

**DISEMINACIÓN DEL ENVERDECIMIENTO DE LOS CÍTRICOS Y EVALUACIÓN  
DE PROTOCOLOS PARA LA CERTIFICACIÓN DE MATERIAL PROPAGATIVO EN  
PUERTO RICO**

Por

**Margarita Rosa Marroquín Guzmán**

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

en

**PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

**DEPARTAMENTO DE CULTIVOS Y CIENCIAS AGROAMBIENTALES**

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO**

**RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ**

**2012**

Aprobado por

---

Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D.  
Presidente, Comité Graduado

---

Fecha

---

Mildred Zapata Serrano, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Carlos Rodríguez Minguela, Ph. D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Yolanda Canabal, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

---

Skip Van Bloem, Ph. D.  
Director del Departamento

---

Fecha

## RESUMEN

En Puerto Rico los cítricos tienen un gran potencial agrícola y son uno de los frutos de mayor importancia económica con 3,100 hectáreas cultivadas en la zona montañosa. La presencia del Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en Puerto Rico y el hecho de que esta enfermedad puede ser diseminada en materiales infectados como yemas, plántulas e injertos, indica la importancia de realizar un monitoreo en la Isla. Se realizó un muestreo para detectar la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del EC, en las principales áreas productoras de cítricos en Puerto Rico. Los muestreos incluyeron siete viveros y 20 huertos, localizados en 21 municipios de la Isla. También se colectaron muestras en viveros de la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, EEA de Isabela y Las Marías, con el propósito de evaluar protocolos de diagnóstico para EC, el Virus de la Tristeza (CTV) y Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC). Las muestras fueron procesadas en la Clínica de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz. La detección del EC se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores OI1 y OI2, mientras que para el CTV y la CVC se utilizaron las técnicas ELISA Sandwich de Triple Anticuerpo (TAS-ELISA) y Sandwich de Doble Anticuerpo (DAS-ELISA), respectivamente. Se analizaron un total de 490 muestras, de las cuales 63 resultaron positivas para CTV, 28 para EC y una para CVC. No se detectó la presencia de estas enfermedades en el vivero de la EEA de Isabela, en donde se mantienen las plantas de cítricos en una estructura protegida. El EC se encuentra diseminado en huertos comerciales y viveros de las localidades de Adjuntas, Añasco, Cabo Rojo, Coamo, Dorado, Juana Díaz, Las Marías y Santa Isabel. La incidencia del EC en el presente monitoreo fue de 7.0%. El CTV se detectó en los viveros de la EEA de Adjuntas, Cabo Rojo, Las Marías y Arecibo. Los resultados obtenidos para el CVC utilizando la prueba DAS-ELISA fueron ambiguos, por lo que se requiere de mayor investigación. En Puerto Rico el reglamento de Sanidad Vegetal establece una cuarentena para la introducción de material de cítricos para propagación. Sin embargo, la producción de plantas de vivero no está regulada y el riesgo de diseminación de enfermedades es permanente. El inicio de una citricultura exitosa en Puerto Rico dependerá de plantar árboles libres de enfermedades, controlar la presencia de vectores y monitorear la presencia de enfermedades como EC, CTV y CVC, que son transmitidas a través de material propagativo en los huertos y viveros de la Isla.

Palabras Claves: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Xylella fastidiosa*, PCR, ELISA, programas de certificación.

## ABSTRACT

Citrus production has great potential and is one of the most economically important fruits in Puerto Rico with 3,100 hectares sown in the mountainous area. The presence of Citrus Greening (CG) in Puerto Rico and the fact that this disease can be spread by infected materials such as buds, seedlings or grafting indicates the importance of screening the citrus production areas in the Island. A survey was conducted in the major citrus producing areas for detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of CG. Seven nurseries and 20 orchards, located in 21 municipalities were sampled. With the purpose of evaluating diagnostic protocols for CG, Tristeza Virus (CTV) and Citrus Variegated Chlorosis (CVC) samples from nurseries in the Agricultural Experiment Station (AES) of Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, AES of Isabela and Las Marias also were collected. The samples were processed at the Plant Disease Clinic in the AES of Juana Díaz. CG was identified using Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers OI1 and OI2, while CTV and CVC were detected by Triple Antibody Sandwich (TAS-ELISA) and Double Antibody Sandwich (DAS-ELISA), respectively. A total of 490 samples were analyzed, of which 63 were positive for CTV, 28 for CG and one for CVC. In the nursery of the AES of Isabela, where citrus plants are kept in a protected structure, these diseases were not detected. The CG is scattered in commercial orchards and nurseries in the municipalities of Adjuntas, Añasco, Cabo Rojo, Coamo, Dorado, Juana Diaz, Las Marias and Santa Isabel. The incidence of CG in this study was 7.0%. The CTV was detected in nurseries in Adjuntas, Cabo Rojo, Las Marias and Arecibo. DAS-ELISA test for CVC gave ambiguous results, which requires further investigation. In Puerto Rico, the regulation of Plant Health establishes quarantine for the introduction of citrus propagation material. However, citrus production in nurseries is not regulated and the risk of spreading diseases is permanent. The beginning of a successful citrus production in Puerto Rico depend on planting disease-free trees, controlling the presence of vectors and screening diseases like CG, CTV and CVC, transmitted through propagation material in nurseries and orchards in the Island.

Keywords: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Xylella fastidiosa*, PCR, ELISA, certification programs.

*A mis padres Héctor y Luz Mery, y hermano Héctor Fabio,  
por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Consuelo Estévez de Jensen por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación y por la oportunidad que me brindó a través del proyecto T-STAR 135.

Muchas gracias a la Dra. Mildred Zapata y a el Dr. Carlos Rodríguez Minguela por su tiempo y sus valiosas contribuciones.

A la Dra. Lydia I. Rivera Vargas por haber confiado en mí desde un inicio y por haberme brindado todo su apoyo y conocimiento en mi formación profesional en estos dos años.

A Félix Román, Ada Alvarado, Edda Martínez y Luís Sánchez por su disposición y colaboración durante la recolección de muestras.

A Pedro L. Rivera Serrano por todo su amor, apoyo incondicional y comprensión. A Luz Mery Guzmán, Héctor Marroquín y Héctor Fabio Marroquín por ser una fuente de inspiración.

A quienes me brindaron su amistad, confianza y compartieron junto a mi buenos y malos momentos durante estos dos años.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE APÉNDICES</b> .....	xv
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	1
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	4
 <b>CAPÍTULO 1: DISEMINACIÓN DEL ENVERDECIMIENTO DE LOS CÍTRICOS EN PUERTO RICO</b>	
RESUMEN .....	6
ABSTRACT.....	7
1.1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
1.2.1. El Enverdecimiento de los Cítricos a nivel mundial .....	10
1.2.2. Sintomatología.....	11
1.2.3. Agente causal.....	12
1.2.4. Vector .....	13
1.2.5. Diagnóstico de la enfermedad .....	14
1.2.6. Manejo de la enfermedad .....	15
1.2.6.1. Control químico del vector .....	16
1.2.6.2. Control biológico del vector .....	17
1.2.6.3. Plantas repelentes.....	19
1.2.6.4. Nutrición de los cítricos.....	19
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
1.3.1. Recolección de muestras .....	21
1.3.2. Extracción de ADN .....	24
1.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
1.3.4. Purificación del producto de PCR .....	25
1.3.5. Secuenciación .....	25

1.3.6. Distribución espacial del EC en Puerto Rico .....	26
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
1.4.1. Recolección de muestras .....	27
1.4.2. Detección de <i>Ca. L. asiaticus</i> en <i>Citrus</i> spp.....	33
1.4.3. Distribución espacial del EC en Puerto Rico .....	40
1.5. CONCLUSIONES .....	44
1.6. RECOMENDACIONES .....	45
1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## **CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA CERTIFICACIÓN DE MATERIAL PROPAGATIVO DE CÍTRICOS EN PUERTO RICO**

RESUMEN .....	59
ABSTRACT.....	60
2.1. INTRODUCCIÓN .....	61
2.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	62
2.2.1. Programas de certificación .....	62
2.2.2. Enverdecimiento de los Cítricos (EC).....	64
2.2.3. Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) .....	65
2.2.4. La Tristeza de Los Cítricos (CTV).....	66
2.2.5. El Cancro de los Cítricos (CC).....	69
2.2.6. La Mancha Negra de los Cítricos .....	71
2.2.7. Otras enfermedades de importancia en Cítricos.....	72
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	74
2.3.1. Recolección de muestras .....	74
2.3.1.1. Isabela .....	74
2.3.1.2. Adjuntas.....	76
2.3.1.3. Arecibo .....	76
2.3.1.4. Cabo Rojo .....	76
2.3.1.5. Las Marías .....	77
2.3.2. Detección de enfermedades.....	77
2.3.2.1. Enverdecimiento de los Cítricos.....	77

2.3.2.2. Clorosis Variegada de los Cítricos .....	78
2.3.2.3. Tristeza de los Cítricos .....	79
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
2.4.1. Recolección de muestras .....	80
2.4.1.1. Isabela .....	80
2.4.1.2. Adjuntas.....	81
2.4.1.3. Arecibo .....	82
2.4.1.4. Cabo Rojo .....	83
2.4.1.5. Las Marías .....	86
2.4.2. Detección de enfermedades .....	88
2.4.2.1. Enverdecimiento de los Cítricos .....	88
2.4.2.2. Clorosis Variegada de los Cítricos .....	95
2.4.2.3. Tristeza de los Cítricos .....	103
2.5. CONCLUSIONES .....	107
2.6. RECOMENDACIONES .....	108
2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109
APÉNDICE 1.1. ....	118
APÉNDICE 1.2. ....	127

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1.</b> Hospederos de <i>Trioza erytreae</i> y <i>Diaphorina citri</i> (Mukhopadhyay 2004). ....	13
<b>Tabla 1.2.</b> Georeferenciación de las zonas de muestreo para la identificación del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico.....	23
<b>Tabla 1.3.</b> Número de muestras colectadas en los 21 localidades visitadas durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico .....	28
<b>Tabla 1.4.</b> Homología encontrada entre las secuencias del gen 16S del ADN ribosomal amplificadas mediante PCR y las secuencias reportadas en el Banco de Genes (GenBank). ....	34
<b>Tabla 1.5.</b> Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de <i>Ca. L. asiaticus</i> , agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (EC).....	119
<b>Tabla 2.1.</b> Viveros muestreados en Puerto Rico para la detección de <i>Ca. L. asiaticus</i> agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (EC), <i>X. fastidiosa</i> causante de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza (CTV). ....	75
<b>Tabla 2.2.</b> Detección de <i>Ca. L. asiaticus</i> mediante PCR con los iniciadores específicos OI1/OI2 en los cinco viveros muestreados.....	91
<b>Tabla 2.3.</b> Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero de la EEA de Isabela, Puerto Rico. ....	97

<b>Tabla 2.4.</b>	Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero de la EEA de Adjuntas, Puerto Rico. ....	98
<b>Tabla 2.5.</b>	Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero Jardines de Eneida de Cabo Rojo, Puerto Rico .....	100
<b>Tabla 2.6.</b>	Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero Enseñat de Las Marías, Puerto Rico.....	101
<b>Tabla 2.7.</b>	Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero Byron Pike de Arecibo, Puerto Rico .....	102

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1.</b> Municipios muestreados durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en Puerto Rico .....	22
<b>Figura 1.2.</b> Distribución del total de muestras procesadas entre las ocho especies de <i>Citrus</i> spp. colectadas durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en Puerto Rico .....	27
<b>Figura 1.3.</b> Síntomas de muestras provenientes de Santa Isabel, Sabana Grande, Juana Díaz y Lares. <b>(A)</b> Naranja EC246 con hojas cloróticas y moteado distribuido en forma asimétrica. <b>(B)</b> Naranja EC382 con engrosamiento y aclaramiento de la nervadura central. <b>(C)</b> Limón Tahití EC609 con clorosis y malformaciones en las hojas. <b>(D)</b> Mandarina EC399 con moteado de hojas y engrosamiento de la nervadura central .....	31
<b>Figura 1.4.</b> Síntomas observados los huertos de Cítricos en Puerto Rico. <b>(A)</b> Proliferación de brotes amarillos en un huerto de limón del país en Coamo. <b>(B)</b> Árboles pequeños con amarillamiento en Coamo. <b>(C)</b> Caída prematura de frutos en un huerto de naranja en Sabana Grande. <b>(D)</b> Brotes amarillos y defoliación en el huerto de limón Tahití de la EEA de Juana Díaz .....	32
<b>Figura 1.5.</b> Zonas monitoreadas durante Febrero 2011 hasta Marzo 2012 en Puerto Rico. Los puntos verdes corresponden a las localidades en las que no se detectó la bacteria. Los puntos rojos representan las localidades en donde se detectó la presencia de <i>Ca. L. asiaticus</i> .....	33

<b>Figura 1.6.</b>	Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para <i>Ca. L. asiaticus</i> . 1 y 14: marcador de peso molecular 1Kb, 2: EC158, 3: EC159, 4: EC208, 5: EC209, 6: EC241, 7: EC246, 8: 248, 9: EC249, 10: EC250, 11: EC251, 12: Control negativo, 13: Control positivo EC151 .....	35
<b>Figura 1.7.</b>	Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para <i>Ca. L. asiaticus</i> . 1: marcador de peso molecular 1Kb, 2: EC599, 3: EC600, 4: EC601, 5: EC602, 6: EC603, 7: EC604, 8: EC605, 9: EC606, 10: EC607, 11: EC608, 12: EC609, 13: Control negativo, 14: Control Positivo EC151 .....	35
<b>Figura 1.8.</b>	Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para <i>Ca. L. asiaticus</i> . 1 y 14: marcador de peso molecular 1Kb, 2: Control positivo EC151, 3: EC295, 4: EC314, 5: EC338, 6: EC342, 7: EC346, 8: EC415, 9: EC417, 10: EC418, 11:EC419, 12: EC433, 13: EC434, 14: EC209, 15: EC241, 16: Control negativo, 17: EC248. ....	36
<b>Figura 1.9.</b>	Muestras asintomáticas en las que se detectó <i>Ca. L. asiaticus</i> . EC419: muestra de mandarina proveniente de Dorado. EC600 y EC602: naranjas provenientes de Añasco. ....	36
<b>Figura 1.10.</b>	Número de adultos de <i>Diaphorina citri</i> , vector de la bacteria <i>Ca. L. asiaticus</i> , en brotes de cítricos colectados durante el monitoreo de EC en Puerto Rico.....	38
<b>Figura 1.11.</b>	Conglomerado espacial principal de la presencia de <i>Ca. L. asiaticus</i> , agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico.....	42
<b>Figura 1.12.</b>	Conglomerado espacial secundario de la presencia de <i>Ca. L. asiaticus</i> , agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico.....	43

- Figura 2.1.** Muestras de cítricos colectadas en el vivero de la EEA de Isabela. **(A)** VI463: Tangelo con síntomas de deficiencias de Zinc. **(B)** VI486: Lima Tahití con síntomas de deficiencia de Magnesio. **(C)** VI467: Muestra de Tangelo asintomática. **(D)** Vivero de cítricos en la EEA de Isabela .....81
- Figura 2.2.** Muestras de cítricos colectadas en el vivero de la EEA de Adjuntas. **(A)** VA520: mandarina con síntomas de deficiencia de magnesio. **(B)** VA545: mandarina con síntomas de deficiencia de manganeso.....82
- Figura 2.3.** **(A)** Cítricos del vivero Byron Pike en Arecibo. **(B)** VB616: naranja con síntomas de deficiencia de manganeso. **(C)** VB610: limón del país con deficiencias de zinc. **(D)** VB615: limón del país con síntomas de deficiencia de magnesio.....84
- Figura 2.4.** Muestras de cítricos colectadas en el vivero Jardines de Eneida, Cabo Rojo. **(A)** VC557: tangelo con aclaramiento y engrosamiento de las nervaduras. **(B)** VC570: naranja con aclaramiento de la nervadura central **(C)** VC553: tangelo con síntomas de deficiencia de potasio **(D)** VC572: naranja con hojas deformadas y asimétricas .....85
- Figura 2.5.** Muestras colectadas en el vivero Enseñat, Las Marías. **(A)** Presencia de áfidos en las plantas de cítricos. **(B)** VL589: naranja con moteado irregular en las hojas. **(C)** VL591: lima Tahití con síntomas de deficiencia de magnesio. **(D)** VL574: naranja con hojas cloróticas y síntomas de deficiencia de zinc .....87
- Figura 2.6.** Muestras del vivero Enseñat en Las Marías. Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para *Ca. L. asiaticus*. 1 y 21: marcador de peso molecular 1Kb, 28 y 29: Control negativo, 30: Control Positivo, 2: VL574, 3: VL575, 4: VL576, 5: VL577, 6: VL578, 7: VL579, 8: VL580, 9: VL581, 10: VL582, 11: VL583, 12: VL584, 13: VL585, 14: VL586, 15: VL587, 16: VL588, 17: VL589, 18: VL590, 19: VL591,

20: VL592, 22: VL593, 23: VL594, 24: VL595, 25: VL596, 26: VL597, 27:  
VL598.....90

**Figura 2.7.** *Citrus limon* colectado en Cabo Rojo, positivo para CVC mediante la técnica  
DAS-ELISA .....95

**Figura 2.8.** Incidencia del Virus de la Tristeza (CTV), Clorosis Variegada (CVC) y  
Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en los cinco viveros muestreados .....106

## LISTA DE APÉNDICES

	<b>Página</b>
<b>APÉNDICE 1.1. REGISTRO DE MUESTRAS COLECTADAS .....</b>	<b>119</b>
<b>APÉNDICE 1.2. ANÁLISIS ESPACIAL DEL EC OBTENIDO A TRAVÉS DE SaTScan™.....</b>	<b>128</b>

## JUSTIFICACIÓN

Los cítricos son cultivos permanentes y en general, tienen alta adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, facilitando su distribución en un gran número de países. De acuerdo con datos suministrados por la FAOSTAT (2012), los principales productores son Brasil (17,618, 500 Mt) y Estados Unidos (8, 280, 780 Mt), aportando respectivamente el 21.4 % y 14.5% de la producción mundial, siguiendo en orden de importancia India, China y México, representando en conjunto el 27.6%.

En Puerto Rico los cítricos más cultivados son: naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), lima (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), limón (*Citrus limon* (L.) Osbeck) y pomelo (*Citrus paradisi* Macfad.) (Toro, 1989). Su cultivo comercial se realiza principalmente en la zona montañosa de la Isla, donde sobresalen los municipios de Lares, San Sebastián, Adjuntas, Utuado y Maricao, con una superficie de 3,100 Ha (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2008).

Para el año fiscal 2007-2008, los cítricos alcanzaron una producción de 130,500 millares a un costo promedio de US\$ 94.00 por millar. En términos de aporte al ingreso bruto agrícola de Puerto Rico los frutales generaron \$11.0 millones, representando el 34%, del total de \$32.6 millones (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2008).

Existen varias enfermedades que afectan a los cítricos en Puerto Rico en huertos y viveros. En el vivero los principales patógenos son *Phytophthora* sp. ocasionando la pudrición de raíz, *Colletotrichum* sp. agente causal de la antracnosis y *Alternaria citri* causante de la mancha marrón (Alvarado y Zamora, 2007). En los huertos en producción en la Isla se ha reportado la Mancha grasosa (*Mycosphaerella citri*), Psorosis de etiología viral, muerte descendiente por *Phytophthora* sp. (Alvarado y Zamora, 2007) y enfermedades sistémicas como la Tristeza de los Cítricos causada por un virus (CTV), la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) (Zapata et al., 2011) y el Enverdecimiento de los Cítricos (EC) (Estévez de Jensen et al., 2010).

Entre estas enfermedades, la más devastadora es el EC. El EC es ocasionado por la bacteria endógena *Candidatus Liberibacter* spp., la cual está restringida al floema de las plantas (Folomonova et al., 2009). En Filipinas, la producción de mandarinas en el año 1960 fue de 11,700 toneladas, y después de una década del ataque del patógeno la producción solamente llegó a 100 toneladas en 1970 (Bové, 2006). En Guandong (China), durante el período

comprendido entre 1977-1981 se erradicaron 960,000 plantas de mandarinas y limones, disminuyendo la producción de la región de 450,000 a 5,000 toneladas al año (García, 2009). Se estima que a escala mundial más de 60 millones de árboles habían sido destruidos en el mundo antes de principios de los años 90 a causa del EC. En Sudáfrica el EC ocasiona pérdidas anuales del 30 al 100% de la producción en las plantaciones donde está presente (Bové, 2006). El EC se reportó en Florida en el 2005, causando estragos en los cultivos de cítricos del estado y provocando un impacto negativo en el sector. La enfermedad se ha propagado por todo el estado de Florida y se ha detectado en Luisiana, Carolina del Sur, California, Texas, Arizona y Georgia (USDA, 2011).

Prácticamente todas las especies y cultivares comerciales de cítricos son susceptibles al EC, independientemente del portainjerto. La presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* fue identificada por primera vez en Puerto Rico en el 2009 (Estévez de Jensen et al., 2009), casi ocho años después del primer reporte del psílido vector *Diaphorina citri* Kuwayama (Halbert y Núñez, 2004).

Hasta el momento, no se ha documentado éxito total en el manejo del EC una vez está presente. La erradicación de la enfermedad es posible solamente si se detecta temprano. Aun así, se requiere de investigación de la epidemiología y desarrollo de tácticas de control del vector. Ninguna de las medidas usadas contra la enfermedad ha brindado una solución eficaz hasta el momento y los países con más experiencia en el manejo de la misma han optado por convivir con ella, por lo que el componente clave para mantener la producción comienza con la siembra de plantas sanas (Manjunath et al., 2008).

De la misma forma que una planta de vivero de buena calidad constituye una de las principales bases de la citricultura, una planta de vivero de baja calidad puede originar una plantación improductiva y hacer inviable un negocio lucrativo (Lee, 2008). En Brasil todos los años millones de árboles son erradicados debido a la CVC, EC, Cancro de los Cítricos y a otras enfermedades y plagas. Buena parte de estas plantas no llegó a producir ya que fueron llevadas a las plantaciones con algún tipo de enfermedad (Carvalho et al., 2005).

Los programas de certificación son diseñados para garantizar que se lleven al huerto plantas sanas de alto potencial genético y constituyen el pilar fundamental de un programa de manejo integrado de plagas y enfermedades. En este contexto, la implementación de protocolos para el diagnóstico de enfermedades cuarentenarias de cítricos como la mancha negra

(*Guignardia citricarpa*), el cancro de los cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), EC, CVC y CTV en un programa de producción de material de propagación certificado es necesaria para garantizar plantaciones sanas desarrolladas sobre la base de la diversificación de patrones (Carvalho et al., 2005).

En Puerto Rico no existe un programa de certificación de cítricos, por lo que la introducción de material propagativo e importación de frutas pueden ocasionar el ingreso de enfermedades de una forma inadvertida. La producción de plantas de cítricos en los viveros de la Isla no cuenta con un sistema de verificación de la sanidad de las plantas y el peligro de propagación de enfermedades se mantiene.

El propósito de esta tesis es contribuir a la implementación de medidas que permitan la detección periódica de la presencia de estas enfermedades en los huertos comerciales, y de esta manera, facilitar una producción segura y exitosa de cítricos en la Isla. Se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la distribución del Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en Puerto Rico.
- 2) Detectar la presencia de enfermedades como el EC, CVC y CTV, en viveros mediante técnicas moleculares y serológicas.
- 3) Evaluar protocolos para la certificación de material propagativo de cítricos en Puerto Rico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, A. y J. L. Zamora. 2007. Guía práctica de plagas y enfermedades en cítricas. Servicio de Extensión Agrícola, Colegio de Ciencias Agrícolas de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. 61P.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of *Citrus*. *Journal of Plant Pathology* 88 (1): 7-37.
- Carvalho, S. A., C. C. Graf and A. R. Violante. 2005. Produção de material básico e propagação. Citros, Brasil. 38 P.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2008. Oficina de Estadísticas Agrícolas. Ingreso Bruto Agrícola. Año fiscal 2007-2008. San Juan, Puerto Rico.
- Estévez De Jensen, C., F. Román, E. Abreu, A. Alvarado y O. Ortiz. 2009. Presencia del “Enverdecimiento de los Cítricos” en Puerto Rico. Resúmenes Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas. Pp. 7.
- Estévez De Jensen, C., A. Vitoreli y F. Román. 2010. Citrus greening in commercial orchards in Puerto Rico. *Phytopathology* 100: S34.
- FAOSTAT. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). On line (Consultado Julio 2012): <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Folimonova, S. Y., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda and W. O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of *Citrus* to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99: 1346-1354.

- Halbert, S. E. and C. A. Núñez. 2004. Distribution of the Asian *Citrus* psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. *Florida Entomologist* 87(3):401-402.
- Lee, R. 2008. Programas de certificación para cítricos. USDA ARS. 15 P. Online (Consultado Julio 2011): <http://www.concitver.com/manualdesaneamientoydiagnostico/PROGRAMAS%20DE%20CERTIFICACION%20PARA%20C%3%8DTRICOS.pdf>.
- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S., and Lee, R. F. 2008. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98:387-396.
- Toro, E. R., 1989. Cultivo de Cítricos en Puerto Rico. Servicio de Extensión Agrícola. Mayagüez, Puerto Rico. 41 P.
- USDA. 2011. Salve los cítricos. On line (Consultado Julio 2011): <http://salveloscitricos.org/practice-safe-citrus/>.
- Zapata, M, J. Hartung, B. Brodbeck and P. Andersen. 2011. Endophytic bacteria from the vascular tissue of coffee (*Coffea arabica* L.) and citrus (*Citrus sinensis* L.) leaves found during the attempt to isolate the pathogen, *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. *Phytopathology* 101:S279.

