   2. Del mismo modo, en los primeros estudios sobre la transmisión por granos de cítricos de "Candidatus Liberibacter asiaticus" se ha debatido la posibilidad de una transmisión vertical de esta bacteria (Tatineni et al. 2008; Tirtawidjaja 1981). Pese a ello, investigaciones exhaustivas dirigidas por Hartung et al. (2010) no han permitido descubrir los síntomas típicos de Huanglongbing (enfermedad del dragón amarillo, producida por "Candidatus Liberibacter spp.") ni pruebas positivas para "Ca. L. asiaticus" durante el transcurso de tres años de ensayos en 723 plantas procedentes de granos recolectados en cítricos infectados. Actualmente, todavía no hay ninguna prueba de su transmisión por los granos de cítricos. Nunca se han confirmado los informes anteriores sobre la transmisión del agente patógeno por las semillas.
   3. En el marco de los trabajos internos realizados por la ANSES, todas las plantas germinadas a partir de semillas de frutas infectadas de tomate, pimiento y tamarillo han dado negativo a "CLso".
2. Cabe recordar que únicamente las bacterias de "CLso" de haplotipos de solanáceas (A y B), al igual que su vector *Bactericera cockerelli*, están inscritas en la lista A1 de OEPV: "List of pests recommended for regulation as quarantine pests" (según la versión más reciente de septiembre de 2020). Los haplotipos de las apiáceas (C, D, E) no se consideran potenciales plagas cuarentenarias.

# Conclusión

Estos estudios recientes permiten afirmar que **no se ha demostrado** **la transmisión** de la bacteria "Candidatus Liberibacter solanacearum" por las semillas de zanahorias y de Apiáceas. De esta manera, las medidas establecidas por Perú para las importaciones de semillas de zanahorias (prueba PCR negativa exigida) ya no son técnicamente justificables.

Con base en estas fuentes científicas, **Japón**, **Nueva Zelanda**, dos países particularmente restrictivos en relación con las normas fitosanitarias, al igual que **Costa Rica** y **Argentina** han retirado sus exigencias sobre "Candidatus Liberibacter solanacearum" en 2020 y 2021.

Por lo tanto, solicitamos a las autoridades sanitarias peruanas que tengan a bien retirar las exigencias de análisis PCR de "CLso" en las semillas de zanahoria con el propósito de que las importaciones francesas puedan estar de nuevo operativas.