# CAPÍTULO 1

## DISEMINACIÓN DEL ENVERDECIMIENTO DE LOS CÍTRICOS EN PUERTO RICO

### RESUMEN

La enfermedad de mayor impacto para la citricultura es el Enverdecimiento de los Cítricos (EC) debido a su severidad, pérdidas que ocasiona y dificultad para su control. Esta fue identificada en Puerto Rico el 2009 en *Citrus sinensis* en la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Isabela. El agente causal fue *Candidatus Liberibacter asiaticus*, una bacteria fastidiosa alojada en el floema de las plantas infectadas. El vector es el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), detectado en Puerto Rico en el 2001. Desde febrero de 2011 hasta marzo de 2012 se realizó un monitoreo en las principales áreas productoras de cítricos en Puerto Rico para detectar la presencia de *Ca. L. asiaticus*. Los muestreos incluyeron siete viveros y 20 huertos, localizados en 21 municipios de la Isla. En cada localidad se colectaron muestras sintomáticas y asintomáticas, y se procesaron en la Clínica de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz. La detección de *Ca. L. asiaticus* se realizó amplificando fragmentos de la región 16S del ADN ribosomal por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores OI1 y OI2. Se procesó un total de 345 muestras y los resultados obtenidos demostraron que el EC se encuentra diseminado en huertos comerciales y viveros en las localidades de Adjuntas, Añasco, Cabo Rojo, Coamo, Dorado, Juana Díaz, Las Marías y Santa Isabel. La incidencia del EC en el presente monitoreo fue de 7.0%. En muestras negativas para *Ca. L. asiaticus*, se identificó mediante serología la presencia del Virus de la Tristeza y la Clorosis Variegada de los Cítricos afectando los huertos de Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, Ciales, Dorado, Isabela y Villaba. La detección periódica de la presencia de la bacteria en los huertos comerciales, el control del vector y la eliminación de árboles infectados con EC deberá implementarse para asegurar la producción de cítricos en la Isla.

Palabras claves: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), deficiencias nutricionales, distribución espacial.

# CHAPTER 1

## SPREAD OF CITRUS GREENING IN PUERTO RICO

### ABSTRACT

Citrus Greening (CG) is one of the most devastating diseases of citrus worldwide, debilitating the productive capacity of citrus trees. In 2009, CG was identified in Puerto Rico from *Citrus sinensis* samples in Isabela. The causal agent was *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a phloem-limited bacterium. *Ca. L. asiaticus* is transmitted by the psyllid *Diaphorina citri*, found in Puerto Rico in 2001. A survey was conducted from February 2011 to March 2012 in the major citrus producing areas of the island for the detection of CG disease. Twenty orchards and seven commercial nurseries located in 21 municipalities were sampled. Symptomatic and asymptomatic plants were collected and processed at the Plant Disease Clinic in the Agricultural Experiment Station (AES) of Juana Díaz. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed on DNA extracted from midribs using primers OI1 and OI2. The 16S rDNA gene from the bacterium *Ca. L. asiaticus* was detected in 7% of the samples (n=345) in the municipalities of Adjuntas, Añasco, Cabo Rojo, Coamo, Dorado, Juana Diaz, Las Marias and Santa Isabel. Tristeza Virus (CTV) and Variegated Chlorosis (CVC) were identified by serological tests in *Ca. L. asiaticus* negative samples. CTV and CVC were affecting orchards in Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, Ciales, Dorado, Isabela and Villaba. Regular screening of *Ca. L. asiaticus* in commercial orchards and nurseries, vector control strategies and removal of CG infected trees should be implemented to protect citrus production in the Island.

Keywords: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Polymerase Chain Reaction (PCR), nutritional deficiencies, spatial distribution.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

El Enverdecimiento de los Cítricos (EC) es causado por una bacteria fastidiosa alojada en los tubos cribosos del floema de las plantas infectadas. Se han identificado tres especies del patógeno: *Ca. L. africanus*, *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus*, este último se encuentra presente en Brasil (Bové, 2006). Las bacterias son transmitidas por dos insectos vectores, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* en Asia y América, y el psílido africano de los cítricos *Trioza erytrae*. El EC es una enfermedad destructiva de los cítricos a nivel mundial debido a su severidad, pérdidas que ocasiona y su difícil control (Bové, 2006; Brlansky y Rogers, 2007; Callaway, 2008; Gottwald et al., 2007; Stokstad, 2006).

Los síntomas comienzan a aparecer en otras ramas de la planta, llegando a tomar toda la copa, inclusive las puntas pueden llegar a secarse y morir. También se afecta el desarrollo del sistema radicular, en el floema se observan lesiones necróticas, acumulación de almidón y efecto sinérgico con otras enfermedades, caída prematura de los frutos, deformación y asimetría de los mismos (Irey et al., 2006). En las etapas avanzadas del EC pueden observarse hojas de color amarillo pálido con áreas de color verde irregulares (moteado) asimétricas, defoliación, engrosamiento y aclaración de las nervaduras (Alemán et al., 2007). A veces puede confundirse con deficiencias minerales (zinc, hierro, magnesio, calcio y cobre) u otras enfermedades como la gomosis, pudrición de raíz, Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) y la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC). Cuando la enfermedad progresa, hay una intensa defoliación de las ramas afectadas y caída de los frutos (Bové, 2006).

En Puerto Rico, el EC fue detectado en el 2009 a partir de muestras provenientes de un huerto de naranja en la Estación Experimental Agrícola de Isabela (Estévez de Jensen et al., 2009). Posteriormente se identificó en huertos comerciales en las localidades de Castañer, Yahuecas (Adjuntas), y Juana Díaz (Estévez de Jensen et al., 2010). La presencia de esta enfermedad en la Isla es sin duda una gran amenaza para la producción de cítricos, uno de los principales frutales de acuerdo al ingreso bruto agrícola en Puerto Rico (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2008).

El manejo de la enfermedad no es solamente difícil, si no también costoso, y hasta el momento no hay un tratamiento disponible para los árboles infectados. La naturaleza no

específica de los síntomas y la distribución desigual del patógeno en la planta, son factores que limitan el diagnóstico adecuado y oportuno de la enfermedad (Li et al., 2007).

Aproximadamente 100 millones de árboles con EC han sido erradicados en Asia, y un millón de árboles más se han eliminado en Brasil desde el primer reporte de la enfermedad en el 2004 (Gottwald et al. 2007). En los Estados Unidos, el EC fue identificado por primera vez en Agosto de 2005 al sur de la Florida, siete años después de la introducción de su vector *D. citri* (Sutton et al., 2005). Desde entonces, el EC se ha diseminado por todo el estado de Florida, y además, se ha reportado en Luisiana, Carolina del Sur, California, Texas, Arizona y Georgia (USDA, 2011).

La identificación del EC en la Isla a nivel de campo se dificulta debido a la presencia de deficiencias nutricionales y de otras enfermedades que afectan el sistema vascular y por lo tanto ocasionan síntomas similares, tales como el CTV (Yokomi et al., 1996) y la CVC (Zapata et al., 2011). La producción de plantas de cítricos en los viveros de Puerto Rico no cuenta con un sistema de verificación de la sanidad de las plantas y el peligro de propagación de enfermedades se mantiene.

Los monitoreos constantes en las zonas productoras y la certificación de material a nivel de vivero son parte fundamental del manejo integrado del EC. Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Detectar la presencia del EC mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en las principales zonas productoras de Puerto Rico, 2) Identificar las áreas libres de la enfermedad, 3) Evaluar la presencia del EC en materiales de propagación de cítricos a nivel de vivero. Los resultados obtenidos reflejan la situación actual del EC tres años después de su introducción a Puerto Rico, y contribuyen con información valiosa que debe ser tomada en cuenta en el momento de tomar decisiones encaminadas a asegurar la producción de cítricos en la Isla.

## 1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.2.1. El Enverdecimiento de los Cítricos a nivel mundial

La primera descripción de síntomas relacionados con el EC fue en la década de 1700 en el centro de la India, en donde se le dio el nombre de “muerte regresiva de los cítricos” (Capoor, 1963). Sin embargo, la mejor descripción temprana de la enfermedad fue la de Husain y Nath (1927), quienes reportaron un declinamiento y muerte de cítricos en Punjad (India) ocasionado por los daños de los psílidos que se alimentaban de las hojas y peciolos de los árboles. Este trabajo fue el primer reporte del psílido Asiático de los Cítricos (*D. citri*) asociado con esta sintomatología, hoy reconocido como el insecto vector más importante del EC en Asia y América (Gottwald, 2010).

Posteriormente hubo varios reportes similares desde el sur de China en el distrito de Chaoshan (provincia de Guangdong), donde Lin (1956) describió la enfermedad como un agente transmisible y le dio el nombre de “Huanglongbing”, término que hace referencia a los brotes cloróticos y follaje moteado observado durante la primavera y el otoño. Por lo tanto, es probable que el EC se haya establecido en la India antes de extenderse a China. Un trastorno similar fue reportado por los agricultores de cítricos de Sudáfrica en 1929 (Oberholzer et al., 1965), y es en el noreste de Sudáfrica donde los investigadores comenzaron a llamarlo “enverdecimiento” debido al poco desarrollo de color en el extremo estilar de los frutos afectados (Van der Merwe y Andersen, 1937).

El insecto vector, *D. citri*, ha estado presente en Brasil desde hace más de 60 años (Halbert y Núñez, 2004) y desde entonces se ha diseminado a otros países de América del Sur y Central y en el Caribe. La enfermedad se reportó por primera vez en América en los estados de Sao Paulo y Minas Gerais en Brasil en el 2004 y en Florida, Estados Unidos en el 2005 (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Tanto en Brasil como en Florida, la enfermedad se ha propagado rápidamente a través de plantaciones de cítricos comerciales y residenciales. Actualmente, el EC es considerado el principal problema fitosanitario de cítricos en Asia, África, el Caribe y América Central (Gottwald, 2010) y en los estados de Florida, Luisiana, Carolina del Sur, California, Texas, Arizona y Georgia en Estados Unidos (USDA, 2011).

A nivel mundial, se estima que el EC ha destruido más de 60 millones de árboles (Das et al., 2007). En Sudáfrica los daños alcanzan hasta un 100% de pérdidas de la cosecha (Alemán et al., 2007). En Tailandia, los árboles infectados mueren y disminuyen su producción después de cinco a seis años de ser plantados y después de 10 años las pérdidas sobrepasaron los \$8,000 US dólares/Ha (Roistacher, 1996).

En Bali, cuatro millones de árboles fueron erradicados desde 1986 hasta 1988 y reemplazados con mandarinas en 1991. Sin embargo, para 1993, 40% de estos árboles fueron infectados y en 1996 más del 90% mostraron síntomas de EC, por lo que fueron erradicados de nuevo (Aubert, 1993). Brasil y Estados Unidos son los países en donde esta enfermedad ha causado las pérdidas más grandes, pues se han eliminado más de cinco millones de árboles con síntomas de EC. Además, los costos que genera las aplicaciones contra el vector superan los \$279 US dólares/Ha (Ayres y Yamamoto, 2007).

### **1.2.2. Sintomatología**

Durante su alimentación, *Diaphorina citri* causa un daño directo al extraer grandes cantidades de savia y producir abundante miel de rocío que cubre la superficie de la hoja y sirve de sustrato para el crecimiento de hongos causantes de la fumagina. También inyecta toxinas a la planta, que detienen el crecimiento de los brotes y deforman las hojas (Michaud, 2004). Una sola ninfa alimentándose por menos de 24 horas es capaz de provocar una malformación de la hoja tanto joven como madura. En el huerto, con frecuencia las infestaciones iniciales del psílido ocurren localizadas en determinados árboles de cítricos. Los árboles maduros suelen tolerar los daños debido a que la pérdida de hojas es mínima si se le compara con el tamaño de la copa (Alemán et al., 2007).

Sin embargo, el principal daño ocasionado por *D. citri* es la transmisión de las bacterias *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus*, responsables del EC en Asia y América. Entre los síntomas característicos del EC se encuentran brotes amarillos a un solo lado del árbol y hojas con manchas cloróticas de bordes difusos que no guardan simetría a ambos lados del nervio central (moteado difuso asimétrico o “blotchy mottle”). Las plantas afectadas también pueden presentar una fuerte defoliación, hojas nuevas de menor tamaño con síntomas de deficiencias minerales, tales como zinc y manganeso (Irey et al., 2006). Los frutos suelen ser pequeños, asimétricos y a

veces muestran inversión de color o moteado difuso con el pedúnculo hundido y de color naranja. Al hacer cortes transversales, se puede observar la nervadura de color amarillo intenso, la columnela torcida y semillas abortadas de color marrón. Los árboles de plantaciones jóvenes presentan reducción de tamaño, porte esparcido y abundantes ramas secas (Bové, 2006).

En las plantas adultas, los síntomas se localizan en las partes jóvenes. Las plantas infestadas pueden manifestar defoliación severa, seguida de brotación irregular y floración fuera de época y en caso de infecciones muy severas, ocurre la muerte regresiva de la planta (Bové, 2006). Internamente puede observarse diferencia de maduración y aborto de semillas, desviación del eje y amarillamiento de las venas. La parte blanca de la cáscara (albedo) en algunos casos se presenta con un espesor mayor de lo normal. En un corte longitudinal del fruto, se observa una coloración amarilla anaranjada en los filamentos de la columela, tienen elevada acidez, baja proporción de jugo y bajo contenido de azúcar, por lo que resultan no aptos para el consumo (Alemán et al., 2007).

### **1.2.3. Agente causal**

El Enverdecimiento de los Cítricos está asociado con tres especies de bacterias Gram negativas, no cultivables del género *Candidatus Liberibacter*, pertenecientes al grupo de las  $\alpha$ -Proteobacterias (Jagoueix et al., 1994), *Ca. L. asiaticus* en Asia, *Ca. L. africanus* en África y *Ca. L. americanus* en Brasil (Teixeira, 2005). *Ca. L. asiaticus* posee un amplio rango de hospederos y puede infectar, aunque no necesariamente causar enfermedad, a la gran mayoría de rutáceas y algunas especies de solanáceas (Halbert y Manjunath 2004).

Duan et al. (2009) obtuvieron la secuenciación completa del genoma de *Ca. L. asiaticus* a través de metagenómica, usando técnicas como pyrosecuenciación 454 y amplificación de desplazamiento múltiple (Dean et al., 2002). Este es el primer genoma secuenciado de una  $\alpha$ -Proteobacteria no cultivable que actúa como patógeno intracelular de plantas y como simbiote de insectos. El agente causal del EC posee características genéticas propias de un parásito intracelular, tales como un genoma pequeño (1.23 Mb), un bajo contenido de GC (36.5%) y una significativa reducción del genoma, comparado con miembros de la familia Rhizobiaceae (Moran, 2002).

El estudio de Duan et al. (2009) a cerca del genoma de *Ca. L. asiaticus* también reportó un alto porcentaje de genes implicados en la motilidad celular (4.5%) y transporte activo en general (8.0%), lo cual puede contribuir a su virulencia. De acuerdo con su naturaleza intracelular, *Ca. L. asiaticus* carece del sistema de secreción tipo III y IV, y de enzimas de degradación extracelular (Felix et al., 2008; Munkvold et al., 2008). Sin embargo, *Ca. L. asiaticus* posee todos los genes del sistema de secreción tipo I, necesarios para el transporte y secreción de toxinas (Reddy et al., 2007).

#### 1.2.4. Vector

El psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) es el responsable de la transmisión de *Candidatus Liberibacter* spp. en Asia y América (Halbert y Manjunath 2004), mientras que en África el vector del EC es *Trioza erytreae* (Bové 2006). *Trioza erytreae* se adapta a climas fríos, es sensible al calor y al clima seco, las condiciones óptimas para su desarrollo se encuentran entre los 500 y 600 msnm. En contraste, *D. citri* tiene una mayor distribución a nivel mundial, se caracteriza por un corto periodo de vida y por una alta fecundidad (Ramos-Méndez, 2008). Es importante mencionar que estos insectos pueden ser encontrados en otros hospederos diferentes a *Citrus* spp. (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Hospederos de *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri* (Mukhopadhyay, 2004).

Naturaleza del hospedero	<i>D. citri</i>	<i>T. erytreae</i>
Hospedero preferido	<i>Murraya paniculata</i>	<i>Clausena anisata</i>
	<i>Citrus aurantiifolia</i>	<i>Vepris lanceolata</i>
		<i>C. limon</i>
		<i>C. medica</i>
Hospedero común		<i>C. aurantiifolia</i>
	<i>C. limon</i>	<i>C. sinensis</i>
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. nobilis</i>
	<i>C. medica</i>	<i>C. reticulata</i>
	<i>C. nobilis</i>	<i>C. deliciosa</i>
	<i>C. reticulata</i>	<i>C. paradisi</i>
	<i>C. deliciosa</i>	<i>C. grandis</i>
	<i>Microcitrus australiana</i>	<i>Murraya paniculata</i>
<i>C. paradisi</i>	<i>Fragara capense</i>	

A principios de 1998 *D. citri* se descubrió en el Caribe, en la isla de Guadalupe (Etienne et al., 2001), y en Florida en junio de 1998, estableciéndose con éxito en toda la península (Peña et al., 2006). También se encuentra en Islas Caimán, en algunas de las islas del archipiélago de las Bahamas, Honduras, Paraguay y Uruguay (Alemán et al., 2007). En Puerto Rico se reportó por primera vez en junio de 2001, en la costa de Isabela y en las montañas de Adjuntas, afectando tanto a *Citrus* sp. como a *Murraya* sp. (Halbert y Núñez, 2004)

Los psílidos vectores transmiten la bacteria del EC de manera persistente no propagativa (se reproduce dentro del insecto pero no se transmite a otras generaciones). *Ca. Liberibacter* spp. se multiplica en la hemolinfa y dentro de las células de las glándulas salivales de los psílidos. El vector pica la planta y transmite la enfermedad. La bacteria circula por el floema y al tapar los vasos floemáticos, impide la circulación de los nutrientes (Alemán et al., 2007; Ramos-Méndez, 2008). Se ha demostrado en algunos experimentos que un tiempo de alimentación de cinco a siete horas es suficiente para adquirir y transmitir el patógeno, mientras que esto no se logra con periodos de uno a tres horas. Los adultos y el cuarto y quinto instar son capaces de transmitir el patógeno por vía de secreción salivar después del periodo de latencia, que varía desde 1-25 días. Las ninfas del primer al tercer instar no transmiten el patógeno (Albert y Manjunath, 2004).

### **1.2.5. Diagnóstico de la enfermedad**

La evaluación visual de síntomas ha sido una herramienta histórica, aunque poco confiable, para el diagnóstico de EC (Miyakawa, 1980). Se han desarrollado sistemas de detección usando microscopía electrónica (Lafleche y Bové, 1970), anticuerpos fluorescentes específicos para EC (Schwarz, 1968) y ensayos de inmunofluorescencia (ELISA) con anticuerpos monoclonales (Garnier et al., 1987).

El contenido de almidón en las hojas afectadas con EC puede ser 20 veces mayor que los árboles controles o sanos (Takushi et al., 2007). Basado en la habilidad del yodo de ligarse o reaccionar con el almidón, resultando en una solución de color azul/violeta (McGrane et al., 1998), los niveles contrastantes de acumulación de almidón en hojas de cítricos han podido ser identificados de manera visual para detectar la presencia de EC en muchas localidades, incluyendo la Florida (Etxeberria et al., 2007; Takushi et al., 2007).

Los métodos de detección basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se desarrollaron a partir de las secuencias 16S de ADN ribosomal y otras regiones del genoma bacteriano (Jagoueix et al., 1996; Hocquellet et al., 1999; Hung et al., 1999). Métodos de detección más sensibles para la confirmación de los síntomas incluyen las técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) (Liao et al., 2004; Li et al., 2006b) y la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Okuda et al., 2005).

La PCR y sus variantes constituyen los métodos más confiables y utilizados a nivel mundial para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, es importante resaltar que la detección del EC presenta algunas limitantes tales como la baja concentración de la bacteria en la planta, su distribución desigual en el hospedero y la naturaleza no específica de los síntomas de la enfermedad. Estas limitantes han dificultado la obtención de resultados consistentes en las áreas afectadas (Li et al., 2007).

#### **1.2.6. Manejo de la enfermedad**

La primera línea de defensa para el EC han sido siempre las cuarentenas, para evitar que la bacteria sea introducida y se establezca (Gottwald, 2010). Sin embargo, el comercio internacional, los viajes y la inmigración cada vez es mayor y la probabilidad de introducción no intencional sigue en aumento. El Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo de Alimentos y la Agricultura (UNDP FAO) llevó a cabo un proyecto multinacional en el Sudeste de Asia para la rehabilitación de cítricos durante los años 1980 y 1990. El objetivo principal era promover una mayor comprensión acerca del EC en el área y desarrollar estrategias prácticas de control de la enfermedad (Aubert, 1990). Una de las contribuciones más importantes de este proyecto fue la elaboración de una estrategia global para el manejo del EC basado en la experiencia de los productores comerciales y los agencias agrícolas, que siguen siendo la piedra angular del control del EC en la actualidad. Las principales recomendaciones resultantes de este proyecto fueron: 1) Control de los psílidos vectores en las plantaciones comerciales mediante insecticidas químicos y, en donde sea posible, a través de control biológico para reducir la transmisión. 2) La eliminación de árboles infectados con EC en las plantaciones comerciales para reducir las fuentes de inóculo. 3) El aislamiento geográfico y los programas de certificación para

la enfermedad de las fuentes de yemas. 4) Producción de vivero de cítricos en el interior de estructuras seguras a prueba de insectos (Aubert, 1990; Gottwald, 2010).

Recientemente, se han desarrollado investigaciones sobre la utilización de compuestos asociados con la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) como el ácido salicílico y fosfitos, combinados con micronutrientes para mantener los árboles infectados con EC en un estado productivo. Sin embargo, en algunos casos, no hubo una diferencia significativa entre los árboles infectados tratados y no tratados en cuanto al declinamiento de árboles, caída de frutos, producción y calidad (Gottwald, 2010).

### **1.2.6.1. Control químico del vector**

El control químico se dirige principalmente hacia el vivero, plantaciones de fomento y plantaciones jóvenes, puesto que los árboles maduros soportan mejor los daños causados por el vector. El insecticida sistémico imidacloprid, ha sido uno de los más empleados recientemente (Alemán et al., 2007; Gottwald, 2010). Lin et al. (1973) describieron que cuando se aplicó el insecticida methomyl o malathion 50% CE asperjado a intervalos de 10 días durante el pico poblacional de *D. citri*, no se encontraron plantas de cítricos afectadas por la enfermedad. Con aplicaciones de monocrotophos 10%, utilizando una brocha en la base de las ramas, se obtuvo un control efectivo del minador de los cítricos, áfidos y *D. citri* sin daño a los enemigos naturales (Huang et al., 1984). El dimethoate se ha empleado contra *D. citri* en huertos con baja tasa de infestación. Los compuestos organofosforados y piretroides también han sido utilizados contra esta plaga (Dahiya et al., 1994).

Muchos insecticidas sintéticos han sido probados contra este psílido, entre los cuales se mencionan endrin, diazinon, parathion, malathion, methyldemeton, thiometon, DDT, dimethoate, phosphamidon, monocrotophos, oxydemeton-methyl, phosalone, quinalphos y phosmet. Sin embargo, generalmente se acepta que los aceites de petróleo son más efectivos contra insectos pequeños e inmóviles, al quedar cubiertos por una fina película de aceite y por tanto morir (Bellis et al., 2005). Se ha observado que los huevos y las ninfas del psílido presentes en los brotes sufren significativa mortalidad cuando se aplica este tipo de producto, aunque la susceptibilidad a los aceites difiere entre los estados de la plaga, con los instares jóvenes más susceptibles, mientras que los huevos son más tolerantes (Rae et al., 1997). El uso de los aceites

tiene una serie de ventajas con respecto a los plaguicidas convencionales. Debido a que son menos agresivos a los enemigos naturales, los insectos no desarrollan resistencia, no resultan tóxicos a los vertebrados y se degradan fácilmente en el ambiente (Bellis et al., 2005), haciendo que su uso sea más sostenible a largo plazo (Rae et al., 1997).

El manejo del EC en Puerto Rico se ha dirigido al control químico del psílido. Los resultados preliminares de la evaluación de diferentes plaguicidas contra el vector *D. citri* indican que imidacloprid, abamectina, spinetoram y permetrina causaron la mayor disminución en los conteos de adultos, y son los más efectivos potencialmente. Abamectina, spinetoram y permetrina resultaron los más efectivos contra los psílicos inmaduros. El efecto de estos plaguicidas varió según el enemigo natural muestreado. Azadirachtina y spirotetramat resultaron con la menor mortalidad de coccinélidos, comparando favorablemente con el control. En contraste, imidacloprid, abamectina y azadirachtina resultaron los productos menos perjudiciales contra el parasitoide *Tamarixia radiata* Waterston (Umpierre et al., 2011).

#### **1.2.6.2. Control biológico del vector**

Se han reportado hongos entomopatógenos del género *Hirsutella* sp. atacando adultos de *D. citri* (Meyer et al., 2007) y *Metarhizium* sp. e *Isaria* sp. parasitando ninfas y adultos con altos porcentajes de mortalidad (Mellín-Rosas et al., 2011). Además, existe una diversidad artrópodos controladores que se alimentan sobre *D. citri*, tales como arácnidos, crisópidos, sírfidos y coccinélidos, destacándose este último grupo entre los depredadores más eficaces. Por otra parte, los parasitoides también ejercen una función primordial en la regulación de las poblaciones del psílido. Las especies asiáticas *T. radiata* y *Diaphorencyrtus aligarhensis* se destacan entre las más efectivas (Vaccaro y Bouvet, 2006) y han sido importadas para emplearlas en programas de control biológico en Estados Unidos (McFarland y Hoy, 2001).

*Tamarixia radiata* ha sido uno de los enemigos naturales de *D. citri* más estudiados desde el punto de vista del control biológico clásico. Se caracteriza por desarrollarse como un ectoparasitoide idiobionte de ninfas de *D. citri*. Las hembras depositan los huevos en la cara ventral de las ninfas de tercero a quinto instar. Cuando la larva del parasitoide eclosiona, succiona la hemolinfa del hospedante y al final de su desarrollo fija los restos del hospedante a la superficie de la planta, lo que le permite aprovechar la protección que este caparazón le ofrece y

realizar el estado de pupa. El tiempo de desarrollo varía desde 17 días a una temperatura de 20°C hasta solamente ocho días a 30°C (Fauvergue y Quilici, 1991).

*Tamarixia radiata* posee partenogénesis de tipo arrenotóquica. En el rango de temperaturas entre 25 y 30°C, la fecundidad es de alrededor de 300 huevos. En condiciones de laboratorio, el número promedio de hospedantes parasitados por una hembra es de 115, con un máximo de 230. Por debajo de 20°C y por encima de 35°C, la fecundidad es baja y el número promedio de pupas producidas por hembras está alrededor de 30. Las hembras muestran preferencia para ovipositar en ninfas del quinto instar (Quilici et al., 1992).

En Isla Reunión conviven las dos especies de psílidos vectores de la enfermedad: *T. erythrae* y *D. citri*. Se encuentran poblaciones muy abundantes de *T. erythrae* en zonas altas, mientras que *D. citri* se localiza fundamentalmente en las regiones secas, cálidas y a altitudes inferiores a los 500 msnm, adoptándose la decisión de introducir enemigos naturales procedentes de la región de origen de estos psílidos. Así en 1978 se logró un control exitoso sobre *T. erythrae* mediante la introducción del parasitoide *Tamarixia dryi* (Waterston) desde Sudáfrica y de *D. citri* con la introducción de *T. radiata* desde la India (Rae et al., 1997). La misma decisión de introducir *T. radiata* para el control del psílido se adoptó en 1999 en otra de las islas francesas (Guadalupe). Para ello, se trasladaron ejemplares desde Isla Reunión, donde los pocos insectos que lograron sobrevivir se liberaron en árboles no tratados químicamente y con alta infestación por *D. citri*. Unos meses después, en algunas zonas se observó un parasitismo de 38% y se realizaron recolectas del parasitoide para su reproducción en condiciones de laboratorio, empleando como planta hospedante a *Murraya paniculata* L. Un año después de haber realizado las liberaciones, *T. radiata* se encontraba en todos los lugares de la isla, con un nivel de colonización total (Etienne et al., 2001).

En Taiwán, se han encontrado tres especies de enemigos naturales asociados al psílido: los depredadores *Chrysopa boninensis* Okamoto y *Menochilus sexmaculatus* y el endoparasitoide *Diaphorencyrtus diaphorinae*. El ectoparasitoide de ninfas *T. radiata* se introdujo a mediados de la década de los 80 desde Isla Reunión y se logró su establecimiento, detectándose 11 hiperparasitoides que lo atacan. Sin embargo, el reservorio de población del psílido se ha mantenido bajo cuando se han hecho liberaciones inoculativas de *T. radiata* en plantas de *Murraya* spp. (Chien et al., 1989).

En un monitoreo de posibles especies controladoras de *D. citri* en Puerto Rico, Pluke y colaboradores (2005) encontraron ocho especies de coccinélidos en áreas de producción cítrica de la Isla y evaluaron su comportamiento alimenticio. Las ocho especies consumieron ninfas *D. citri*, pero *Coleomegilla innotata* Mulsant consumió un mayor número de ninfas por hora comparado a *Chilocorus cacti* L. o *Scymnus* sp. Los ensayos de elección de presa mostraron que *Coelophora inaequalis* F. y *Cycloneda sanguinea limbifer* L. prefirieron como presa al áfido marrón del cítrico *Toxoptera citricida* (vector del CTV) en lugar de *D. citri*, mientras que *C. cacti* prefirió como presa a *D. citri*

### **1.2.6.3. Plantas repelentes**

Un método de control que se encuentra bajo examinación es el uso de plantas repelentes. Los productores vietnamitas en Mekong Delta descubrieron que las plantaciones de cítricos sobreviven por mucho más tiempo cuando se siembran junto con la guayaba (*Psidium guajava*) (Hall et al. 2008). Estudios colaborativos entre Vietnam, Australia y Japón, así como estudios en Indonesia, han mostrado una reducción inicial significativa en las tasas de incremento de la enfermedad en las plantaciones donde los cítricos y las guayabas se siembran intercaladamente en comparación con los monocultivos de cítricos, lo cual se debe aparentemente a la producción de compuestos volátiles por parte de la guayaba que repelen al psílido (Beattie et al., 2006; Hall et al., 2008; Gottwald et al., 2010). Actualmente en Puerto Rico se está realizando un estudio preliminar sobre el efecto de la guayaba sobre las poblaciones de *D. citri* en los brotes de *C. latifolia* de la EEA de Juana Díaz (Umpierre et al., 2011).

### **1.2.6.4. Nutrición de los cítricos**

Bonilla (2002) recomienda un suelo profundo para el cultivo de cítricos para garantizar el anclaje del árbol, una amplia exploración para una buena nutrición y un crecimiento adecuado. Los suelos deben tener una proporción equilibrada de elementos gruesos y finos (textura), para garantizar una buena aireación y facilitar el paso de agua, además de proporcionar una estructura que mantenga un buen estado de humedad y una buena capacidad de cambio catiónico. En cuanto a las podas, Ferro (2001) establece que deben estar dirigidas a desarrollar una copa

vigorosa, equilibrada, abundante y uniforme que permita obtener y estabilizar una alta producción.

Los cítricos requieren de un pH de 6-7. En caso de tener valores fuera de este rango, se deben hacer aplicaciones de micronutrientes. La salinidad total del suelo debe ser menor de 1280 ppm y la conductividad del suelo menor de 2.5 miliequivalentes/litro (Bonilla, 2002). Además de las características químicas recomendadas del suelo, el cultivo debe mantenerse libre de malezas, ya que compiten por nutrientes, son hospederas de patógenos y dificultan otras labores del cultivo (Ferro, 2001).

El boro (B), zinc (Zn) y manganeso (Mn) son los micronutrientes más importantes para la producción de cítricos y los síntomas visuales de estas deficiencias son los más frecuentes (Quaggio et al., 2005; Mattos-Junior et al., 2005). La deficiencia de B es cada vez más común en los cítricos debido a la baja disponibilidad del nutriente en el suelo por efecto de condiciones climáticas que reducen la absorción de este nutriente (prolongada sequía o exceso de lluvia). Las plantas de cítricos con deficiencia de Zn tienen pocos brotes, con aspecto viejo y sin vigor y además, el crecimiento del dosel y producción se reducen. La deficiencia de Mn también es común en huertos de cítricos, pero solamente en condiciones severas puede reducir el rendimiento de las plantas (Boaretto et al., 2008; Mattos-Junior et al., 2005).

## **1.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

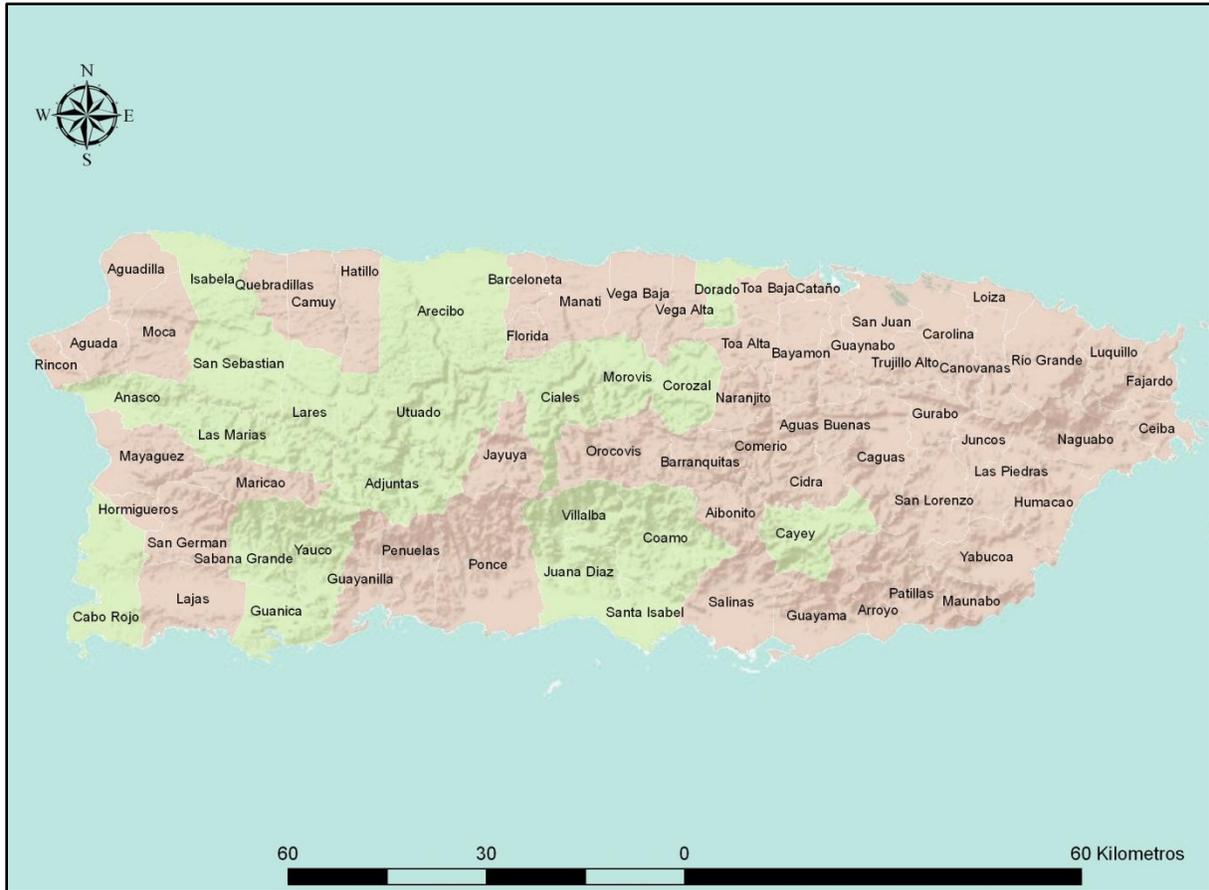
### **1.3.1. Recolección de muestras**

Durante febrero de 2011 hasta marzo de 2012 se realizó un monitoreo en las áreas productoras de cítricos en Puerto Rico, localizadas en la zona central montañosa, costa sur, norte y noroeste de la Isla. Se visitaron 20 huertos localizados en Adjuntas, Añasco, Arecibo, Cayey, Ciales, Coamo, Corozal, Dorado, Guánica, Isabela, Juana Díaz, Lares, Las Marías, Morovis, Sabana Grande, San Sebastián, Utuado, Villalba y Yauco. Los muestreos también incluyeron siete viveros localizados en los municipios de Adjuntas, Cabo Rojo, Ciales, Corozal, Isabela, Las Marías y Santa Isabel (Figura 1.1). Las fechas de muestreo, georeferenciación de localidades y hospederos se describen en detalle en las Tablas 1.2 y 1.5 (Apéndice 1.1).

Las visitas a los huertos de Añasco, Arecibo, Dorado, Lares, Morovis, Utuado, Villalba y al vivero de Santa Isabel, se realizaron en colaboración con la División de Control de Plagas y Enfermedades del Departamento de Agricultura de Puerto Rico.

En cada huerto o vivero se recolectaron cinco muestras sintomáticas desde las ramas de la parte media del árbol. Los síntomas buscados fueron amarillamiento de las hojas con áreas de color verde, moteado, engrosamiento y aclaramiento de las nervaduras centrales, defoliación o caída de frutos y árboles con crecimiento reducido. Las cinco muestras asintomáticas fueron colectadas en cada huerto desde las ramas de la parte central de árboles de buen tamaño, con ramas verdes y sin defoliación. Las hojas asintomáticas no presentaban deformaciones y/o amarillamiento.

Las muestras fueron depositadas en una bolsa plástica individual y se identificaron con su respectivo código. Después de cada visita a los huertos o viveros, las bolsas fueron transportadas en nevera hasta el Laboratorio de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz donde fueron preparadas para llevar a cabo la extracción de ADN. Se realizó un registro fotográfico de cada una y cuando se tomó la cantidad necesaria para la extracción de ADN, las hojas fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 1.1.** Municipios muestreados durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en Puerto Rico.

**Tabla 1.2.** Georeferenciación de las zonas de muestreo para la identificación del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico.

<b>Municipio</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
Adjuntas	18° 10.524' N	66° 47.911' O	561
	18° 12.354' N	66° 49.780' O	485
Añasco	18° 18.145' N	67° 03.680' O	239
Arecibo	18° 24.453' N	66° 35.612' O	157
Cabo Rojo	18° 04.170' N	67° 08.896' O	31
Cayey	18° 14.002' N	66° 06.928' O	716
Ciales	18° 17.603' N	66° 32.152' O	311
Coamo	18° 01.783' N	66° 21.498' O	80
Corozal	18° 20.356' N	66° 19.630' O	123
Dorado	18° 02.006' N	66° 31.856' O	3
Guánica	18° 26.318' N	66° 17.535' O	10
Isabela	18° 27.938' N	67° 03.146' O	153
Juana Díaz	18° 02.006' N	66° 31.856' O	28
Lares	18° 16.891' N	66° 52.649' O	441
Las Marías	18° 13.040' N	66° 56.475' O	218
Morovis	18° 33.990' N	60° 41.008' O	287
Sabana Grande	18° 05.033' N	66° 57.417' O	126
San Sebastián	18° 20.567' N	66° 59.683' O	69
Santa Isabel	17° 99.462' N	66° 36.905' O	21
Utua	18° 18.512' N	66° 35.103' O	283
Villalba	18° 16.401' N	66° 50.507' O	295
Yauco	18° 08.981' N	66° 49.036' O	866

### 1.3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), según las instrucciones del fabricante. Inicialmente, se cortaron pequeños fragmentos del peciolo y nervadura central de los folíolos (aproximadamente 100 mg) y se maceró la muestra en el Mini-bead beater (1247W Cell Dis -BioSpec) por cinco minutos. Una vez el tejido estaba triturado, se adicionaron 400 µl del buffer AP1 y 4 µl de RNase, se diluyeron homogéneamente en un vórtex durante 20 segundos. La solución se incubó a 65°C durante una hora y cada 15 minutos se sacó del baño maría para ser agitado nuevamente en el vortex. Después del periodo de incubación, se centrifugó a 13,500 rpm durante dos minutos y 200 µl de la solución se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, al cual se le adicionó 130 µl del buffer AP2. Posteriormente se invirtieron los tubos de 2-5 veces y se sometieron a una temperatura de -20°C durante cinco minutos.

La muestra con el ADN ya precipitado, se centrifugó a 13,500 rpm durante cinco minutos. El contenido de estos tubos se depositó en la columna morada y se centrifugó de nuevo a 13,500 rpm durante dos minutos. A partir del tubo colector de esta columna se tomó 200 µl y se depositó en la columna transparente. Se agregó 300 µl del buffer AP3/E a esta solución, se mezcló con la pipeta y se centrifugó a 13500 rpm durante dos minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con 500 µl del buffer AW y se centrifugó a 13,500 rpm durante dos minutos en cada ocasión. Finalmente, la columna transparente se depositó en un tubo colector nuevo y el ADN se resuspendió en 60 µl del buffer AE y se utilizó 5 µl para la amplificación con los iniciadores específicos. El ADN obtenido a partir del tejido de los cítricos procesados se almacenó en tubos Eppendorf a -80°C.

### 1.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de *Ca. L. asiaticus* se realizó amplificando fragmentos de la región 16S del ADN ribosomal por medio de la técnica de PCR. Para esto se utilizó una reacción de 25 µl con el Master Mix Go Green Tag (Promega, Madison, WI) y los iniciadores OI1 (5'CGCCGTATGCAATACGAGCGGCA3') y OI2 (5'GCCTCGCGACTTCGCAACCC AT 3'), reportados como específicos para *Ca. L. asiaticus* (Gottwald et al. 1989; Jagoueix et al., 1996; Li

et al., 2007). Los controles positivos utilizados en cada reacción consistieron de muestras infectadas con EC provenientes del huerto de *Citrus latifolia* Tanaka de la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Juana Díaz (Tabla 1.5, Apéndice 1.1). La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador T-3000 (Biometra®) utilizando un perfil que consistió en una denaturalización inicial a 94°C por dos minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por un minuto (Li et al., 2007).

Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). Se realizó una electroforesis a 100 V durante 40 minutos, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con un marcador de peso molecular de 1 Kb (Sigma, St. Louis, USA).

#### **1.3.4. Purificación de producto de PCR**

Los productos de PCR de las muestras enviadas a secuenciar fueron purificados con el kit QIAquick PCR Purification KIT Protocol (QIAGEN Cat. No. 28104) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adicionó cinco volúmenes del buffer PB a un volumen del PCR y se depositó en la columna morada incluida en el kit. Posteriormente, la mezcla se centrifugó por un minuto a 13000 rpm y el precipitado en el tubo colector se descartó. El producto se lavó con 750 µL del buffer PE y se centrifugó por un minuto a 13,000 rpm. Una vez se descartó lo del tubo colector, se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. La columna se colocó en un tubo nuevo y el producto se resuspendió en 30 µL del buffer EB.

#### **1.3.5. Secuenciación**

Para la secuenciación del producto de PCR purificado, se envió 20 µL a MacroGen Inc. en Rockville, Maryland, Estados Unidos. Las secuencias de la región 16S del ADN ribosomal fueron editadas y alineadas utilizando el programa BioEdit, Sequence Alignment Editor (versión 7.0.4.1) y posteriormente se realizó una búsqueda de homología en el Banco de Genes (GenBank: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante la herramienta BLASTn, para confirmar la

identidad de las mismas. Cada una de las secuencias se publicó en la base de datos del GenBank, en donde se les asignó su respectivo número de acceso (Tabla 1.4).

### **1.3.6. Distribución espacial del EC en Puerto Rico**

Los resultados de presencia o ausencia de la bacteria *Ca. L. asiaticus* en los huertos muestreados fueron analizadas mediante el modelo de probabilidad de Bernoulli (Kulldorff, 1997), donde la variable *caso* representa las muestras en las que se detectó la bacteria mediante PCR y todo el conjunto de muestras corresponde a la población analizada.

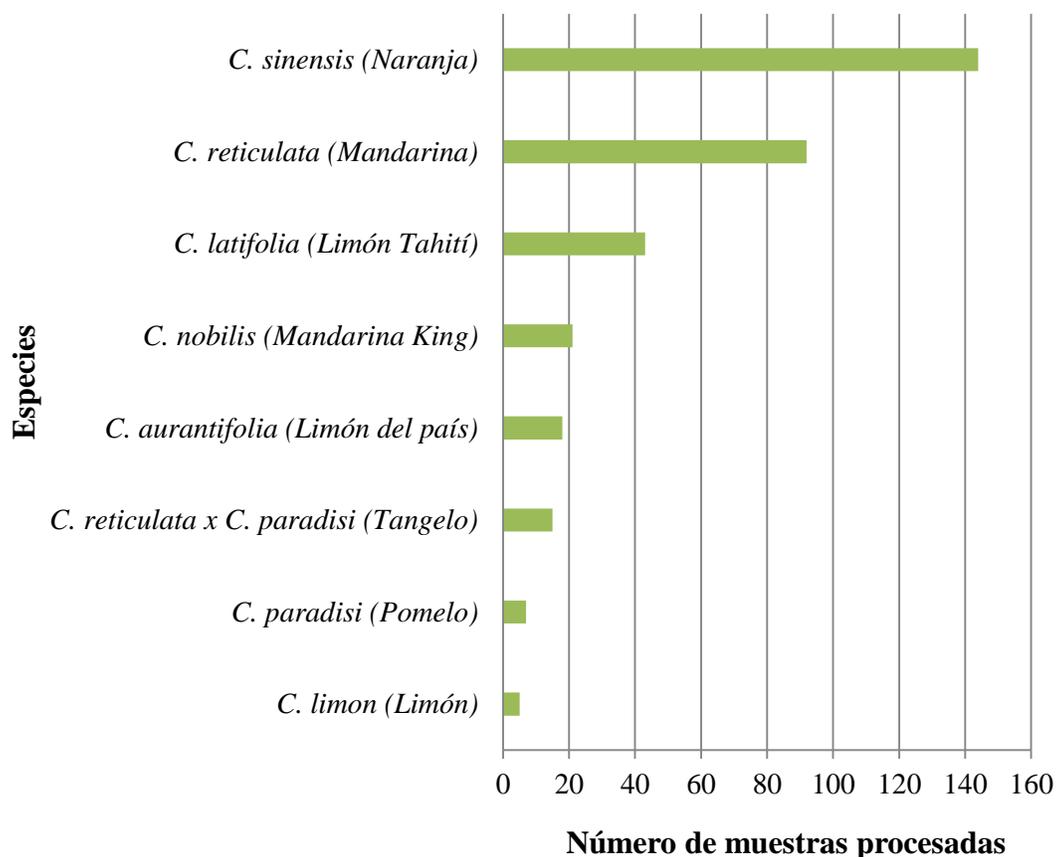
Este modelo probabilístico permitió la identificación de conglomerados espaciales de la enfermedad y determinar si existen diferencias en el riesgo relativo de infección en las zonas de estudio. Para esto, se utilizó el software SatScan™ versión 9.1.1. (Kulldorf, 2009) en donde se ingresaron las coordenadas geográficas de cada una de las zonas de muestreo, el número de casos y la población (*controles*). El modelo de Bernoulli se replicó 999 veces según el método de Monte Carlo, para generar inferencias estadísticas (Kulldorff, 1997).

Los mapas se generaron mediante un Sistema de Información Geográfica (S.I.G.), utilizando el software ArcMap10.0. Las coberturas de topografía y limitaciones municipales fueron obtenidas de: <http://gis.otg.gobierno.pr/> (Consultado: Agosto de 2012). Los conglomerados primario y secundario fueron realizados utilizando la coordenada y el radio de riesgo relativo de infección que resultó del análisis probabilístico. La herramienta utilizada para mostrar los radios fue *Símbolos Proporcionales*.

## 1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.4.1. Recolección de muestras

Durante el monitoreo se recolectaron y procesaron un total de 345 muestras en 21 municipios de la Isla (Tabla 1.3), pertenecientes a ocho especies de cítricos (Figura 1.2). Las naranjas (42%), mandarinas (27%) y el limón Tahití (12%) fueron los cítricos más abundantes en los sitios muestreados, mientras que los pomelos (2%) y el limón común (1%) fueron las especies menos encontradas. Se visitaron 20 productores en la zona central montañosa, costa sur, norte y noroeste de la Isla (Figura 1.1). El tamaño de los huertos muestreados varió entre una y 235 hectáreas.



**Figura 1.2.** Distribución del total de muestras procesadas entre las ocho especies de *Citrus* spp. colectadas durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en Puerto Rico.

**Tabla 1.3.** Número de muestras colectadas en los 21 localidades visitadas durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico.

<b>Localidad</b>	<b>Especie Hospedera</b>	<b>Número de muestras</b>
Isabela	<i>C. sinensis</i>	5
	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	1
	<i>C. latifolia</i>	4
Ciales	<i>C. reticulata</i>	2
	<i>C. sinensis</i>	5
	<i>C. latifolia</i>	3
Juana Díaz	<i>C. latifolia</i>	5
Adjuntas	<i>C. sinensis</i>	30
	<i>C. reticulata</i>	10
	<i>C. latifolia</i>	7
	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	7
Guánica	<i>C. sinensis</i>	5
	<i>C. latifolia</i>	10
Coamo	<i>C. aurantifolia</i>	5
Corozal	<i>C. reticulata</i>	4
	<i>C. latifolia</i>	1
	<i>C. paradisi</i>	2
	<i>C. sinensis</i>	12
	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	2
Yauco	<i>C. sinensis</i>	11
Santa Isabel	<i>C. sinensis</i>	10
Ciales	<i>C. sinensis</i>	7
	<i>C. reticulata</i>	6
Las Marías	<i>C. nobilis</i>	5
	<i>C. sinensis</i>	5
	<i>C. reticulata</i>	14
	<i>C. latifolia</i>	10
	<i>C. paradisi</i>	1
Cabo Rojo	<i>C. nobilis</i>	15
	<i>C. sinensis</i>	2
	<i>C. reticulata</i>	11
	<i>C. latifolia</i>	5
	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	7
	<i>C. paradisi</i>	1
	<i>C. limon</i>	5
Utuado	<i>C. reticulata</i>	8
	<i>C. nobilis</i>	1
	<i>C. sinensis</i>	11

**Tabla 1.3.** Número de muestras colectadas en los 21 localidades visitadas durante el monitoreo del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico (continuación).

<b>Localidad</b>	<b>Especie Hospedera</b>	<b>Número de muestras</b>
Sabana Grande	<i>C. sinensis</i>	7
	<i>C. reticulata</i>	4
San Sebastián	<i>C. sinensis</i>	10
Lares	<i>C. sinensis</i>	1
	<i>C. reticulata</i>	1
	<i>C. paradisi</i>	1
Morovis	<i>C. paradisi</i>	2
Cayey	<i>C. reticulata</i>	2
Dorado	<i>C. reticulata</i>	10
	<i>C. sinensis</i>	4
	<i>C. aurantifolia</i>	13
Arecibo	<i>C. reticulata</i>	10
	<i>C. sinensis</i>	10
Villalba	<i>C. reticulata</i>	5
Añasco	<i>C. sinensis</i>	10
<b>Total de muestras recolectadas</b>		<b>345</b>

La edad promedio de las plantas en los viveros de Adjuntas, Cabo Rojo, Ciales, Corozal, Las Marías y Santa Isabel fue de cinco a nueve meses. Los síntomas observados en las muestras de naranja, mandarina y limón colectadas en estos viveros fueron hojas con amarillamiento alrededor de las márgenes y el área intervenal, generalmente asociados con deficiencias de magnesio y zinc en los cítricos (Whiteside et al., 1993). Las hojas también presentaron márgenes difusos, moteado y aclaramiento de la nervadura central. En la Figura 1.3A se observa los síntomas de amarillamiento y moteado en hojas de naranja colectadas en el vivero de Santa Isabel.

En el vivero de la EEA de Isabela, las plantas de cítricos con aproximadamente cuatro años de edad, se mantienen bajo una estructura cerrada a prueba de insectos vectores. Los síntomas de las muestras colectadas en este vivero incluyeron amarillamiento del tejido localizado entre las venas foliares y hojas pequeñas con márgenes difusos. De acuerdo con Mattos-Junior et al. (2005), estas características pueden estar asociadas a deficiencias de zinc.

En el huerto de limón Tahití de la EEA de Isabela con aproximadamente 72 árboles, se observó amarillamiento de brotes y defoliación. En el 2009, se reportó por primera vez la presencia de *Ca. L. asiaticus* en Puerto Rico en muestras de naranja provenientes de esta estación experimental (Estévez de Jensen et al., 2009). En el huerto de mandarina y naranja ubicado en el barrio Santa Ana de Sabana Grande se observaron árboles de ocho años de edad con brotes amarillos, caída prematura de frutos, defoliación (Figura 1.4C) y presencia de árboles secos. La muestra de naranja EC382 colectada en este huerto presentó hojas cloróticas, aclaramiento y engrosamiento de la nervadura central (Figura 1.3B).

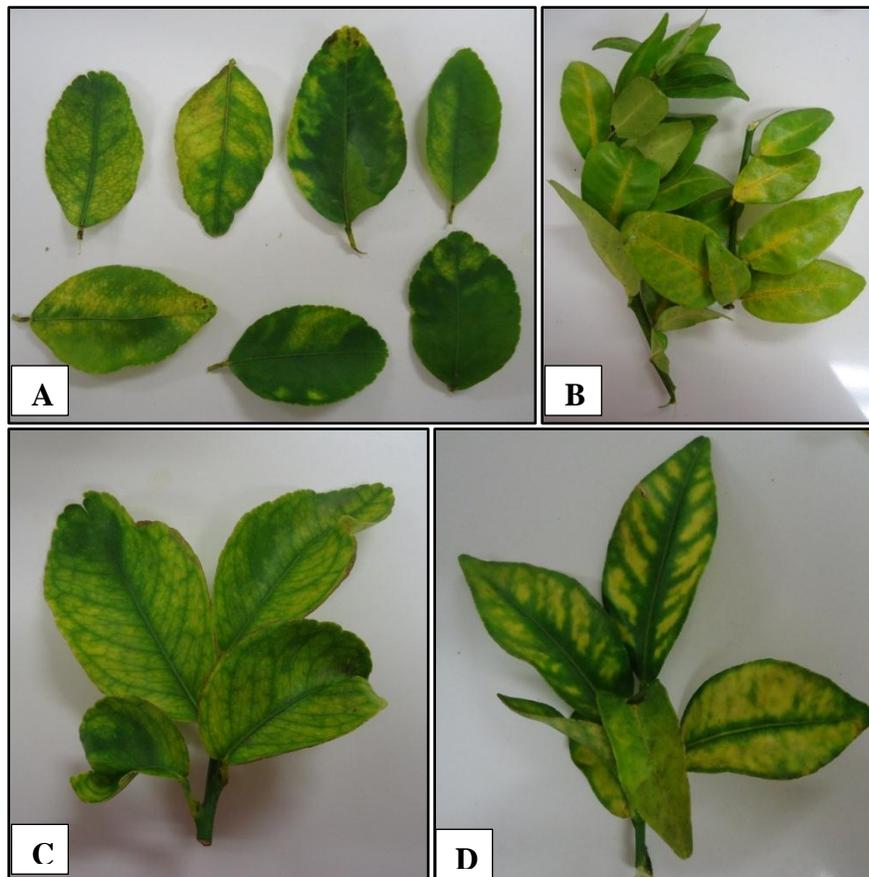
Las muestras colectadas en el huerto de limón Tahití en la EEA de Juana Díaz presentaban hojas deformadas, amarillamiento distribuido asimétricamente en la superficie foliar y engrosamiento de las nervaduras centrales (Figura 1.3C). La presencia de *Ca. L. asiaticus* fue detectada en este huerto en el 2009 (Estévez de Jensen et al., 2010). Más del 50% de los 203 árboles presentan amarillamiento, el 37% caída de ramas y frutos, y aproximadamente el 24% de los árboles murieron (Figura 1.4D). En el huerto de limón (13 hectáreas) en Coamo se observaron brotes amarillos en árboles de ocho años (1.4A) y plantas de cuatro años de edad con crecimiento detenido (Figura 1.4B). En el huerto de mandarina y naranja la EEA de Adjuntas los árboles presentaban hojas cloróticas con aclaramiento y engrosamiento de las nervaduras centrales. El huerto de naranja y mandarina con aproximadamente 600 árboles de la finca Enseñat, en Las Marías, presentaba árboles aparentemente sanos, brotes verdes y frutos normales. En la finca Tanairi en Utuado (6 hectáreas) los cítricos no tenían un buen control de malezas y presentaban síntomas de deficiencia de zinc, magnesio y manganeso.

En la finca visitada en Lares, las hojas de los árboles de mandarina presentaban amarillamiento entre las nervaduras, síntoma similar a una deficiencia de zinc (Figura 1.3D). En las muestras de naranja, limón Tahití y mandarina recolectadas en los huertos de Ciales, Corozal y Yauco se evidenciaron síntomas como clorosis y moteado en las hojas distribuido en forma asimétrica, engrosamiento y aclaramiento de la nervadura central, alargamiento, deformaciones y reducción de tamaño de las hojas.

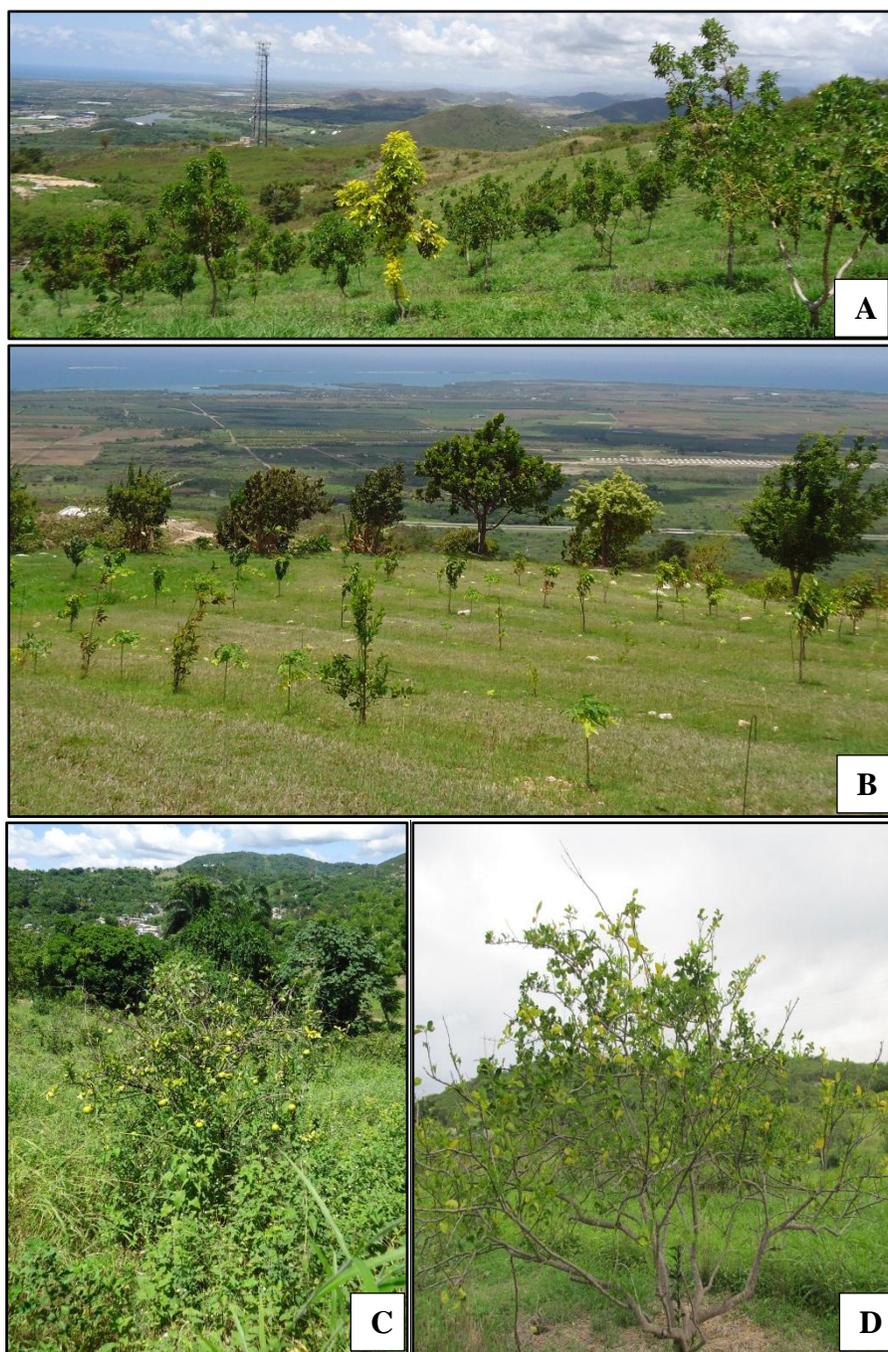
El 75% de los 120 árboles del huerto de mandarina y limón del país muestreado en Dorado presentaban amarillamiento de brotes. En 15 árboles de naranja en Añasco se observaron hojas con moteado asimétrico, brotes amarillos, engrosamiento en la vena central de las hojas y deformación en los frutos. En los huertos de Villalba, Arecibo y San Sebastián se observaron

árboles con brotes amarillos, hojas cloróticas y moteadas y defoliación. En los huertos de Cayey, Morovis y Guánica, los árboles de limón Tahití de aproximadamente siete años de edad presentaban proliferación de brotes amarillos y hojas con moteado asimétrico.

La sintomatología observada en los 20 huertos y siete viveros muestreados corresponde a los síntomas descritos para el EC, donde se realizó un diagnóstico molecular para confirmar la presencia de *Ca. L. asiaticus* (Irey et al. 2006; Bové (2006). El EC puede confundirse con deficiencias de micronutrientes como: zinc, hierro, calcio, magnesio, manganeso y cobre, y con otras enfermedades sistémicas como la Tristeza y la Clorosis Variegada de los Cítricos (Ramos-Méndez, 2008).



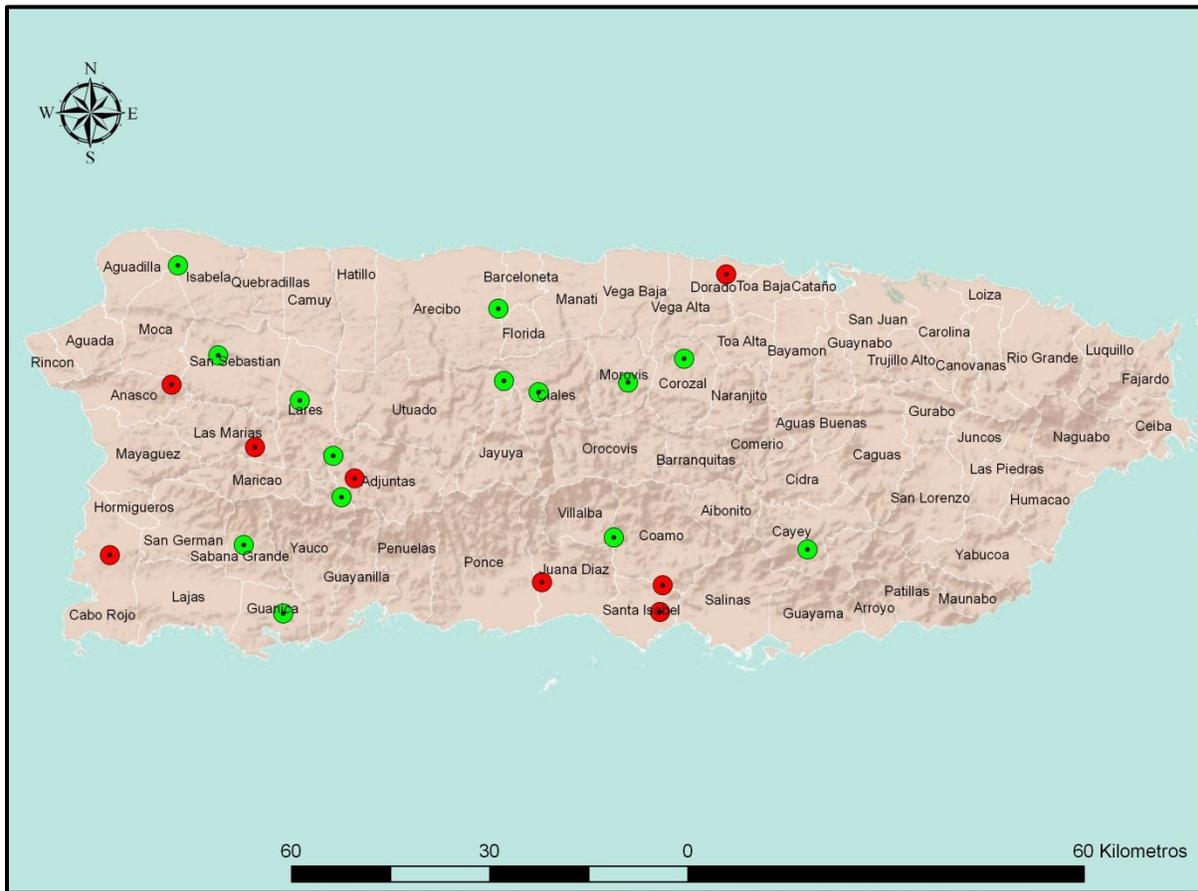
**Figura 1.3.** Síntomas de muestras provenientes de Santa Isabel, Sabana Grande, Juana Díaz y Lares. **(A)** Naranja EC246 con hojas cloróticas y moteado distribuido en forma asimétrica. **(B)** Naranja EC382 con engrosamiento y aclaramiento de la nervadura central. **(C)** Limón Tahití EC609 con clorosis y malformaciones en las hojas. **(D)** Mandarina EC399 con moteado de hojas y engrosamiento de la nervadura central.



**Figura 1.4.** Síntomas observados los huertos de Cítricos en Puerto Rico. **(A)** Proliferación de brotes amarillos en un huerto de limón del país en Coamo. **(B)** Árboles pequeños con amarillamiento en Coamo. **(C)** Caída prematura de frutos en un huerto de naranja en Sabana Grande. **(D)** Brotes amarillos y defoliación en el huerto de limón Tahití de la EEA de Juana Díaz.

### 1.4.2. Detección de *Ca. L. asiaticus* en *Citrus* spp.

*Candidatus* Liberibacter asiaticus se detectó por medio de PCR en 23 de las 345 muestras analizadas (Tabla 1.5, Apéndice 1.1). Las muestras que resultaron positivas fueron colectadas en las localidades de Adjuntas, Añasco, Cabo Rojo, Coamo, Dorado, Juana Díaz, Las Marías y Santa Isabel (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Zonas monitoreadas durante febrero 2011 hasta marzo 2012 en Puerto Rico. Los puntos verdes corresponden a las localidades en las que no se detectó la bacteria. Los puntos rojos representan las localidades en donde se detectó la presencia de *Ca. L. asiaticus*.

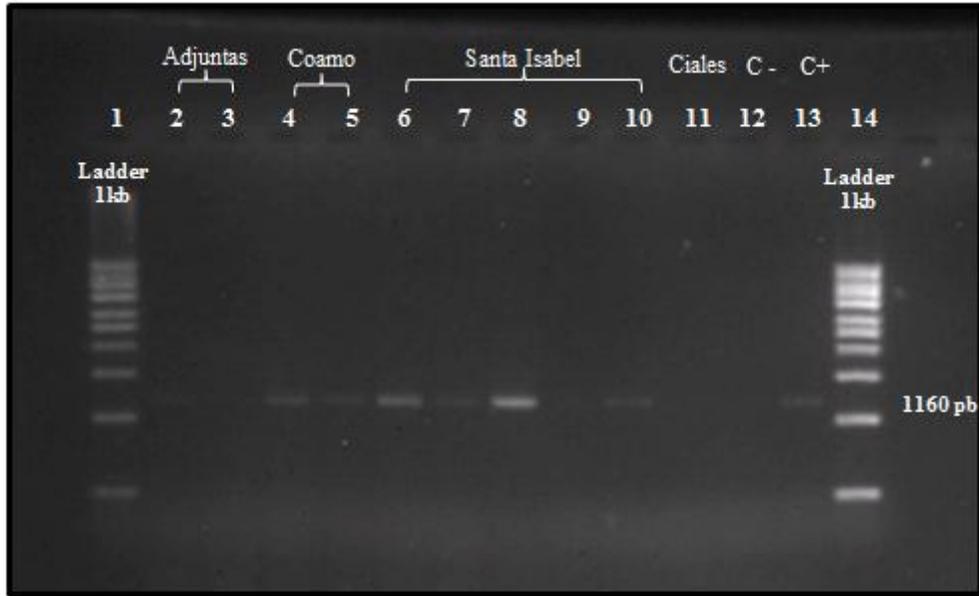
La extracción de ADN se realizó a partir del peciolo y nervadura central de las hojas, en donde se ha reportado la mayor abundancia de la bacteria en árboles afectados con 67,764 y 6,693 células/ $\mu$ g de ADN total, respectivamente (Tatineni et al., 2008). Se utilizó el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, un kit utilizado para extracción de ADN de patógenos a partir de plantas de cítricos (Li et al., 2006a).

Los productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos OI1/OI2 mostraron un fragmento de 1,160 pb (Figuras 1.6, 1.7 y 1.8), correspondiente a la bacteria *Ca. L. asiaticus asiaticus* (Gottwald et al., 1989; Jagoueix et al., 1996; Li et al., 2007). Tres de las cepas positivas fueron secuenciadas y se confirmó la identidad de *Ca. L. asiaticus* mediante una búsqueda de homología en el Banco de Genes, con un porcentaje de cobertura superior al 97%. Las secuencias EC209 (GenBank: JX291536) y EC248 (GenBank: JX291538) mostraron una identidad máxima del 99%, mientras que la secuencia EC241 (GenBank: JX291537) mostró una identidad de 98% con el gen 16S del ARN ribosomal de aislados de *Ca. L. asiaticus* (Tabla 1.4).

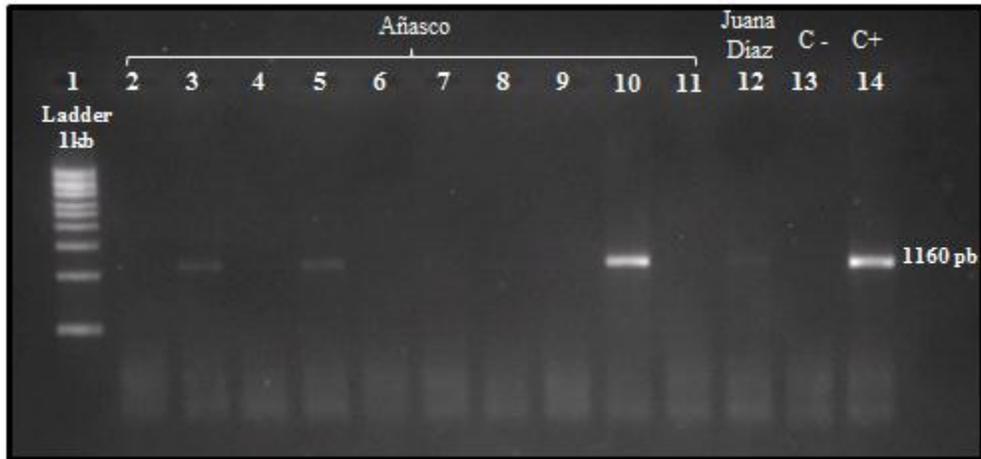
**Tabla 1.4.** Homología encontrada entre las secuencias del gen 16S del ADN ribosomal amplificadas mediante PCR y las secuencias reportadas en el Banco de Genes (GenBank).

Identificación		Homología en el Banco de Genes				
Número de acceso GenBank	Muestra	Número de Acceso	Descripción	Cobertura	Valor E <sup>+</sup>	Máxima Identidad
JX291536	EC209	AB555706.1	<i>Ca. L. asiaticus</i> gene for 16S ribosomal RNA	97%	0.0	99%
JX291537	EC241	JN049636.1	<i>Ca. L. asiaticus</i> isolate gj2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
JX291538	EC248	DQ471900.1	<i>Ca. L. asiaticus</i> from USA 16S ribosomal RNA gene	100%	0.0	99%

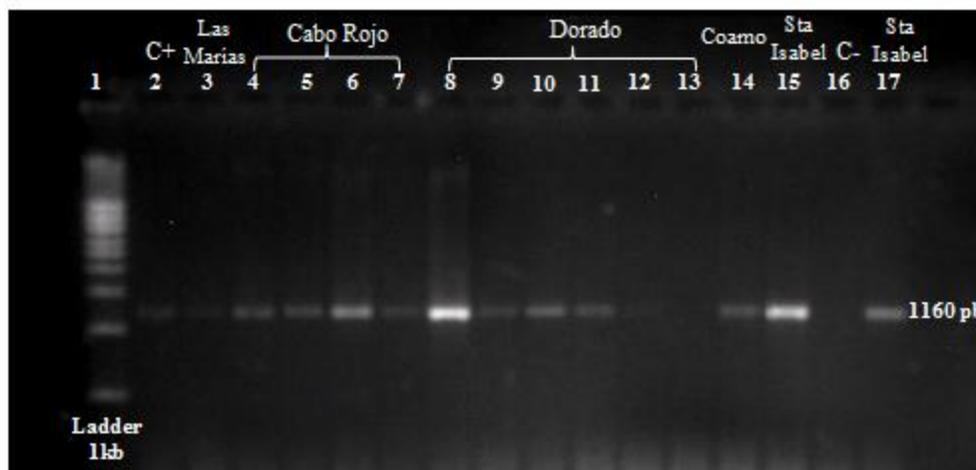
<sup>+</sup> Probabilidad de homología favorable. El valor cero es esperado para porcentajes altos de homología



**Figura 1.6.** Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para *Ca. L. asiaticus*. 1 y 14: marcador de peso molecular 1Kb, 2: EC158, 3: EC159, 4: EC208, 5: EC209, 6: EC241, 7: EC246, 8: 248, 9: EC249, 10: EC250, 11: EC251, 12: Control negativo, 13: Control positivo EC151.

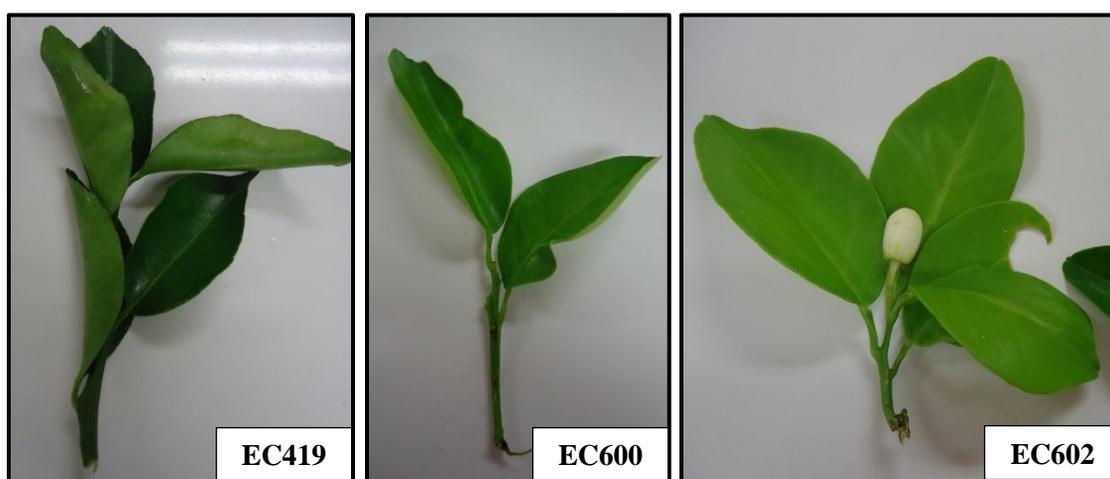


**Figura 1.7.** Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para *Ca. L. asiaticus*. 1: marcador de peso molecular 1Kb, 2: EC599, 3: EC600, 4: EC601, 5: EC602, 6: EC603, 7: EC604, 8: EC605, 9: EC606, 10: EC607, 11: EC608, 12: EC609, 13: Control negativo, 14: Control Positivo EC151.



**Figura 1.8.** Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para *Ca. L. asiaticus*. 1 y 14: marcador de peso molecular 1Kb, 2: Control positivo EC151, 3: EC295, 4: EC314, 5: EC338, 6: EC342, 7: EC346, 8: EC415, 9: EC417, 10: EC418, 11: EC419, 12: EC433, 13: EC434, 14: EC209, 15: EC241, 16: Control negativo, 17: EC248.

Es importante resaltar que tres de las muestras positivas para *Ca. L. asiaticus* correspondieron a árboles de mandarina y naranja asintomáticos colectados en Dorado y Añasco (Figura 1.9), lo que sugiere que tanto la extracción de ADN como la PCR convencional resultaron efectivos como método de diagnóstico de la enfermedad en etapas iniciales.



**Figura 1.9.** Muestras asintomáticas en las que se detectó *Ca. L. asiaticus*. EC419: muestra de mandarina proveniente de Dorado. EC600 y EC602: naranjas provenientes de Añasco.

En Puerto Rico se observó que el EC no estuvo presente en pomelos y en el limón común provenientes de Cabo Rojo, Lares, Morovis y Corozal, pero si en las demás especies colectadas (Figura 1.2). Esta situación es similar a lo que sucede en Sudáfrica, en donde el EC afecta principalmente a las naranjas (*C. sinensis*) y mandarinas (*C. reticulata*) y en menor proporción a limones (*C. limon*) (García, 2006). Aunque todas las especies y cultivares comerciales de cítricos son susceptibles al EC, el limón, la toronja y el pomelo se ven afectados en forma moderada (FAO, 2003).

La muestra de tangelo EC158 positiva para *Ca. L. asiaticus* fue colectada en el vivero de la EEA de Adjuntas (Figura 1.6 y Tabla 1.5, Apéndice 1.1.), el cual posee alrededor de 10,000 plantas de cítricos de diferentes especies. Los síntomas presentados fueron hojas cloróticas y engrosamiento de la nervadura central. Ninguna de las muestras sintomáticas colectadas en los huertos de la estación, a partir de donde se propagan las plantas de vivero, resultó positiva para EC. La muestra de naranja EC607 presentó síntomas severos de la enfermedad como clorosis de hojas nuevas, moteado en las hojas y engrosamiento de la nervadura central. Esta muestra fue colectada en Añasco (Tabla 1.5, Apéndice 1.1.) y resultó positiva para *Ca. L. asiaticus* (Figura 1.7). La bacteria también fue detectada en las muestras asintomáticas EC600 y EC602 provenientes del mismo huerto (Figura 1.7 y 1.9).

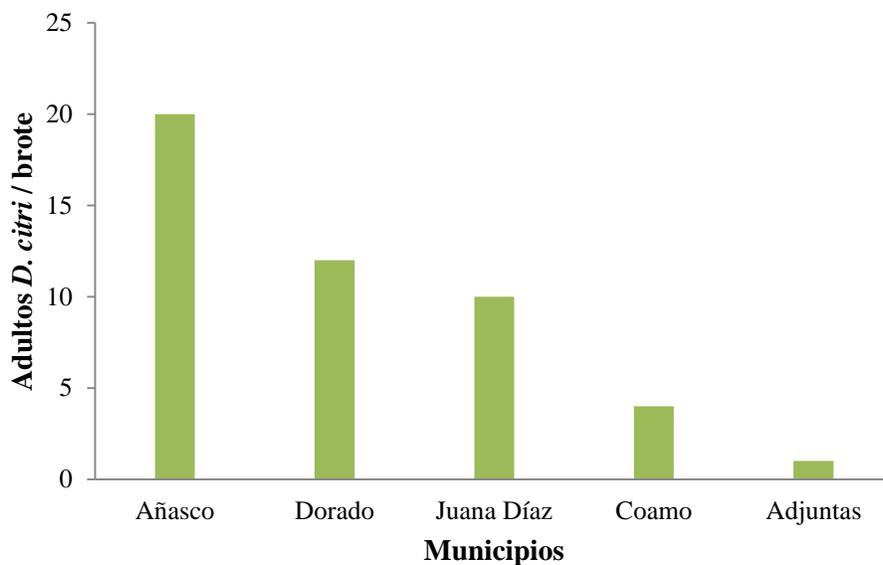
En el vivero de Cabo Rojo, *Ca. L. asiaticus* fue detectada en muestras de *C. nobilis* y de *C. reticulata* (Figura 1.8 y Tabla 1.5, Apéndice 1.1.). Las cinco muestras sintomáticas de naranja colectadas en el vivero de Santa Isabel también resultaron positivas para *Ca. L. asiaticus* (Figura 1.6 y Tabla 1.5, Apéndice 1.1.). Los síntomas en estos viveros incluyeron hojas con moteado distribuido asimétricamente en los dos lados de la nervadura y amarillamiento en el área intervenal (Figura 1.3A).

Las muestras de limón del país EC208 y EC209 fueron colectadas en Coamo, a partir de árboles que presentaban caída prematura de frutos y brotes amarillos (Figura 1.4A). En la figura 1.6 se observa las bandas de 1,160 pb obtenidas mediante PCR, en donde se confirma la presencia de *Ca. L. asiaticus* en muestras del huerto de Coamo. La muestra de mandarina EC295 de Las Marías y las limas Tahití EC151 y EC609 de la EEA de Juana Díaz también resultaron positivas mediante PCR para *Ca. L. asiaticus* (Figura 1.7 y 1.8). En el huerto de Las Marías se observaron hojas con una muesca como resultado de la acción del vector, clorosis intervenal y engrosamiento de las nervaduras centrales. En el huerto de Juana Díaz los árboles mostraron los

síntomas típicos de EC, que incluyó amarillamiento de las ramas nuevas, moteado de hojas y deformación de las mismas, coloración irregular de los frutos y declinamiento del árbol.

En el huerto de Dorado, el EC fue detectado en tres muestras sintomáticas de mandarina y en un limón del país. Los síntomas consistieron en hojas cloróticas y con moteado asimétrico. La mandarina asintomática EC419 del mismo huerto también resultó positiva para *Ca. L. asiaticus* (Figura 1.8, 1.9 y Tabla 1.5, Apéndice 1.1).

Durante el monitoreo en los huertos de Adjuntas, Añasco, Coamo, Dorado y Juana Díaz se colectó un brote joven de la parte media de los árboles y se evaluó la presencia del vector *D. citri* en el estereoscopio. El número de adultos de *D. citri* fue mayor en los huertos localizados en las costas de Añasco, Dorado y Juana Díaz. En la zona montañosa de Adjuntas y Coamo se observaron uno y cuatro individuos de *D. citri*, respectivamente (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Número de adultos de *Diaphorina citri*, vector de la bacteria *Ca. L. asiaticus*, en brotes de cítricos colectados durante el monitoreo de EC en Puerto Rico.

Los valles costeros de Añasco, Dorado y Juana Díaz se caracterizan por presentar temperaturas promedio de 28°C. La recolección de muestras en estos huertos se realizó en los meses de marzo y diciembre, épocas consideradas como secas debido a los bajos niveles de precipitación (23 mm aproximadamente) en estas áreas de la Isla (USGS, 2012). Según Aubert (1987), las condiciones climáticas descritas favorecen el desarrollo de poblaciones de *D. citri*,

que prevalecen en áreas costeras con altas temperaturas y a bajos niveles de humedad. De la misma manera, Sahail et al. (2004) determinaron la existencia de una correlación negativa entre la abundancia poblacional de *D. citri* y la humedad relativa.

Los muestreos en los huertos de Adjuntas y Coamo se realizaron durante el mes de abril de 2011, época en que la EEA de Adjuntas reportó un rango de temperatura entre 16 y 27°C y un nivel de precipitación de 144 mm (NOAA, 2012). La población de *D. citri* observada en esta región (Figura 1.10) puede asociarse con el nivel de precipitación. La densidad de ninfas y huevos del psílido disminuyen drásticamente debido a un efecto de volteo por lavado, dado que *D. citri* oviposita en brotes superiores de la planta, quedando las ninfas completamente expuestas al impacto de la lluvia (Aubert, 1990).

Posiblemente la presencia de *T. radiata* es un factor que pudo haber contribuido a que la enfermedad no esté presente en los huertos en donde no se detectó la bacteria *Ca. L. asiaticus* (Figura 1.5). En un monitoreo de posibles enemigos naturales de *D. citri* en Puerto Rico, Pluke y colaboradores (2005) encontraron ocho especies de coccinélidos en áreas de producción cítrica de la Isla. Las poblaciones de *D. citri* en Puerto Rico generalmente se mantienen bajas, tanto en los cítricos como en el mirto (*M. paniculata*). Los coccinélidos responden a las densidades poblacionales de la presa, mientras que los parasitoides con un estrecho rango de hospederos como *T. radiata* persiguen a su hospedero a bajas densidades poblacionales (Pluke et al., 2005).

*Tamarixia radiata* se estableció en Florida y llegó de manera espontánea a Puerto Rico y Texas (French et al., 2001). Aparentemente, la presencia de este parasitoide y de los coccinélidos depredadores ha mantenido a *D. citri* bajo control en la Isla (Pluke et al., 2005), lo que se corrobora con la baja incidencia del EC en la zona montañosa de la Isla en el reciente monitoreo. No obstante, es necesario llevar a cabo estudios que permitan conocer la situación actual del vector en Puerto Rico y detectar la presencia de *Ca. L. asiaticus* en sus poblaciones.

A pesar de la presencia generalizada de síntomas de EC, el número de muestras donde se identificó a *Ca. L. asiaticus* fue solamente de 7.0%. La presencia de CTV y CVC en muestras negativas para EC durante el monitoreo, sugiere que la sintomatología de EC puede también ser asociada con estas enfermedades (Marroquín-Guzmán et al., 2012).

En la muestra EC260 de *C. sinensis* de Ciales, negativa para *Ca. L. asiaticus* (Tabla 1.5, Apéndice 1.1), se detectó la bacteria *X. fastidiosa* utilizando la prueba DAS-ELISA (AGDIA® -

34501). Los síntomas observados fueron hojas con clorosis intervenal, similar a una deficiencia de zinc (Marroquín-Guzmán et al., 2012).

Mediante el Kit AGDIA® TAS-ELISA (SRA78900) se identificó la presencia de CTV en 41 muestras de naranja, mandarina, limón del país, tangelo y lima Tahití recolectadas en las localidades de Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, Ciales, Dorado, Isabela y Villaba (Marroquín-Guzmán et al., 2012). Los síntomas observados fueron hojas pequeñas, amarillamiento, deformaciones y aclaramiento en las nervaduras (Figura 2.4). De acuerdo con Moreno et al. (2008), estos síntomas en plantas positivas para CTV se asocian a los síndromes de acanaladura del tallo y aclaramiento, éste último común en etapas de vivero. El CTV es causado por un virus del grupo de los Closterovirus, limitado al floema de los árboles infectados, lo que ocasiona síntomas relacionados con deficiencias nutricionales (Yokomi et al., 1996).

La CVC es ocasionada por *Xylella fastidiosa*, una bacteria restringida al xilema. El mecanismo de patogenicidad de *X. fastidiosa* crea disfuncionalidad en el sistema vascular de la planta, obstruyendo el transporte de agua a través del árbol de cítrico. Las plantas infectadas por *X. fastidiosa* presentan brotes poco desarrollados, hojas con clorosis típicas y frutos pequeños que no alcanzan el tamaño comercial (Raju y Wells, 1986), asociado también con los síntomas característicos de deficiencias de Zn y K (Lima et al., 1996).

### **1.4.3. Distribución espacial del EC en Puerto Rico**

El análisis probabilístico sobre la presencia de la enfermedad en los huertos muestreados incluyeron los datos obtenidos previamente por Estévez de Jensen et al. (2010). El modelo de Bernoulli permitió identificar una distribución espacial del EC en Puerto Rico con un conglomerado principal y un conglomerado secundario (Apéndice 1.2).

En la Figura 1.11 se muestra el conglomerado principal, en donde se agruparon las localidades de Adjuntas, Yauco, Lares, Las Marías, Sabana Grande, Guánica, Utuado y San Sebastián, consideradas como las áreas más importantes en cuanto a la producción de cítricos en la Isla, según el Departamento de Agricultura de Puerto Rico (2008). El riesgo relativo, definido como la probabilidad de que un evento o riesgo ocurra en relación con la exposición del árbol al patógeno (Sistrom y Garvan, 2004) fue de 0.057, por lo que se considera que es 0.057 veces más probable encontrar un árbol afectado por EC dentro de este conglomerado ( $P < 0.001$ ), delimitado

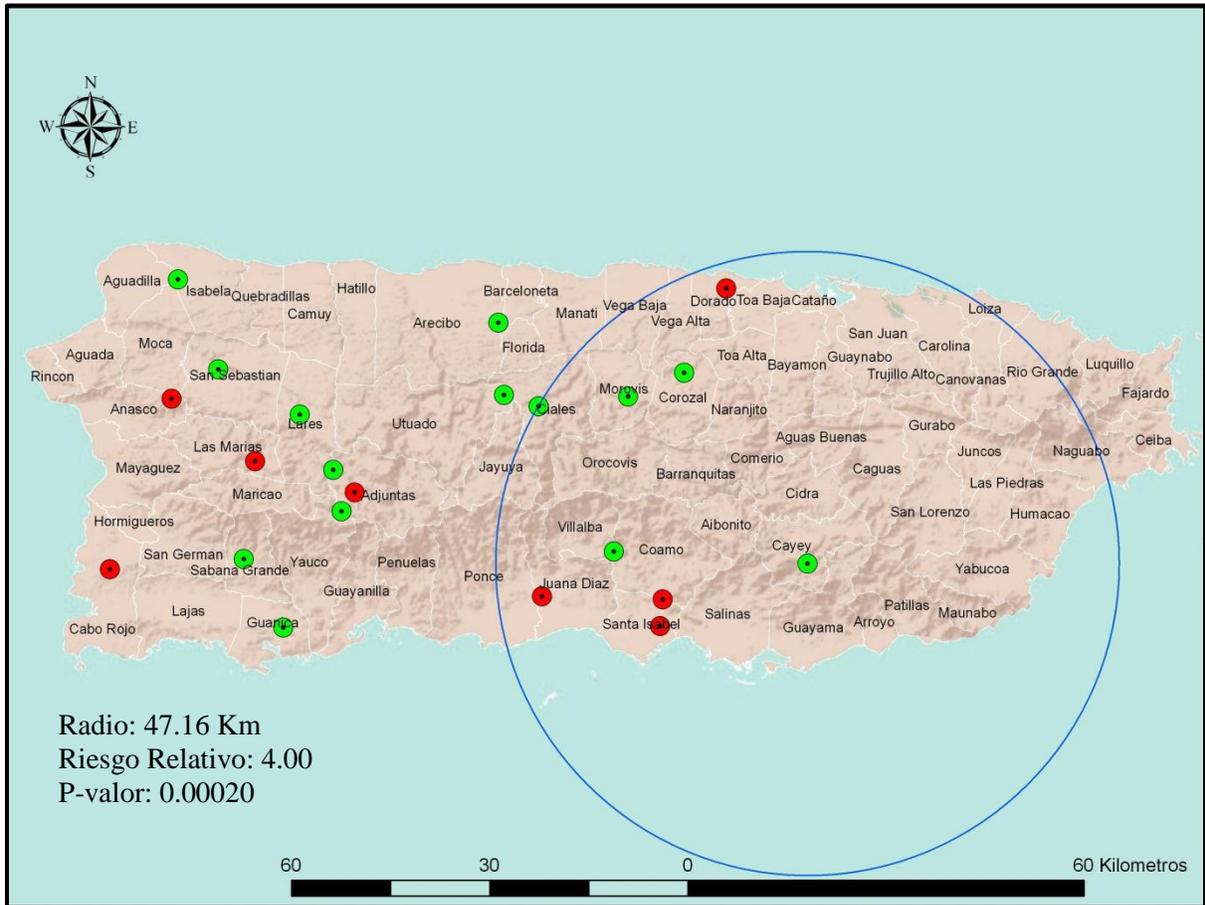
por un radio de 27.83 Km (Apéndice 1.2). En contraste, el conglomerado secundario se definió por un radio de 47.16 Km e incluyó las localidades de Cayey, Coamo, Santa Isabel, Villalba, Corozal, Morovis, Juana Díaz, Dorado y Ciales (Apéndice 1.2). La probabilidad de encontrar un árbol afectado al interior de este conglomerado es cuatro veces mayor que fuera del mismo ( $P < 0.001$ ) (Figura 1.12).

En China, Filipinas e Isla Reunión, se observó y demostró que el progreso espacial de las epidemias de EC se produce en agregados de árboles y con una marcada direccionalidad (Gottwald et al., 1989; Gottwald et al., 1990). Bassanezi et al. (2005) caracterizó el progreso espacial de la epidemias EC en Sao Paulo, Brasil y encontró una gran similitud con el progreso espacial en Asia, un patrón de focos a distancias entre 25 y 50 metros. Esto indica que los mecanismos espaciales están asociados con las grandes distancias que recorre el vector.

Lopes et al. (2007) mencionó que en Sao Paulo, las causas del progreso espacial irregular del EC pueden deberse a otros factores como las variaciones climatológicas (en particular la temperatura), favoreciendo de forma diferenciada tanto la multiplicación del insecto vector como la multiplicación del patógeno en tejidos de plantas hospedadas. En el 2005 en Florida, desde la primera detección en las ciudades de Homestead y Florida, el EC se ha dispersado por todo el Estado, debido a la uniformidad de la superficie citrícola y a la capacidad de dispersión del vector (Brlansky, 2009).

Los conglomerados espaciales de la enfermedad en Puerto Rico se mantienen muy cerca a las áreas de Isabela y Juana Díaz, donde se detectó la enfermedad inicialmente hace tres años (Estévez de Jensen et al., 2009; Estévez de Jensen et al., 2010). Sin embargo, se presentan casos en áreas geográficas mucho más alejadas como es el caso de Dorado, donde la diseminación pudo haber ocurrido a través de las plantas de vivero infectadas. Finalmente, es importante resaltar que el análisis de distribución espacial de enfermedades mediante el modelo de Bernoulli es comúnmente utilizado en el área de la medicina, por lo que es necesario llevar a cabo más análisis que permitan una adecuada interpretación en fitopatología.





**Figura 1.12.** Conglomerado espacial secundario de la presencia de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico.

## 1.5. CONCLUSIONES

- Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se identificó a *Ca. L asiaticus* como agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos en los huertos de las localidades de Adjuntas, Añasco, Cabo Rojo, Coamo, Dorado, Juana Díaz, Las Marías y Santa Isabel.
- El Enverdecimiento de los Cítricos se detectó en las especies *Citrus sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia*, *C. latifolia*, *C. nobilis* y *C. reticulata x C. paradisi*. Las muestras procesadas de *C. limon* y *C. paradisi* resultaron negativas para la identificación del patógeno.
- La distribución espacial del EC en Puerto Rico mostró un conglomerado principal que agrupó las localidades de Adjuntas, Yauco, Lares, Las Marías, Sabana Grande, Guánica, Utuado y San Sebastián, y un conglomerado secundario en donde se incluyeron las localidades de Cayey, Coamo, Santa Isabel, Villalba, Corozal, Morovis, Juana Díaz, Dorado y Ciales.
- La presencia del Enverdecimiento de los Cítricos en plantas de viveros comerciales de Puerto Rico es una causa para la diseminación de la enfermedad, por lo que un programa de certificación permitirá asegurar la producción de plantas libres de enfermedades.

## 1.6. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que permitan actualizar los datos sobre la dinámica poblacional del insecto vector y sus controladores en Puerto Rico y detectar la presencia de *Ca. L. asiaticus* en sus poblaciones.
- Desarrollar un programa de control biológico del psílido vector en plantaciones comerciales y residenciales.
- Implementar la producción de plantas de cítricos en estructuras cerradas en la zona montañosa donde la enfermedad no se haya detectado.

## 1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, S. and K. 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.
- Alemán, J., H. Baños y J. Ravelo. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista de Protección Vegetal* 22 (3): 154-165.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllodea), the two vectors of citrus greening disease. Pp. 226-230. In: Timmer, L. W., S. M. Garnsey and L. Navarro (eds.). *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA.
- Aubert, B. 1990. Integrated activities for the control of huanglungbin-greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. Pp. 133-44. In: Aubert, B., S. Tontyaporn and D. Buangsuwon (eds.). *Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Region. Proceedings of Asia Pacific International Conference on Citriculture*. ChiangMai, Thailand, 4-10 Febr. 1990.
- Aubert, B. 1993. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. Pp. 134-142. In: *Proceeding of the 4<sup>th</sup> Congress of the International Society of Citrus Nurserymen*, South Africa.
- Ayres, J. A. and P. T. Yamamoto. 2007. Survey of HLB (Greening) and control strategies in Brazil. *Citrus Expo 2007-Florida*. Fundecitrus. 31 P.
- Bassanezi, R. B., L. A. Busato, A.B. Filho, L. Amorium and T. R. Gottwald. 2005. Preliminary Spatial Pattern Analysis of Huanglongbing in Sao Paulo, Brazil. Pp. 341-355. In: *16<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologist*. IOCV, Riverside, CA.

- Beattie G.A.C., P. Holford, D. J. Mabblerley, A. M. Haigh and R. Bayer. 2006. Aspects and insights of Australia- Asia collaborative research on huanglongbing. Proceedings of the International Workshop for the Prevention of Citrus Greening Disease in Severely Infected Areas, Pp. 47–64. Ishigaki, Japan, 6–7 Dec. 2006.
- Bellis, G., D. Hollis and S. Jacobson. 2005. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), and huanglongbing disease do not exist in the Stapleton Station area of the Northern Territory of Australia. Australian Journal of Entomology 44:68-70.
- Boaretto, R. M., J. A. Quiaggio, F. A. A. Mourao-Filho, M. F. Giné and A. E. Boareito. 2008. Absorption and mobility of boron in young citrus plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis 39: 2502-2514.
- Bonilla, L. 2002. El cultivo de cítricos. Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Boletín Técnico No. 10. Santo Domingo, República Dominicana. 20 P.
- 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. Plant Health Progress. Published online: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Huanglongbing.aspx>.
- Brlansky, H. R., M. M. Dewdney, E. M. Rogers and R. K. Chung. 2009. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, FL. 225 P.
- Callaway, E. 2008. Bioterror: The green menace. Nature 452(7184):148- 150.

- Capoor, S.P. 1963. Decline of citrus in India. Bulletin of National Institute of Sciences of India 24:48–64.
- Chien, C.C. S. C. Chiu and S. C. K. 1989. Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. Fruits 44 : 401-407.
- Coletta-Filho, H.D., M.L.P.N Targon, M. A. Takita, J. D. De Negri, J. Pompeu-Junior and M. A. Machado. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in Brazil. Plant Disease 88:1382.
- Dahiya, K.K., R.K. Lakra, A.S. Dahiya and S.P. Singh. 1994. Bioefficacy of some insecticides against citrus psylla, *Diaphorina citri*. Crop Research Hisar. 8:137-140.
- Das, A. K., C. N. Rao and S. Singh. 2007. Presence of citrus greening (Huanglongbing) disease and its psyllid vector in the North-Eastern region of India confirmed by PCR technique. Current Science 92: 1759-1763.
- Dean, F. B., S. Hosono, L. H. Fang, X. H. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Y. Sun, Q. L. Zong, Y. F. Du, J. Du, M. Driscoll, W. M. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm and R. S. Lasken. 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(8):5261-5266.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2008. Oficina de Estadísticas Agrícolas. Ingreso Bruto Agrícola, año fiscal 2007-2008. San Juan, Puerto Rico.
- Duan, Y., L. Zhou, D.G. Hall, W. Li, H. Doddapaneni, H. Lin, L. Liu, C. M. Vahling, D. W. Gabriel, K. P. 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.

- Estévez De Jensen, C., F. Román, E. Abreu, A. Alvarado y O. Ortiz. 2009. Presencia del “Enverdecimiento de los Cítricos” en Puerto Rico. Resúmenes Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas. Pp. 7.
- Estévez de Jensen, C., A. Vitoreli y F. Román. 2010. Citrus greening in commercial orchards in Puerto Rico. *Phytopathology* 100: S34.
- Etienne, J. S. Quilici, D. Marival and A. Franck. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits* 56(5): 307-315.
- Etxeberria E., P. González , W. Dawson and T. Spann. 2007. An iodine-based starch test to assist in selecting leaves for HLB testing. Online: <http://edis.ifas.ufl.edu/HS375>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003. Examen de los problemas fitosanitarios actuales relacionados con los cítricos y de las políticas aplicadas para afrontarlos. Comité de problemas de productos básicos, grupo intergubernamental sobre frutos cítricos. 13ª reunión. La Habana, Cuba 20-23 de mayo de 2003. 14 P. Online (Consultado Julio 2012): <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/006/y9061s.pdf>.
- Fauvergue, X. y S. Quilici. 1991. Étude de certains paramètres de la biologie de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitoïde primaire de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vecteur asiatique du greening des agrumes. *Fruits*. 46(2): 179-185.
- Felix, C., S. Pichon, C. Braquart-Varnier, H. Braig, L. Chen, R. A. Garrett, G. Martin and P. Greve. 2008. Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for type IV secretion machinery in *Wolbachia* of *Armadillidium vulgare*. *Research in Microbiology* 159(6):481-485.

- Ferro, I. A. 2001. El cultivo de los cítricos. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. 35 P.
- French, J. V., C. J. Kahlke and J. V. Da Graca. 2001. First Record of the Asian Citrus Psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), in Texas. *Subtropical Plant Science* 53: 14-15.
- García, C. 2006. Huanglongbing (HLB Greening). Dirección de Vigilancia y Monitoreo. Online (Consultado Julio de 2012): [http:// www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar).
- Garnier, M., M. L. Iskra and J. Bové, J. M. 1987. Towards monoclonal antibodies against the apple proliferation mycoplasma-like organism. *Israel Journal of Medical Sciences* 23:691-695.
- Gottwald, T. R., B. Aubert and X. Y. Zhao. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79: 687-693.
- Gottwald, T. R., G. Gonzales and B. G. Mercado. 1990. Greening, Stubborn and others diseases Pp. 414-420. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologist. IOCV, Riverside, CA.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey and J. Borbón. 1998. Increase and patterns of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology* 88:621-636.
- Gottwald, T. R., J. V. Da Graca and R. B. Bassanezi. 2007. Citrus huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. Published online: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2007/huanglongbing/>.

- Gottwald, T. R. 2010. Current epidemiological understanding of *Citrus* Huanglongbing. Annual Review of Phytopathology 48:119–39.
- Gottwald, T., D. Hall , G.A.C. Beattie, K. Ichinose and M.C. Nguyen. 2010. Investigations of the effect of guava as a possible tool in the control/management of HLB. Proceedings of the Seventeenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California. Riverside, CA. 20 P. [http://www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsXVII/HLB-2\\_Gottwald.pdf](http://www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsXVII/HLB-2_Gottwald.pdf).
- 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.
- Halbert, S. E. and C. A. Núñez. 2004. Distribution of the Asian *Citrus* psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. Florida Entomologist 87(3):401-402.
- Hall, D.G, T.R. Gottwald, N. C. Nguyen, K. Ichinose and Q.D. Le. 2008. Greenhouse investigations on the effect of guava on infestations of Asian citrus psyllid in grapefruit. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 121:104–9.
- Hartung, J. S., J. F. Daniel and O. Pruvost. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. Applied and Environmental Microbiology 59:1143- 1148.
- Hocquellet, A., P. Toorawa, J. Bové and M. Garnier. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus* Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. Molecular and Cellular Probes 13:373-379.

- Huang, C.H., M.Y. Tsai and C.L. Wang. 1984. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. Journal of Agricultural Research of China 33(1):15-72.
- 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.
- Husain M. A. and D. Nath. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri* Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. Memoir Department of Agriculture. India, Entomology Services 10:1–27.
- Irey, M.S, T. Gast and T. R. Gottwald TR. 2006. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 119:89–93.
- Jagoueix, S., J. M. Bové and M. Garnier. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha-subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 44(3):379-386.
- Jagoueix, S., J. M. Bové and Garnier, M. 1996. PCR detection of the two ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes 10:43-50.
- Kulldorff, M. 1997. A spatial scan statistic. Communications in Statistics - Theory and Methods 26(6): 1481-1496.
- Kulldorff, M. 2009. SatScann™ v9.1.1. Software for spatial and space-time scan statistics. En: <http://www.satscan.org/>.
- Lafleche, D. and J. Bové. 1970. Mycoplasmes dans les argumes attentis de “greening”, de stubborn, ou des maladies similaires. Fruits 25:455-465.

- Li, W., R. H. Brlansky and J. S. Hartung. 2006a. Amplification of DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri from historic citrus canker herbarium specimens. *Journal of Microbiological Methods* 65:237-246.
- Li, W., J. S. Hartung and L. Levy. 2006b. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115.
- Li, W., J. S. 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.
- Liao, X. L. S. F. Zhu, W. J. Zhao, K. Luo, Y. X. Qi, H. Y. Chen, K. He and X. X. Zhu. 2004. Cloning and sequencing of citrus huanglongbing pathogen 16S rDNA and its detection by real-time fluorescent PCR. *Journal of Agricultural Science* 12:80-85.
- Lima, J. E. O., A. Coutinho, S. R. Roberto, V.S. Miranda, E. F. Carlos, R. Salva and C. Massari. 1996. New developments on citrus variegated chlorosis research at Fundecitrus, Brazil. *Proceedings International Society of Citriculture. VIII International Citrus Congress. Vol. I, Pp. 435-439.*
- Lin, K. H. 1956. Observations on yellow shoot on citrus. Etiological studies of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopathologica Sinica* 2:237-42.
- Lin, S. J., Y. F. Ke and C.C. Tao. 1973. Bionomics observation and integrated control of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science* 19(4):234-242.
- Lopes, S. A., G.F. Frare, N.A. Wulff and Ng.G. Fernandes. 2007. Epidemia de Huanglongbing (greening) no Estado de Sao Paulo: provavel influencia da temperature e das diferencias

- em transmissibilidade dos patógenos na distribuição geográfica da doença. *Fundecitrus*: 69-77.
- Marroquín- Guzmán, M. R., C. Estévez de Jensen and E. Martínez. 2012. Prevalent citrus diseases in Puerto Rico. *Phytopathology* 102: S6.4.
- Mattos- Junior, D. O. C. Bataglia and J. A. Quaggio. 2005. Nutrição dos citros. In: Mattos- Junior, D., R. M. De Negri and E. J. Pio (Eds.). *Citros*. Instituto Agronômico, Campinas, Brasil. Pp. 197-219.
- McFarland, C. and M. Hoy. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. *Florida Entomologist* 84 (2): 227-233.
- McGrane S. J., H. J. Cornell and C. J. Rix. 1998. A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylase in starch products. *Starch* 4:158-163.
- Mellín-Rosas, M. A., I. Hernández-Betancourt, M. C. Núñez-Camargo y H. C. Arredondo-Bernal. 2011. Efectividad de hongos entomopatógenos en el control del psílido de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en Colima. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Pp. 367-372.
- Meyer, M. J., A. M. Hoy and G. D. Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 95: 101-109.
- Michaud, J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological Control* 29:260-269.

- Miyakawa, T. 1980. Experimentally-induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 46:224- 230.
- Moran, N. A. 2002. Microbial minimalism: Genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* 108(5):583-586.
- Moreno, P., S. Ambrós, M. R. Albiach-Martí, J. Guerri and L. Peña. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Review. *Plant disease that changed the world. Molecular Plant Pathology* 9(2): 251-268.
- Mukhopadhyay, S. 2004. Citrus: production, postharvest, disease and pest management. Science publishers, Inc. Enfield, NH. 277 P.
- Munkvold, K. R., M. E. Martin, P. A. Bronstein and A. Collmer. 2008. A survey of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion system effector repertoire reveals several effectors that are deleterious when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:490-502.
- NOAA. 2012. National Oceanic and Atmospheric Administration's. National Weather Service. Online (Consultado Septiembre 2010): <http://www.nws.noaa.gov/climate/>.
- Oberholzer, P.C.J., D.F.A. Von Standen and W. J. Basson. 1965. Greening disease of sweet orange in South Africa. Pp.: 213-219. In: W. C. Price. *Proceedings 3rd Conference of International Organization of Citrus Virologists*. University of Florida, Gainesville, FL.
- Okuda, M., M. Matsumoto, Y. Tanaka, S. Subandiyah and T. Iwanami. 2005. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Disease* 89:705.

- Peña, J., C. M. Mannion, B. J. Ulmer and S. E. Halbert. 2006. Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*, is not a host of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Florida. Florida Entomologist 89(3): 412-413.
- Pluke, R. W. H., A. Escribano, J. P. Michaud and P. A. Stansly. 2005. Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. Florida Entomologist 88 (2): 123-128.
- Quaggio, J. A., D. Mattos-Junior and E. H. Cantarella. 2005. Manejo da fertilidade do solo na citricultura. In: Mattos-Junior, D., R. M. De Negri and E. J. Pio (Eds.). Citros. Instituto Agronómico, Campinas, Brasil. Pp. 483-517.
- Quilici, S. H. Joulain y R. Manikom. 1992. Étude de la fécondité de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera : Eulophidae), ectoparasitoïde primaire du psylle asiatique *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera : Psyllidae), vecteur du greening des agrumes. Fruits 47: 84-194
- Rae, D.J., W. G. Liang, D. M. Watson, G. A. Beattie and M. D. Huang. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. International Journal of Pest Management 43(1): 71-75
- Raju, B. C. and J. M. Wells. 1986. Diseases caused by fastidious xylem-limited. Plant Diseases 70 (3): 182-186.
- Ramos-Méndez, E. 2008. Huanglongbing (“Citrus Greening”) y el psílido asiático de los cítricos, Una perspectiva de su situación actual. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Revista Técnica Agrosanitario: 5-19.
- Reddy, J. D., S. L. Reddy, D. L. Hopkins and D. W. Gabriel. 2007. ToIC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. Molecular Plant-Microbe Interactions 20:403-410.

- Rivera, G. 2006. Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis de Maestría. Depto de Biología. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 85 P.
- Roistacher, C. N. 1996. The economics of living with citrus disease: Huanglongbing (greening) in Thailand. Pp. 279-285. In: Proceedings of the 13<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologist. IOCV. Riverside, CA.
- Schwarz, R. E. 1968. Indexing of greening and exocortis through fluorescent marker substances. Pp.: 118-124. In: W. C. Price. Proceedings 4th Conference of International Organization of Citrus Virologists. University of Florida, Gainesville, FL.
- Sistrom, C, and C. Garvan. 2004. Proportions, Odds, and Risk. *Radiology* 230:12–19.
- Sohail, A., A. Nisar and R. Rasool. 2004. Studies on population Dynamics and Chemical Control of Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. *International Journal of Agriculture and Biology* 6:970-973.
- Stokstad, E. 2006. Agriculture—New disease endangers Florida’s already suffering citrus trees. *Science* 312 (5773):523-524.
- Sutton, B., Y. P. Duan, S. Halbert, X. Sun, T. Schubert and W. Dixon. 2005. Detection and identification of citrus Huanglongbing (greening) in Florida, USA. Pp. 59 in: Proceedings of the Second International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Orlando, FL.
- Takushi T., T. Toyozato, S. Kawano, S. Taba, A. Ooshiro, M. Numazawa and M. Tokeshi. 2007. Starch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglungbing using iodine to detect high accumulatuion of starch in citrus leaves. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 73:3-8.

- Tatinei, S., U. S. Sagaram, S. Gowda, C. J. Robertson, W. O. Dawson, T. Iwanami and N. Wang. 2008. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
- Teixeira, D. 2005. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, '*Candidatus Liberibacter americanus*', with the disease. *Plant Disease* 89:107.
- Teixeira, D., C. Saillard, S. Eveillard, J. L. Danet, P. I. Costa, A. J. Ayres and J. M. Bové. 2005. "*Candidatus Liberibacter americanus*", associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology* 55 (5): 1857-1862.
- Toro, E. R., 1989. Cultivo de Cítricas en Puerto Rico. Servicio de Extensión Agrícola. Mayagüez, Puerto Rico. 41 P.
- Umpierre, A. D., A. Segarra Carmona, C. Estévez de Jensen e I. Cabrera. 2011. Efectividad de plaguicidas en *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae). Cartel. Reunión Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas, Noviembre 18, Ponce, Puerto Rico.
- USDA. 2011. Salve los cítricos. On line (Consultado Julio 2011): <http://salveloscitricos.org/practice-safe-citrus/>
- USGS. 2012. Water Resources of the Caribbean. On line (Consultado Septiembre 2012): <http://pr.water.usgs.gov/>.
- Vaccaro, N. y J. Bouvet. 2006. Registro de un enemigo natural de la chicharrita de los cítricos en Entre Ríos, Argentina. *Boletín de la IOBCSRNT* 15: 13.
- Van der Merwe, A. J. and F. G. Andersen. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening?. *Farming South African* 12:439-40.

Whiteside, J.O., S. M. Garnsey and L. W. Timmer. 1993. Compendium of Citrus Diseases. APS PRESS. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 80 P.

Yokomi, R. K., D. Rivera, S. M. Garnsey, T. R. Gottwald, E. Abreu-Rodriguez, V. Damsteegt, P. A. Stansly, V. J. Febres and C. L. Niblett. 1996. Incidence of Brown Citrus Aphid and Citrus Tristeza Virus in Puerto Rico. Thirteenth IOCV Conference, 1996- Citrus Tristeza Virus. Riverside, CA.

Zapata, M, J. Hartung , B. Brodbeck and P. Andersen. 2011. Endophytic bacteria from the vascular tissue of coffee (*Coffea arabica* L.) and citrus (*Citrus sinensis* L.) leaves found during the attempt to isolate the pathogen, *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. *Phytopathology* 101:S279.

## CAPÍTULO 2

### EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA CERTIFICACIÓN DE MATERIAL PROPAGATIVO DE CÍTRICOS EN PUERTO RICO

#### RESUMEN

La producción de plantas de cítricos en los viveros de Puerto Rico no cuenta con un sistema de verificación de la sanidad de las plantas. La propagación de enfermedades como la Tristeza (CTV), la Clorosis Variegada (CVC) y el Enverdecimiento de los Cítricos (EC), amenazan la producción de cítricos en la Isla. Uno de los componentes para establecer un programa de certificación es el desarrollo de protocolos para producir árboles de calidad y libres de patógenos. Con este propósito se colectaron muestras en viveros de Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, Isabela y Las Marías. Las muestras fueron procesadas en la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Juana Díaz. La detección del EC se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores OI1 y OI2, mientras que para el CTV y la CVC se utilizó serología. Se analizó un total de 145 muestras, de las cuales 63 resultaron positivas para CTV, cinco para EC y una para CVC. En el vivero de la EEA de Isabela se mantienen las plantas de cítricos en una estructura protegida y no se detectó la presencia de estas enfermedades. La incidencia del CTV en Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo y Las Marías fue superior al 40%. La CVC sólo fue detectada en una muestra de *Citrus limon* en Cabo Rojo, mientras que el EC se identificó en *C. sinensis* y *C. reticulata* en Las Marías. El inicio de una citricultura exitosa en la Isla en áreas donde hay insectos vectores dependerá de plantar árboles libres de enfermedades, monitorear y controlar la presencia de vectores y eliminar los árboles infectados.

Palabras Claves: Enverdecimiento de los Cítricos, Virus de la Tristeza, Clorosis Variegada, reacción en cadena de la polimerasa, ELISA.

## CHAPTER 2

### EVALUATION OF PROTOCOLS FOR THE CERTIFICATION OF CITRUS NURSERIES IN PUERTO RICO

#### ABSTRACT

The citrus nurseries in Puerto Rico do not have a plant health verification system. The spread of diseases such as Tristeza Virus (CTV), Variegated Chlorosis (CVC) and Citrus Greening (CG), threaten citrus production on the island. One of the components for establishing a certification program is the implementation of protocols for producing quality and healthy trees. For this purpose, a survey was conducted in nurseries of Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, Isabela and Las Marias. The samples were processed at the Plant Disease Clinic in the Agricultural Experiment Station (AES) of Juana Díaz. CG was identified using Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers OI1 and OI2. CTV and CVC were detected by TAS-ELISA and DAS-ELISA, respectively. A total of 145 samples were analyzed, 63 were positive for CTV, five for CG and one for CVC. In the nursery of the AES of Isabela citrus plants are kept in a protected structure and these diseases were not detected. The incidence of CTV in Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo and Las Marias was over 40%. Only one sample of *Citrus limon* from Cabo Rojo was positive for CTV, whereas CG was identified in *C. sinensis* and *C. reticulata* from Las Marias. The beginning of a successful citrus production in Puerto Rico, depends on planting disease-free trees, screening and controlling the presence of vectors and removing infected trees.

Keywords: Citrus Greening, Tristeza Virus, Variegated Chlorosis, Polymerase Chain Reaction (PCR), ELISA test.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

La planta de vivero es uno de los insumos más importantes para el establecimiento de una plantación de cítricos, teniendo en cuenta el carácter perenne del cultivo (Carvalho et al., 2005). El potencial máximo de producción y de calidad de las frutas del huerto será revelado entre seis y ocho años después de su siembra, y la longevidad de la plantación solamente se sabrá en un intervalo de tiempo aún mayor (Sobrinho, 1991).

En Brasil, todos los años millones de árboles son erradicados debido a la Clorosis Variegada (CVC), Enverdecimiento (EC), cancro de los cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) y a otras enfermedades y plagas. Buena parte de estas plantas no alcanzan la edad para producir, debido a que fueron llevadas a las plantaciones con algún tipo de enfermedad, es decir, salieron del vivero contaminadas (Valle, 2002).

La presencia en Puerto Rico de enfermedades catalogadas como devastadoras para el cultivo de cítricos a nivel mundial como Tristeza (CTV), EC y CVC (Timmer et al., 2003), así como de sus vectores, constituyen un peligro inminente para la citricultura en la Isla. La producción de plantas sanas, controles efectivos contra vectores y monitoreos constantes en huertos y viveros, son esenciales para la prevención de enfermedades (Carvalho et al., 2005).

Otras enfermedades como la mancha negra (*Guignardia citricarpa*) y el cancro de los cítricos pueden llegar de manera inadvertida a Puerto Rico a través la diseminación de esporas por tormentas tropicales o de la importación de frutas y material vegetal sin los controles pertinentes (Chung et al., 2009; Schubert et al., 2001). En otros casos, el patógeno puede tener un amplio rango de hospederos, pero las infecciones son latentes y no se observa daño aparente, por ejemplo, *X. fastidiosa* que causa CVC (Lee, 2008).

Los patógenos sistémicos que infectan los cultivares comerciales de cítricos, en ocasiones no son detectados por la manifestación de síntomas en las plantas, por lo que se requiere utilizar otros procedimientos para realizar su diagnóstico. Actualmente, se dispone de procedimientos serológicos y moleculares para el diagnóstico de virus, viroides, bacterias y fitoplasmas que ocasionan severas enfermedades en cítricos (Batista et al., 2008).

La utilización de técnicas de detección precisas es fundamental para garantizar un correcto estado fitosanitario de las plantas en vivero, y de esta forma impedir la comercialización de

material vegetal infectado, principal causa de la dispersión de enfermedades vegetales a grandes distancias y su introducción a nuevas plantaciones (Navarro et al., 2003).

La producción de plantas de cítricos en los viveros de Puerto Rico no cuenta con un sistema de verificación de la sanidad de las plantas, por lo que el riesgo de diseminación de estas enfermedades se mantiene. En este contexto, los objetivos de la presente investigación fueron:

- 1) Identificar la presencia en viveros de enfermedades como el EC, CVC y CTV, mediante técnicas moleculares y serológicas.
- 2) Evaluar protocolos para la certificación de material propagativo de cítricos en Puerto Rico.

## **2.2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.2.1. Programas de certificación de cítricos**

Los cítricos pueden propagarse sexual o asexualmente. La reproducción sexual o por semilla permite obtener plantas rústicas, vigorosas y de vida larga, pero da lugar a una variabilidad en la descendencia que afecta el valor comercial de las cosechas (Bonilla, 2002). Los cítricos se distinguen de las demás especies frutales por que la semilla puede tener más de un embrión (poliembrión), fenómeno que permite obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre. Sin embargo, como un gran número de variedades comerciales carecen de semillas, el sistema de reproducción sexual es inadecuado y solamente se practica en la obtención de patrones para injertar (Ferro, 2001).

La multiplicación asexual o vegetativa permite obtener plantas que reproducen las características de todo orden de la planta madre, aceleran el proceso de multiplicación y mejoran la calidad de la fruta. El injerto es el método de multiplicación vegetativa más utilizado, pero conlleva tener en cuenta dos factores: el patrón y la variedad a injertar o planta madre, que es aquella de donde se obtendrán las yemas dotadas de las características de la planta que se desea reproducir, inclusive las enfermedades que ella puede portar para el injerto (Quaggio et al., 2005). Por esta razón, para la selección exitosa de una planta madre se debe considerar que: (1) represente fielmente la variedad que se desea propagar, (2) tenga un buen grado de madurez o

desarrollo fisiológico, (3) la producción registrada sea alta y de buena calidad, y (4) presente un buen estado fitosanitario (Ferro, 2001; Lee, 2008).

Los programas de certificación garantizan el estatus sanitario y genético del material que se va a distribuir durante el proceso de propagación comercial a través de los viveros. Los programas de cuarentena y de saneamiento brindan la fuente del material libre de patógenos. Su distribución corre a cargo del programa de certificación, el cual generalmente exige de otra evaluación para verificar la ausencia de patógenos transmisibles por injerto en el área, responsables de enfermedades como Cancro de los Cítricos, Clorosis Variegada, Tristeza, Enverdecimiento y Mancha Negra de los Cítricos (USDA, 2011).

Existen, por lo general, cuatro bloques de árboles en un programa de certificación: 1) bloques primarios de fundación protegidos, 2) bloques de fundación, que puede estar ubicado en el campo y/o bajo condiciones protegidas en dependencia de la situación local respecto a los patógenos transmitidos por vectores, 3) bloques de multiplicación, y 4) bloques de plantas de vivero certificadas que se distribuirán y plantarán (Lee, 2008).

Actualmente, hay muchas enfermedades causadas por patógenos transmisibles por injerto y por lo tanto es un riesgo no detectar a tiempo su presencia en las fuentes de propagación de cítricos. Estos patógenos transmisibles por injerto comprenden virus (CTV, psorosis), viroides (cachexia, exocortis) y procarióticos sistémicos como *Xylella fastidiosa*, *X. axonopodis* pv. *citri* y *Candidatus Liberobacter* spp. La infección de los árboles madre con estos patógenos puede ser asintomática si los árboles son propagados sobre patrones tolerantes o establecidos con variedades tolerantes. Estos patógenos transmisibles por injerto pueden tornarse destructivos si se propaga sobre patrones susceptibles, o si se planta en un clima que favorezca el desarrollo de los síntomas (Agrios, 2005; Lee, 2008).

El diagnóstico oportuno de la presencia de enfermedades sistémicas y cuarentenarias en los principales huertos de Puerto Rico, constituye la base dentro del desarrollo de un programa de certificación de cítricos en la Isla. Dentro de los métodos utilizados para la identificación de enfermedades de importancia en los cítricos se encuentran la microscopía óptica y electrónica, técnicas moleculares como la PCR convencional, PCR en tiempo real y RT-PCR, hibridación de ácidos nucleicos y técnicas inmunoenzimáticas. Estas últimas, en sus variantes de ELISA DAS (Sandwich de doble anticuerpo), DASI (Sandwich de doble anticuerpo indirecto) e Inmunoimpresión, resultan las de mayor aplicación en programas de certificación y

prospecciones por su sencillez, bajo costo y capacidad de analizar grandes volúmenes de muestras en corto tiempo (Martin et al., 2000). Para la selección del procedimiento de diagnóstico a utilizar es necesario tener en cuenta la velocidad a la que se necesitan los resultados, la exactitud y sensibilidad requerida, costo y disponibilidad de reactivos específicos (Mukhopadhyay, 2004).

### **2.2.2. Enverdecimiento de los Cítricos (EC)**

El Enverdecimiento de los Cítricos (EC) se identificó en Puerto Rico en el año 2009 a partir de muestras provenientes de un huerto de china en la estación experimental de Isabela (Estévez de Jensen et al., 2009). Posteriormente se detectó en huertos comerciales en las localidades Castañer, Yahuecas, y Juana Díaz (Estévez et al., 2010). La enfermedad fue descrita hace más de un siglo en Asia y es emergente en el continente americano, donde ha sido informada en los estados de Sao Paulo y Minas Gerais, Brasil (Coletta-Filho et al., 2004) y en la Florida, Estados Unidos (Teixeira et al., 2005).

El agente causal es una bacteria fastidiosa alojada en los tubos cribosos del floema de las plantas infectadas. Se han identificado tres especies del patógeno: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Candidatus Liberibacter americanus*, este último se encuentra presente en Brasil (Bové, 2006). El psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) es el responsable de la transmisión en Asia y América de *Candidatus Liberibacter* spp. (Manjunath et al., 2008), mientras que en África el agente causal del EC tiene como vector al psílido *Trioza erythrae* (Bové, 2006).

Entre los síntomas característicos del EC se encuentran brotes amarillos a un solo lado del árbol y hojas con manchas cloróticas de bordes difusos que no guardan simetría a ambos lados del nervio central (moteado difuso asimétrico o “blotchy mottle”). Las plantas afectadas también pueden presentar una fuerte defoliación, hojas nuevas de menor tamaño con síntomas de deficiencias minerales (Zn y Mn). Los frutos suelen ser pequeños, asimétricos y a veces muestran inversión de color o moteado difuso con el pedúnculo hundido y de color naranja. Al hacer cortes transversales, se puede observar la nervadura de color amarillo intenso, la columnela torcida y semillas abortadas de color marrón. Los árboles de plantaciones jóvenes presentan enanismo, porte esparcido y abundantes ramas secas (Bové, 2006).

El diagnóstico de la enfermedad es posible mediante el uso del microscopio electrónico, anticuerpos fluorescentes específicos para EC, ensayos de inmunofluorescencia (ELISA), y técnicas basadas en la amplificación de la región 16S rRNA, tales como PCR convencional con cebadores específicos y PCR en tiempo real (Manjunath et al., 2008).

El EC limita la longevidad de los árboles reduciendo un potencial productivo de cerca de treinta años a uno que fluctúa entre cinco a ocho años (Bové, 2006). El manejo del EC es difícil y requiere de un efectivo plan de manejo integrado que incluye el uso de material de propagación sano, la eliminación de la fuente de inóculo de manera voluntaria y por medios regulatorios, el uso de insecticidas para el control del vector en el cultivo, así como el control biológico de psílidos vectores en reservorios no cultivados.

### **2.2.3. Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC)**

La clorosis variegada de los cítricos (CVC) fue reportada por primera vez en 1984 en Alto Paraná, Argentina y en 1987 en el Estado de Sao Paulo, Brasil. La enfermedad es una de las más limitantes en la producción de cítricos en Brasil y es considerada como una amenaza para la industria a nivel mundial (He et al., 2000). En el año 2000 se calculó que las pérdidas causados por la CVC en el estado de Sao Paulo alcanzaron 110 millones de dólares (Ayres, 2001).

El agente causal de la CVC es *Xylella fastidiosa*, una bacteria gram negativa restringida al xilema. El mecanismo de patogenicidad de *X. fastidiosa* crea disfuncionalidad en el sistema vascular de la planta, obstruyendo el transporte de agua a través del árbol de cítrico. *X. fastidiosa* es transmitida por insectos que llevan la bacteria de planta a planta de manera persistente, no circulativa. Se asocia con: *Oncometopia facialis*, *Acrogonia terminalis* y *Dilobopterus costalimai*. Mediante material infectado por insectos (madera) y plantas en etapas de desarrollo se pueden dispersar el patógeno en distancias largas (Mukhopadhyay, 2004).

Los síntomas de la CVC se asocian con deficiencias de zinc en la planta, se reduce el tamaño de las hojas, frutos y corteza dura de la planta. Se observan debajo de la hoja lesiones pegajosas de color marrón claro a oscuro y áreas necróticas que corresponden a las zonas de clorosis de color amarilla de la superficie de la hoja. La enfermedad en el fruto presenta lesiones de coloración marrón claro a oscuro de forma circular que cubre gran parte del fruto. Una vez los

cítricos son infectados con la enfermedad pueden tardar hasta un año en presentar sus síntomas (Janse y Obradovic, 2010).

Las pérdidas a causa de la CVC ocurren en los estados más avanzados de la enfermedad, reflejado en la reducción del crecimiento de la planta y particularmente de la fruta. Por lo general, los tallos de las plantas enfermas exhiben protuberancias en la parte alta de la corona, la cual tiene hojas y frutos pequeños, y muestra defoliación en las ramas finales. Cuando se llega a este estado, el árbol muere económicamente en la mayoría de los casos (Ayres, 2001).

La CVC está siempre relacionada con bajos niveles de potasio en las hojas (Malavolta, 1994). Su estudio desde el punto de vista nutricional ha determinado que, con aportes de zinc y potasio se alcanza un mejor balance nutritivo y un incremento importante en el tamaño de los frutos (Martínez et al., 1995). Del mismo modo, Rodríguez et al. (1994a) reportaron que la aplicación de zinc y potasio en forma conjunta incrementó significativamente el tamaño de los frutos en plantas de *C. sinensis* con síntomas de CVC.

El diagnóstico de la enfermedad es posible por pruebas de serológicas (DAS-ELISA) y mediante PCR de ADN obtenido a partir de los peciolos, ramas pequeñas o raicillas de los árboles afectados. El control de la enfermedad se realiza mediante el control químico de los vectores que la transmiten y la eliminación de los cítricos afectados (Janse y Obradovic, 2010). El manejo de CVC en Brasil se realiza plantando árboles sanos, haciendo aplicaciones de insecticidas contra los saltahojas vectores y podando las ramas sintomáticas del árbol a intervalos regulares (Rosetti 2000).

En Puerto Rico, la CVC es considerada una amenaza para el cultivo, puesto que puede ser introducida a través de frutas o material de cítricos provenientes de zonas donde esta enfermedad está presente. Zapata et al. (2011) detectó mediante la técnica de DAS-ELISA la presencia de *X. fastidiosa* en el sistema vascular de plantas de *Citrus sinensis* y *Coffea arabica* en Puerto Rico.

#### **2.2.4. La Tristeza de Los Cítricos (CTV)**

La tristeza de los cítricos (CTV) es una enfermedad originaria de Asia, de donde se dispersó a los principales países citrícolas del mundo por medio de plantas y/o material vegetativo infectado, estando presente hoy en día en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Garnsey et al., 1987). Importantes epidemias de tristeza han destruido millones de

árboles de cítricos injertados sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* (L) Osbeck). Desde 1930 hasta la fecha se calcula en más de 80 millones los árboles de naranjo dulce, mandarina y pomelo injertado sobre naranjo amargo, que han muerto debido al virus de la tristeza en todo el mundo (Cambra y Moreno, 2000). En el continente americano durante la década de 1930, ocurrieron las primeras epidemias que causaron el colapso de las plantaciones de naranjo dulce injertado sobre naranjo agrio. Las epidemias más recientes se desarrollaron en el área del Caribe en la década del 90, después de la colonización de estas zonas por *Toxoptera citricida* Kirkaldy, su principal vector (Yokomi et al., 1996).

El virus que ocasiona la Tristeza pertenece al género *Closterovirus* de la familia *Closteriviridae* (Karasev et al., 1995). Su genoma está constituido por RNA de cadena simple y polaridad positiva con 12 marcos abiertos de lectura (ORF) y dos regiones no traducidas, con capacidad para codificar al menos 17 proteínas (Karasev, 2000). Este RNA está protegido por una cápsida formada por dos proteínas de 25 y 27 Kda aproximadamente (Cambra y Moreno, 2000; Moreno et al., 2007). Existe un gran número de aislados de CTV que difieren en sus características biológicas, serológicas, perfil de RNAs bicaterianos o secuencia de RNA genómico (Cambra y Moreno, 2000).

El CTV se transmite con relativa facilidad por injerto de yema y de tejido; por lo que su presencia en el campo se debe en gran medida al empleo de material de propagación proveniente de plantas infectadas. La diseminación posterior puede ser llevada a cabo por varias especies de áfidos de una manera semipersistente, entre los cuales sobresalen por su mayor eficiencia *T. citricida* y *Aphis gossypii*, considerando al pulgón café de los cítricos (*T. citricida*) como el principal vector, capaz de transmitir hasta las razas agresivas que ocasionan picado del tallo y amarillamiento de plantas (Gottwald et al., 1998). *T. citricida* fue reportado en Puerto Rico en Mayo de 1992 y desde entonces, la enfermedad ha estado presente en las principales zonas productoras de la Isla (Yokomi et al., 1996).

En cuanto a los síntomas, existen tres síndromes característicos de la enfermedad: el llamado decaimiento rápido o tristeza (“Decline inducing, DI”), las acanaladuras o punteaduras del tallo (“Stem pitting, SP”) y el aclaramiento o clorosis discontinua de nervaduras (“Seedling yellow, SY”) (Rocha-Peña et al., 1995; Besoain et al., 2003).

El decaimiento rápido o tristeza produce una extensa gama de síntomas. En primer lugar, produce un decaimiento lento, acompañado de clorosis. Ocasiona también defoliación de los árboles asociada con la pudrición de las raicillas. En segundo lugar, este síndrome provoca una disminución del tamaño del árbol acompañado con una reducción del tamaño de los frutos, que maduran antes y son de mala calidad. La tercera manifestación se conoce como “quick decline” o colapso rápido. Los árboles aparentemente sanos comienzan a mostrar un marchitamiento de las hojas similar al producido por falta de agua y en cuestión de una o dos semanas mueren (Rocha-Peña et al., 1995; Besoain et al., 2003). Esto se debe a que el CTV induce el colapso y la necrosis de los tubos cribosos y las células acompañantes cerca de la unión del brote, produciendo una cantidad de líber no funcional (Schneider, 1959) que causa una progresiva reducción del sistema radicular y como consecuencia un aporte deficiente de agua y nutrientes (Moreno et al., 2008).

Las acanaladuras del tallo se producen como consecuencia de la interrupción de la actividad meristemática en áreas limitadas de cambium, que da lugar a un crecimiento radial irregular con una depresión local en los puntos inactivados. Estas proyecciones puntiagudas de la corteza de la madera se ajustan perfectamente con las cavidades a nivel del xilema (Schneider, 1959). En las plantas infectadas tiene lugar un decaimiento y clorosis del follaje con pérdida de productividad. Los árboles afectados presentan atrofia, bajo rendimiento y pobre calidad de fruta (Rocha-Peña et al., 1995; Besoain et al., 2003). Las limas ácidas muestran la sensibilidad más alta a este síndrome, los pomelos y algunas variedades de naranja dulce sensibilidad intermedia, y los mandarinos la tolerancia más alta (Durán-Villa y Moreno, 2000; Timmer et al., 2000). Los aislados de CTV que causan este síndrome predominan en la mayoría de las áreas cítricas (Gottwald et al., 1999).

El aclaramiento rara vez se observa en el campo (Moreno et al., 2008) y se caracteriza por inducir atrofia, pequeñas hojas pálidas o amarillas, sistema radicular reducido y a veces un cese completo de crecimiento en algunos genotipos como el naranjo amargo, pomelo o limonero (McClellan, 1960). En algunos casos, las plantas que presentan este síndrome se recuperan y producen de nuevo hojas normales (Wallace y Drake, 1972).

Las estrategias de control de este virus se han desarrollado basadas en la presencia o ausencia de CTV en las áreas cítricas. Si no ha sido detectado el virus, para evitar su introducción en un país, se establecen medidas cuarentenarias y la certificación del material de propagación. Si está presente en baja incidencia, se aplican programas de erradicación o

supresión. En áreas donde el virus está ampliamente distribuido y las posibilidades de nuevas infecciones son altas, las medidas deben dirigirse a reducir las pérdidas de la producción. Si en estas condiciones están presentes los aislados que inducen declinamiento rápido, lo más aconsejable es sustituir el patrón de naranjo agrio por patrones tolerantes a la tristeza. En todos los casos, estas medidas deben estar acompañadas por un programa de certificación que garantice la reposición de nuevas áreas con material sano. El control químico de los vectores de la tristeza es poco eficiente y costoso, por lo que sólo se justifica en los viveros (Lee, 2008).

Dentro de los métodos utilizados para la detección del virus, se encuentran el diagnóstico biológico con plantas indicadoras, la microscopía óptica y electrónica, técnicas moleculares como la RT-PCR e hibridación y técnicas inmunoenzimáticas (Rosa et al., 2007). El procedimiento clásico de detección del virus es la inoculación mediante injerto de material sospechoso en la lima mexicana (Wallace y Drake, 1951). La observación de los síntomas (aclaramiento de las nervaduras, hojas arrugadas y acanaladuras en la madera) pueden tener lugar tras un periodo de cultivo que varía de cuatro a seis meses en condiciones controladas de invernadero, con temperaturas diurnas entre 24 a 28°C y 17 a 21 °C durante la noche (Roistacher, 19991). El inconveniente de esta prueba es la lentitud del diagnóstico, su elevado coste y la imposibilidad de ser usada de forma masiva (Cambra, 1983).

Actualmente la técnica inmunoenzimática ELISA es la más utilizada, debido a que permite un diagnóstico rápido con alta sensibilidad y bajo costo. Es el método recomendado por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (2004), tras su validación en comparación con otras técnicas de detección de CTV (Cambra et al., 2002). Se suelen aplicar anticuerpos monoclonales desarrollados para el CTV que reaccionan con la mayoría de aislados conocidos (Cambra et al., 2000).

### **2.2.5. El Cancro de los Cítricos (CC)**

El cancro bacteriano (CC) es una enfermedad que amenaza la producción de cítricos, en especial de las limas y limones alrededor del mundo. Es causada por diferentes cepas de la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) (Schubert et al., 2001). Entre las formas descritas del cancro cítrico bacteriano se encuentran el cancro asiático (CBCD-A), cancrrosis B o cancro cítrico falso (CBCD-B) y cancro de limas mexicanas

(CBCD-C). Las diferencias entre las cepas no son sólo en sus hospederos y en los síntomas de la enfermedad, también hay diferencias genéticas, fisiológicas, patogénicas y serológicas (Gottwald, 1993).

Los síntomas característicos del CC consisten en lesiones conspicuas en las hojas, frutos y tallos, de forma circular que toman una coloración marrón oscuro a claro, rodeada de un halo clorótico, con una zona aceitosa en los márgenes de las hojas (Schubert et al., 2001). En los frutos, la sintomatología inicial consiste en la aparición de pequeñas manchas amarillas con un punto marrón en el centro, los cuales van aumentando de tamaño y coalescen, ocupando gran parte de la cáscara del fruto. Estas manchas son salientes y superficiales, parecidas a verrugas, y en un estado avanzado de la enfermedad provocan rompimiento de la cáscara (Civerolo, 1984). Las infecciones severas resultan en defoliación, muerte de la planta y caída prematura de frutos (Schubert et al., 2001).

La bacteria se dispersa por medio del tránsito de personas por los huertos, implementos de cosecha, vehículos, plantas de vivero y otros materiales cítricos contaminados (Civerolo, 1984). Hojas, ramas y frutos jóvenes son fácilmente contaminados por la enfermedad. Para que la bacteria penetre y provoque síntomas deben existir heridas causadas normalmente por material de colecta (escaleras, coge frutas, etc.), viento e insectos, principalmente por el minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) (Gottwald, 1993). El control del CC se basa en la prevención y en la destrucción de las plantas afectadas y las ubicadas en su radio de influencia donde existen poblaciones bacterianas asintomáticas (Ayres, 2001).

Para el diagnóstico de *X. axonopodis* pv. *citri* se han desarrollado pruebas serológicas (ELISA) y cebadores específicos para su detección mediante PCR convencional y PCR anidado. Los fragmentos de ADN identificados y secuenciados de este patógeno están ausentes en el genoma de todas las bacterias saprofitas de cítricos y de la mayoría de fitopatógenas (Pruvost et al., 1997; Mukhopadhyay, 2004).

El CC ha sido reportado como endémico de países productores en Asia e introducido de estas áreas endémicas a otros países productores en Sur América, África, Australia y Oceanía. En 1910 hubo una gran campaña de erradicación de CC que se inició en Florida (Estados Unidos) y continuó hasta 1933, cuando este estado se declaró libre de CC. Sin embargo, en 1984 el Departamento de Agricultura del estado de Florida reportó la cepa A del CC (Mukhopadhyay, 2004). Al presente, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) no cree

posible la erradicación total de la bacteria en Florida, ya que los huracanes que afectaron el estado entre el 2004 y el 2005 han dispersado la bacteria y han originado brotes dispersos de *X. axonopodis* pv. *citri* en Florida (Compton, 2006). El CC no está reportado oficialmente en Puerto Rico, sin embargo, no se descarta su presencia debido al movimiento de material propagativo entre el estado de Florida y la Isla, y por las condiciones climáticas que pueden haber diseminado la bacteria hacia las zonas productoras de cítricos en el Caribe.

### **2.2.6. La Mancha Negra de los Cítricos**

La mancha negra de los cítricos una enfermedad fúngica ocasionada por *Guignardia citricarpa* (Anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*). Se caracteriza por la presencia de manchas y lesiones oscuras y moteadas sobre la cáscara de la fruta. Esta enfermedad provoca la caída prematura de la fruta, reduce el rendimiento de los cultivos y hace que las frutas, malogradas por las intensas manchas, sean inadecuadas para la venta. Si bien todos los cítricos comerciales enfrentan el riesgo de contraer mancha negra, el limón y las variedades de cítricos de maduración tardía, como la naranja tipo “Valencia”, son los más vulnerables. La enfermedad se transmite a través de esporas liberadas por hojas de cítricos caídas y en fase de descomposición. El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante técnicas convencionales de aislamiento, secuenciación y pruebas de patogenicidad (Chung et al., 2009; USDA, 2011).

La mancha negra de los cítricos es común en las regiones subtropicales que tienen lluvias estivales y que incluyen numerosos países de Asia, América del Sur, África y Australia. La enfermedad se detectó por primera vez en los Estados Unidos durante un estudio de plagas de las naranjas tipo “Valencia” realizado en 2010 en la zona de Immokalee (Florida), lo que representa un riesgo latente para la industria citrícola en Puerto Rico, debido a la importación de frutas y de material propagativo a partir de zonas afectadas por la mancha negra (USDA, 2011).

Una vez introducido el patógeno en un huerto, su erradicación es casi imposible. Por tanto las medidas de prevención son bastante importantes, para asegurar que la enfermedad no se propague a nuevas áreas (Goes y Feichtenberger, 1993). Las medidas preventivas que se recomiendan son el cultivo de árboles jóvenes sin el agente causal, la restricción del acceso a las personas y vehículos en los huertos, el lavado y desinfección de los vehículos, maquinaria, equipo y material que se utiliza en la cosecha antes del ingreso al huerto, el mantenimiento de las

plantas en buenas condiciones de nutrición y salud, inspecciones frecuentes en los huertos y la eliminación de las plantas que estén en un estado avanzado de deterioración (Ayres, 2001).

El control químico ha sido el procedimiento más utilizado después de detectar la enfermedad en el campo, especialmente cuando la producción se destina al mercado de fruta fresca (Chung et al., 2009). Los fungicidas con componentes de protección de cobre o sistémicos, especialmente los benzimidazoles, han sido desarrollados para proteger las frutas recién formadas. Otros procedimientos que pueden ayudar a controlar la enfermedad en áreas contaminadas incluyen cosechar la fruta antes de su período normal de cosecha, controlar las malezas en las hileras con herbicidas postemergentes antes de la floración para cubrir las hojas infectadas que han caído con mantillo vegetal, irrigar los huertos durante los meses secos para evitar la caída excesiva de hojas y la predisposición de las plantas a ser atacadas por el hongo e instalar barreras cortavientos en los huertos para minimizar la diseminación de *G. citricarpa* (Goes y Feichtenberger, 1993; Ayres, 2001).

### **2.2.7. Otras enfermedades de importancia en Cítricos**

La citricultura actual contempla la introducción de nuevos patrones que toleran el CTV, pero resultan sensibles a las enfermedades provocadas por otros patógenos. Entre estos patógenos están los viroides que pueden ocasionar daños de importancia sobre la producción y longevidad de las plantaciones (Loussert, 1992).

La enfermedad conocida como exocortis se encuentra en la mayoría de las áreas citrícolas de todo el mundo, aunque su presencia ha disminuido debido al establecimiento de los programas de saneamiento y certificación. El agente causal de esta enfermedad es el viroide de la exocortis de los cítricos, que pertenece al género *Pospiviroid*. Los patrones sensibles a este agente son el limero Rangpur, el cidro, el *Poncirus trifoliata* y sus híbridos: citranges Troyer y Carrizo, así como algunas variedades de limoneros y pomelos. La presencia de este viroide en árboles injertados sobre patrones susceptibles causa enanismo, rajaduras y descamación de la corteza del tronco (Ito et al., 2002).

El agente causal de la cachexia son dos variantes del HSVd, conocidas como CVd Iib y CVd Iic. Los patrones sensibles a la cachexia son el *Citrus macrophylla*, el limero dulce de Palestina y el limero Rangpur, así como todos los clementinos, satsumas, mandarinos e híbridos

de estos últimos injertados sobre cualquier patrón. La enfermedad puede tener efecto letal y en las especies sensibles provoca debilitamiento general del árbol, clorosis, enanismo, así como síntomas de acanaladuras en la cara cambial de la madera y proyecciones en la corteza interna con fuerte impregnación de goma. En los cultivares injertados sobre patrones sensibles, causa notable raquitismo y deterioro del árbol en un período corto cuando la infección es por variantes severas. La cachexia se transmite de forma eficiente mediante la propagación de yemas infectadas, así como de forma mecánica durante las operaciones de poda y recolección (Reanwarakorn y Semancik, 1999).

Por las características de los viroides, la forma de control más eficiente es la utilización de plantas y yemas procedentes de un programa de producción de material de propagación certificado. Además debe incluir la desinfección de las herramientas de corte y poda mediante la inmersión en hipoclorito de sodio (Mukhopadhyay, 2004).

Otra enfermedad de gran importancia en la industria cítrica es la psorosis, que se encuentra distribuida por todo el mundo. Causa una disminución del vigor, la producción y la reducción de la vida útil de los árboles de cítricos en países de América del Sur, Asia, África y el Mediterráneo. En países como Argentina y Uruguay donde predominan formas severas de la enfermedad, es una de las principales causas de la pérdida de vigor y muerte de los árboles, especialmente los más viejos (Loussert, 1992; Mukhopadhyay, 2004).

El agente causal de esta enfermedad es el virus de la psorosis de los cítricos (CPsV), que pertenece al género *Ophiovirus*. Este virus es tripartito y su genoma está compuesto por tres cadenas de ARN de polaridad negativa. El síntoma más característico es la presencia de descamaciones en el tronco y ramas de los árboles afectados (Rosa et al., 2007). El control de la enfermedad es de tipo preventivo y consiste en propagar yemas libres de virus mediante programas de certificación. Otra medida que se recomienda es la desinfección de los instrumentos de poda y corte con hipoclorito de sodio al 1%. En los países con dispersión natural de la enfermedad estas medidas deben completarse con la supresión de fuentes de inóculo (Mukhopadhyay, 2004).

## **2.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.3.1. Recolección de muestras**

Desde febrero hasta abril de 2012 se visitaron cinco viveros localizados en los municipios de Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo, Isabela y Las Marías. En cada uno se recolectaron muestras al azar de la parte media de la planta, se colocaron en bolsas plásticas y se transportaron en nevera hasta el Laboratorio de Diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Juana Díaz donde fueron procesadas para la detección de EC, CVC y CTV. Las fechas de muestreo, localización de los viveros y número de muestras por hospedero se describen en detalle en la Tabla 2.1.

#### **2.3.1.1. Isabela**

La EEA de Isabela se localiza en la zona Noroeste de Puerto Rico, Barrio Guerrero, carretera número dos, kilómetro 114.7. Sus coordenadas geográficas son: Latitud 18° 27.938' N, Longitud 67° 03.146' O, ubicada a 153 msnm. El vivero de la EEA de Isabela mantiene una colección de germoplasma de cítricos en una estructura protegida, que incluye las variedades comerciales de mayor interés para la Isla. Esta colección fue introducida del estado de California con una certificación de sanidad.

Entre las variedades presentes en el vivero están las chinas o naranjas dulces Hamlin, Rhode Red Valencia, Washington Navel, Valencia Campbell, Pera, Marr's Early y Trovita; las mandarinas Encore, Nebo, Clementina, Fallgio y Murcott; los tangelos Mineola y Orlando; las toronjas Rio Red y Star Ruby; los limones Variegated Pink y Seed less Lisbon; y las limas Giant Key Lime, Mexican, Thornless Mexican y Tahití. El muestreo se realizó al azar en el mes de febrero de 2012. Se recolectaron de la parte media de los árboles un total de 50 muestras, pertenecientes a seis especies de cítricos (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Viveros muestreados en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus* agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (EC), *X. fastidiosa* causante de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza (CTV).

Fecha de Colecta	Localización del Vivero	Especie Hospedera	Número de muestras
21-Feb-2012	EEA de Isabela 18° 27.938' N 67° 03.146' O	<i>C. sinensis</i>	23
		<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	7
		<i>C. latifolia</i>	7
		<i>C. reticulata</i>	6
		<i>C. paradisi</i>	4
		<i>C. limon</i>	3
07-Mar-2012	EEA Adjuntas 18° 10.524' N 66° 47.911' O	<i>C. reticulata</i>	17
		<i>C. sinensis</i>	10
		<i>C. latifolia</i>	5
		<i>C. paradisi</i>	2
26-Mar-2012	Jardines de Eneida Cabo Rojo 18° 04.170' N 67° 08.896' O	<i>C. sinensis</i>	10
		<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	4
		<i>C. limon</i>	4
		<i>C. paradisi</i>	1
		<i>C. latifolia</i>	1
		<i>C. aurantifolia</i>	1
02-Abr-2012	Enseñat Las Marías 18° 13.040' N 66° 56.475' O	<i>C. sinensis</i>	11
		<i>C. reticulata</i>	6
		<i>C. latifolia</i>	4
		<i>C. paradisi</i>	4
28-Abr-2012	Byron Pike Arecibo 18° 24.453' N 66° 35.612' O	<i>C. aurantifolia</i>	7
		<i>C. sinensis</i>	8

### **2.3.1.2. Adjuntas**

La EEA de Adjuntas se ubica sobre la carretera 525, kilómetro 2.5, en la zona centro oeste de la Isla. Se encuentra en la Latitud 18° 10.524' N, Longitud 66° 47.911' O y a una altitud de 561 msnm. El vivero de la EEA de Adjuntas posee alrededor de 10,000 plantas de cítricos, que son propagadas a partir de un huerto en la misma estación y distribuidas comercialmente a los agricultores de la zona. Las variedades recolectadas en el mes de marzo de 2012 en el vivero incluyeron las chinas o naranjas dulces Valencia, las mandarinas Encore, Nebo, Ugly y Dancy y la lima Tahití (Tabla 2.1).

### **2.3.1.3. Arecibo**

El vivero Byron Pike se encuentra localizado en la carretera 664, kilómetro 3.3, Barrio Sabana Hoyos en Arecibo. Sus coordenadas geográficas son: Latitud 18° 24.453' N, Longitud 66° 35.612' O, ubicado a 157 msnm. Byron Pike comercializa una gran variedad de plantas ornamentales, medicinales y frutales. Los cítricos presentes en el vivero son la naranja dulce Valencia y el limón del país *C. aurantifolia* (Tabla 2.1).

### **2.3.1.4. Cabo Rojo**

Jardines de Eneida es un vivero comercial que distribuye plantas ornamentales y de cítricos en el oeste de la Isla. Se ubica sobre la carretera 103, kilómetro 8.2 en Cabo Rojo. Se encuentra en la Latitud 18° 04.170' N, Longitud 67° 08.896' O y a una altitud de 31 msnm. Hay aproximadamente 2,000 plantas de cítricos, de las variedades chinas o naranjas dulces Valencia, Page y Washington Navel; las mandarinas Encore, Nebo, Dancy; los tangelos Mineola y Orlando; los limones Variegated Pink y Juliana; toronja Rosada y lima Tahití. En marzo de 2012 se recolectaron en este vivero un total de 21 muestras pertenecientes a seis especies de cítricos (Tabla 2.1).

### **2.3.1.5. Las Marías**

El vivero Enseñat está localizado en la carretera 124, kilómetro 10.7, en el Barrio Bucarabones, Sector Vega Redonda. Se encuentra en la Latitud 18° 13.040' N, Longitud 66° 56.475' O y a una altitud de 218 msnm. Enseñat cuenta con un área de 38 cuerdas, en donde posee facilidades para producir dos millones de semillas de café y doscientos mil plantas de cítricos. Además, posee un huerto de cítricos de donde se obtiene el material de propagación utilizado para preparar injertos de cítricos de diferentes variedades para distribuir a los agricultores. Las variedades de cítricos recolectadas al azar en el vivero fueron las chinas o naranjas dulces Valencia, Page Washington Navel y Pera; las mandarinas Encore, Nebo, Dancy y Ugly; los tangelos Mineola y Orlando; los limones Variegated Pink y Juliana; toronja Rosada y lima Tahití (Tabla 2.1).

### **2.3.2. Detección de enfermedades**

#### **2.3.2.1. Enverdecimiento de los Cítricos**

Para la detección del Enverdecimiento de los cítricos se obtuvieron pequeños fragmentos (100 mg aproximadamente) del peciolo de los folíolos colectados. Se realizó la extracción de ADN mediante el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. La detección de *Ca. L. asiaticus* se realizó amplificando fragmentos de la región 16S del ADN ribosomal por medio de la técnica de PCR. Para esto se utilizó una reacción de 25 µl con el Master Mix Go Green Tag (Promega, Madison, WI) y los iniciadores OI1 (5'CGCCGTATGCAATACGAGCGGCA3') y OI2 (5'GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT 3'), reportados como específicos para *Ca. L. asiaticus* (Gottwald et al. 1989; Jagoueix et al., 1996; Li et al., 2007). Los controles positivos utilizados en cada reacción fueron muestras infectadas con EC provenientes del huerto de *Citrus latifolia* Tanaka de la EEA de Juana Díaz.

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador T-3000 (Biometra®) utilizando un perfil que consistió en una denaturalización inicial a 94°C por dos

minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por un minuto (Li et al., 2007).

Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). Se realizó una electroforesis a 100 V durante 40 minutos, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con un marcador de peso molecular de 1 Kb (Sigma, St. Louis, USA).

### **2.3.2.2. Clorosis Variegada de los Cítricos**

Se utilizó el Kit AGDIA® DAS-ELISA (34501) para detección de *X. fastidiosa* (Agdia, 2011a). A partir de las muestras se tomó parte del pecíolo y de la vena central y se maceró utilizando el buffer general de extracción (kit Agdia®). La relación entre el material vegetal y el volumen de buffer fue de 1:10 (g: ml).

Una vez que todas las muestras estuvieron maceradas, se dispensó 100 µl en las celdas de la placa ELISA. Por cada muestra se realizó dos repeticiones y se incluyeron los controles positivos (kit Agdia®) y negativos (buffer general de extracción). La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente (25°C). Se preparó el diluyente del conjugado enzimático mezclando el componente MRS (kit Agdia®) con el buffer PBST 1X (kit Agdia®), la relación fue de 1:4 (ml: ml). El conjugado enzimático (kit Agdia®) se adicionó a este diluyente, la relación de esta solución fue de 1:100 (ml: ml).

Finalizada la incubación, se desechó el contenido de las celdas de la placa ELISA y se lavó por siete ocasiones con el buffer PBST 1X. Posteriormente, en cada celda se depositó un volumen de 100 µl del conjugado enzimático. La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó por dos horas a temperatura ambiente.

Una vez transcurrió el periodo de incubación, se descartó el contenido de las celdas y se realizó el lavado de la placa con el buffer PBST 1X por ocho veces. Después de secar la placa con papel toalla, se añadió a cada celda 100 µl de sustrato TMB (kit Agdia®) y se incubó por 20 minutos en la cámara húmeda. Los resultados se evaluaron mediante el lector para placas ELISA Biotek (Modelo ELX 808, Vermont, USA) utilizando una longitud de onda de 405 nm. Las

reacciones positivas adquieren una coloración azul y presentan una absorbancia superior a la mitad del valor obtenido con los controles positivos (Sherald y Lei, 1991). Es importante resaltar que de acuerdo con el protocolo de Agdia (2011a), la lectura de los resultados para esta prueba debe hacerse a una longitud de onda de 650 nm.

### **2.3.2.3. Tristeza de los Cítricos**

Se utilizó el Kit AGDIA® TAS-ELISA (SRA78900) para detección de CTV en especies de cítricos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Agdia, 2011b). Inicialmente, se diluyó la solución concentrada del anticuerpo de captura (kit Agdia®) con el buffer de recubrimiento carbonatado (kit Agdia®) con base a la relación 1:200. En cada celda de la placa ELISA se dispuso 100 µl de la solución diluida y se incubó en una cámara húmeda por cuatro horas a temperatura ambiente (25°C).

A partir de cada muestra se realizaron cortes transversales en brotes tiernos y pedicelos de las hojas colectados. Estos fragmentos fueron macerados utilizando el buffer general de extracción (kit Agdia®). La relación entre el material vegetal y el volumen de buffer fue de 1:10 (g:ml). Una vez culminó la incubación de la placa con el anticuerpo de captura, las celdas fueron lavadas por dos ocasiones con el buffer PBST 1X (kit Agdia®) y se adicionó 100 µl del material vegetal macerado, los controles positivos (kit Agdia®) y negativos (buffer general de extracción). Por cada muestra se realizaron dos repeticiones y se incubó en cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.

El conjugado enzimático se preparó diluyendo la fosfatasa alcalina (botella A) y el anticuerpo de detección (botella B) con el buffer ECI, todos suministrados por el kit de Agdia®. La mezcla de las botellas A y B con el buffer se realizó de acuerdo a la relación 1:200. Al terminar el periodo de incubación, las celdas fueron lavadas por siete veces con el buffer PBST 1X y se adicionó 100 µl de la solución con el conjugado enzimático por cada una de las celdas. La placa se incubó en cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.

La solución PNP (kit Agdia®) se preparó disolviendo una tableta PNP (ACC 00404) en 5 ml del buffer PNP 1X, para obtener una concentración de 1 mg/l suficiente para utilizar en 40 celdas. Después de las dos horas de incubación, la placa fue lavada por ocho ocasiones con el buffer PBST 1X y se depositó 100 µl de la solución PNP en cada una de las celdas. Se incubó

por 20 minutos en la cámara húmeda. Los resultados se evaluaron mediante el lector para placas ELISA Biotek (Modelo ELX 808, Vermont, USA) utilizando una longitud de onda de 405 nm. Las reacciones positivas adquieren una coloración amarilla y presentan una absorbancia superior a la mitad del valor obtenido con los controles positivos (Iracheta-Cárdenas et al., 2009).

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1. Recolección de muestras

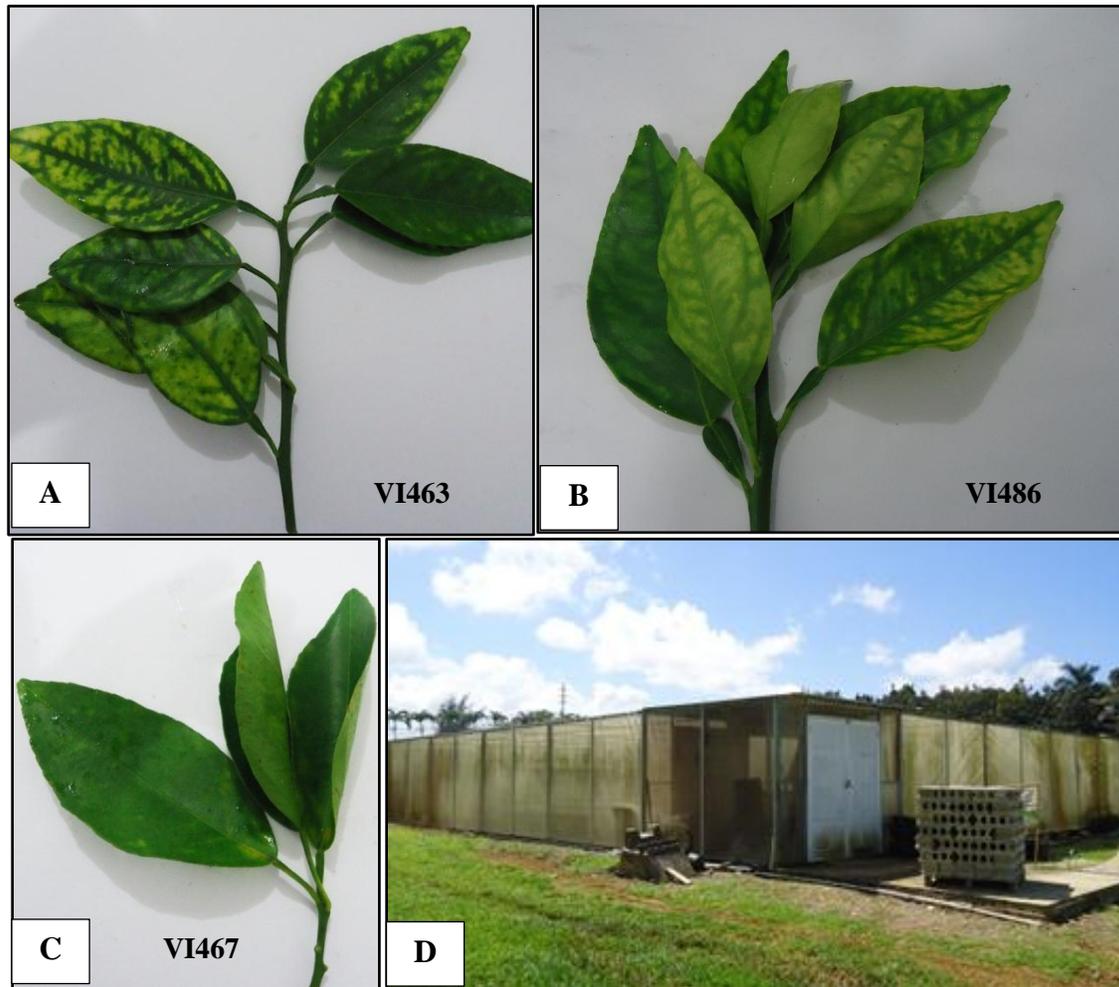
#### 2.4.1.1. Isabela

En el vivero de la EEA de Isabela se recolectó un total de 50 muestras, de las cuales 23 fueron de naranja (*C. sinensis*), siete de tangelo (*C. reticulata x C. paradisi*), siete de lima Tahití (*C. latifolia*), seis muestras de mandarinas (*C. reticulata*), cuatro de pomelos (*C. paradisi*) y tres muestras de limones (*C. limon*) (Tabla 2.1). En Isabela las plantas de cítricos en el vivero de cuatro años fueron injertadas tan pronto llegaron de California. De los cinco viveros visitados, el de Isabela es el único que mantiene todo el material de cítricos bajo una estructura protegida a prueba de insectos vectores (Figura 2.1D).

En 12 muestras de naranja, una de tangelo y una de mandarina provenientes de la EEA de Isabela se observaron síntomas de deficiencia de zinc (Figura 2.1A). Estos síntomas incluyen amarillamiento del tejido localizado entre las venas foliares mientras el tejido adyacente a las venas secundarias y primarias permanece verde, y presencia de hojas pequeñas causado por una fuerte inhibición de la elongación de los entrenudos (Mattos-Junior et al., 2005).

En tres muestras de lima Tahití, naranja, y mandarina de la EEA de Isabela se observaron síntomas de deficiencia de magnesio (Figura 2.1B). Los síntomas se caracterizan por una clorosis que se extiende gradualmente a lo largo de los márgenes de la hoja, hasta cubrirla casi por completo, a excepción de una pequeña área que permanece verde en la base de la misma (Whiteside et al., 1993).

En el vivero de la EEA de Isabela se colectaron diez muestras de naranja, seis tangelo y lima Tahití, cuatro mandarinas y pomelos, y tres limones sin ninguna sintomatología. Las hojas estaban verdes, con el tamaño adecuado para su edad y sin malformaciones (Figura 2.1C).



**Figura 2.1.** Muestras de cítricos colectadas en el vivero de la EEA de Isabela. **(A)** VI463: Tangelo con síntomas de deficiencias de Zinc. **(B)** VI486: Lima Tahití con síntomas de deficiencia de Magnesio. **(C)** VI467: Muestra de Tangelo asintomática. **(D)** Vivero de cítricos en la EEA de Isabela.

### 2.4.1.2. Adjuntas

En el vivero de la EEA de Adjuntas se colectó 34 muestras, el 50% mandarinas (*C. reticulata*), diez naranjas (*C. sinensis*), cinco lima Tahití (*C. latifolia*) y dos muestras de pomelos (*C. parasidi*) (Tabla 2.1). Las plantas de cítricos muestreadas tenían una edad promedio de seis meses y son comercializadas entre los agricultores de la zona.

En 23 plantas de mandarina, pomelo, lima Tahití y naranja se observaron síntomas de deficiencia de magnesio (Whiteside et al., 1993), con clorosis que se extendía a lo largo de los márgenes de la hoja y con una pequeña área que permanece verde en la base de la misma (Figura 2.2A).

En dos muestras de mandarina se observaron hojas asimétricas con un leve engrosamiento de la nervadura central (Figura 2.2B, izquierda). En una muestra de pomelo, cuatro de naranja y cuatro de mandarina se identificaron hojas con un moteado verde claro desarrollado en el área intervenal, mientras que las nervaduras permanecían verdes (Figura 2.2B, derecha). De acuerdo con Whiteside et al., (1993) y Boaretto et al. (2008) esta sintomatología es característica de una deficiencia de manganeso y es común en huertos y viveros de cítricos.



**Figura 2.2.** Muestras de cítricos colectadas en el vivero de la EEA de Adjuntas. **(A)** VA520: mandarina con síntomas de deficiencia de magnesio. **(B)** VA545: mandarina con síntomas de deficiencia de manganeso.

### 2.4.1.3. Arecibo

En el vivero comercial Byron Pike en Arecibo se evaluaron siete muestras de limón del país (*C. aurantifolia*) y ocho de naranja (*C. sinensis*) (Tabla 2.1). Las plantas presentaban una edad entre seis y ocho meses, y se encontraban en un área abierta junto con plantas ornamentales de la familia Passifloraceae (Figura 2.3A).

Las naranjas presentaban un engrosamiento leve en la nervadura central y hojas con moteado verde claro en la superficie intervenal, síntoma característico de una deficiencia de manganeso (Figura 2.3B). En cuatro muestras de limones se observaron hojas pequeñas y amarillamiento del tejido localizado entre las venas foliares (Figura 2.3C), lo cual generalmente se asocia con deficiencias de zinc y enfermedades sistémicas como la CVC (Mattos-Junior et al., 2005; Janse y Obradovic, 2010).

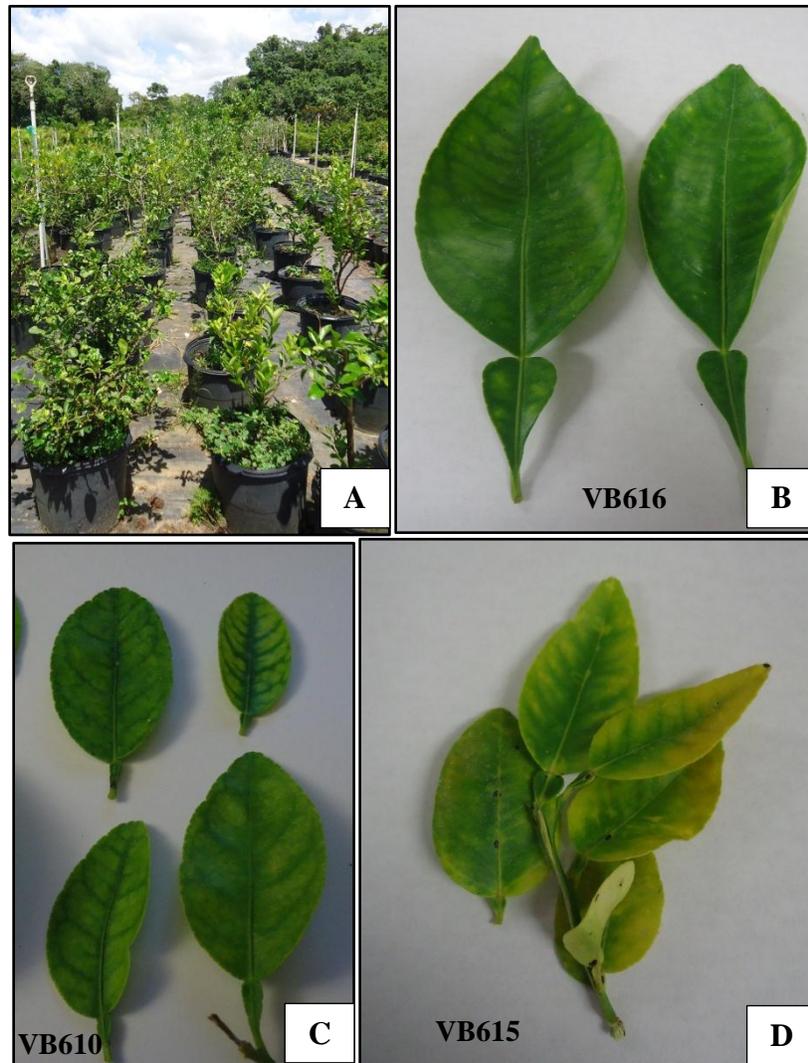
Tres de las muestras de *C. aurantifolia* presentaban amarillamiento a lo largo de los márgenes de las hojas, mientras que las zonas cercanas a la nervadura central permanecen de color verde. En la Figura 2.3D se observa éste síntoma, descrito por Boaretto et al. (2008) como una deficiencia de magnesio.

### 2.4.1.4. Cabo Rojo

En Jardines de Eneida se colectaron 21 muestras, de las cuales diez fueron naranjas (*C. sinensis*), cuatro tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*), cuatro limones (*C. limon*), un pomelo (*C. parasidi*), una lima Tahití (*C. latifolia*) y un limón del país (*C. aurantifolia*) (Tabla 2.1). Las plantas del vivero tenían una edad promedio de seis a ocho meses y son comercializadas en la zona oeste de la Isla. Tres muestras de tangelo y cuatro de naranja presentaron engrosamiento y aclaramiento de las nervaduras, con moteados o islas verdes distribuido de manera asimétrica en la superficie intervenal de las hojas (Figura 2.4A). De acuerdo con Irej et al. (2006) y Bové (2006) ésta sintomatología es característica del daño ocasionado por el agente causal del EC, *Ca. L. asiaticus*, al invadir el floema de las plantas de cítricos.

En las muestras procedentes de Cabo Rojo, los limones, la lima Tahití y dos muestras de naranja presentaron hojas con clorosis intervenal y un leve aclaramiento de la nervadura central (Figura 2.4B). Aunque éste síntoma también podría asociarse a la presencia de patógenos

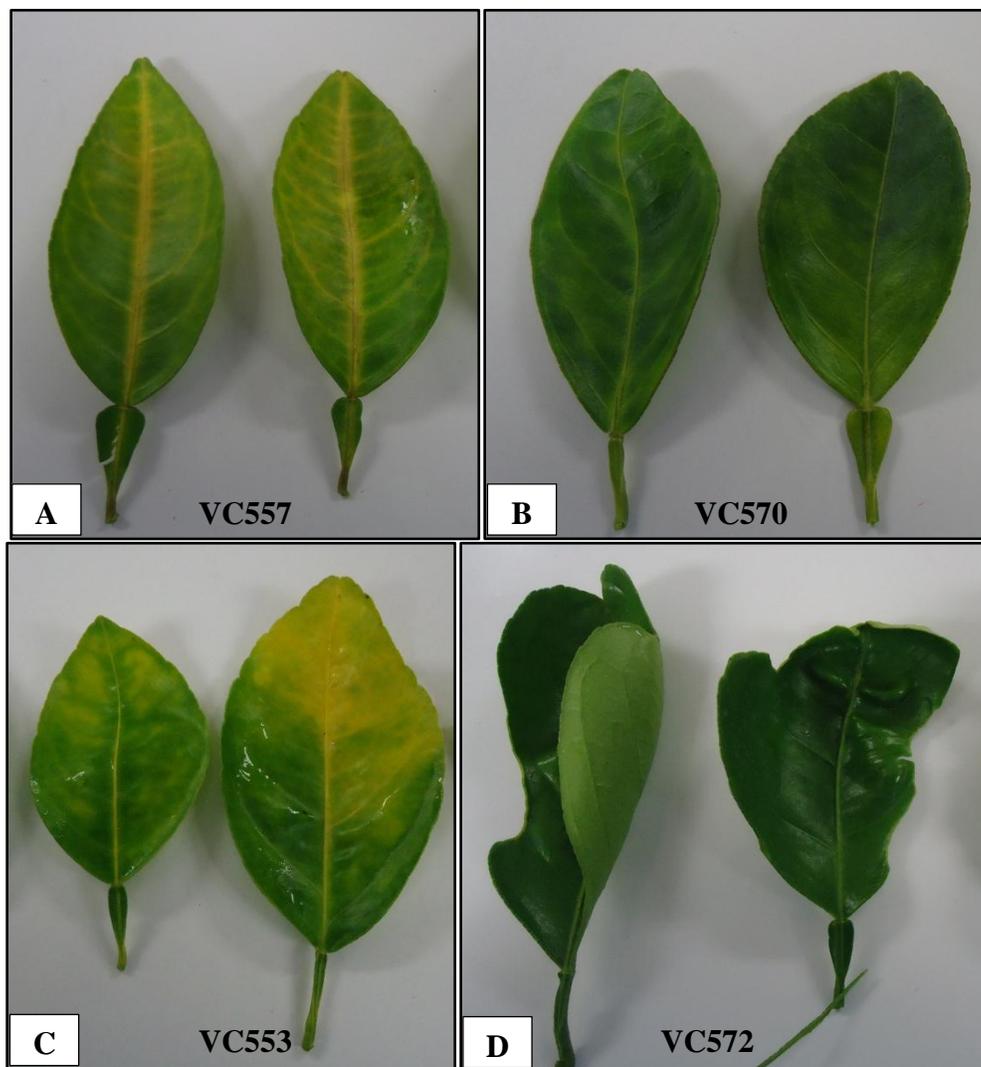
sistémicos (Lee, 2008) como *Ca. L. asiaticus*, *X. fastidiosa*, CTV, viroides y fitoplasmas, Boaretto et al. (2008) lo describen como una deficiencia del manganeso.



**Figura 2.3.** (A) Cítricos del vivero Byron Pike en Arecibo. (B) VB616: naranja con síntomas de deficiencia de manganeso. (C) VB610: limón del país con deficiencias de zinc. (D) VB615: limón del país con síntomas de deficiencia de magnesio.

En Cabo Rojo, las hojas de una muestra de tangelo presentaban amarillamiento en el ápice, que cubría gran parte de la superficie del foliolo, así como un aclaramiento de la nervadura central (Figura 2.4C). Molina (2001) asocia dicha sintomatología con la deficiencia de potasio,

elemento que interviene en diferentes procesos fisiológicos como la formación de azúcares y almidones, síntesis de proteínas, crecimiento y división celular, entre otros.



**Figura 2.4.** Muestras de cítricos colectadas en el vivero Jardines de Eneida, Cabo Rojo. **(A)** VC557: tangelo con aclaramiento y engrosamiento de las nervaduras. **(B)** VC570: naranja con aclaramiento de la nervadura central **(C)** VC553: tangelo con síntomas de deficiencia de potasio **(D)** VC572: naranja con hojas deformadas y asimétricas.

En la Figura 2.4D se observan hojas de naranja deformadas, con márgenes difusos que no guardan simetría a ambos lados la nervadura central. Algunos autores asocian ésta sintomatología en las hojas con la presencia de enfermedades como el EC (Irey et al., 2006) y

con las etapas iniciales del síndrome de aclaramiento ocasionado por el CTV (Moreno et al., 2008).

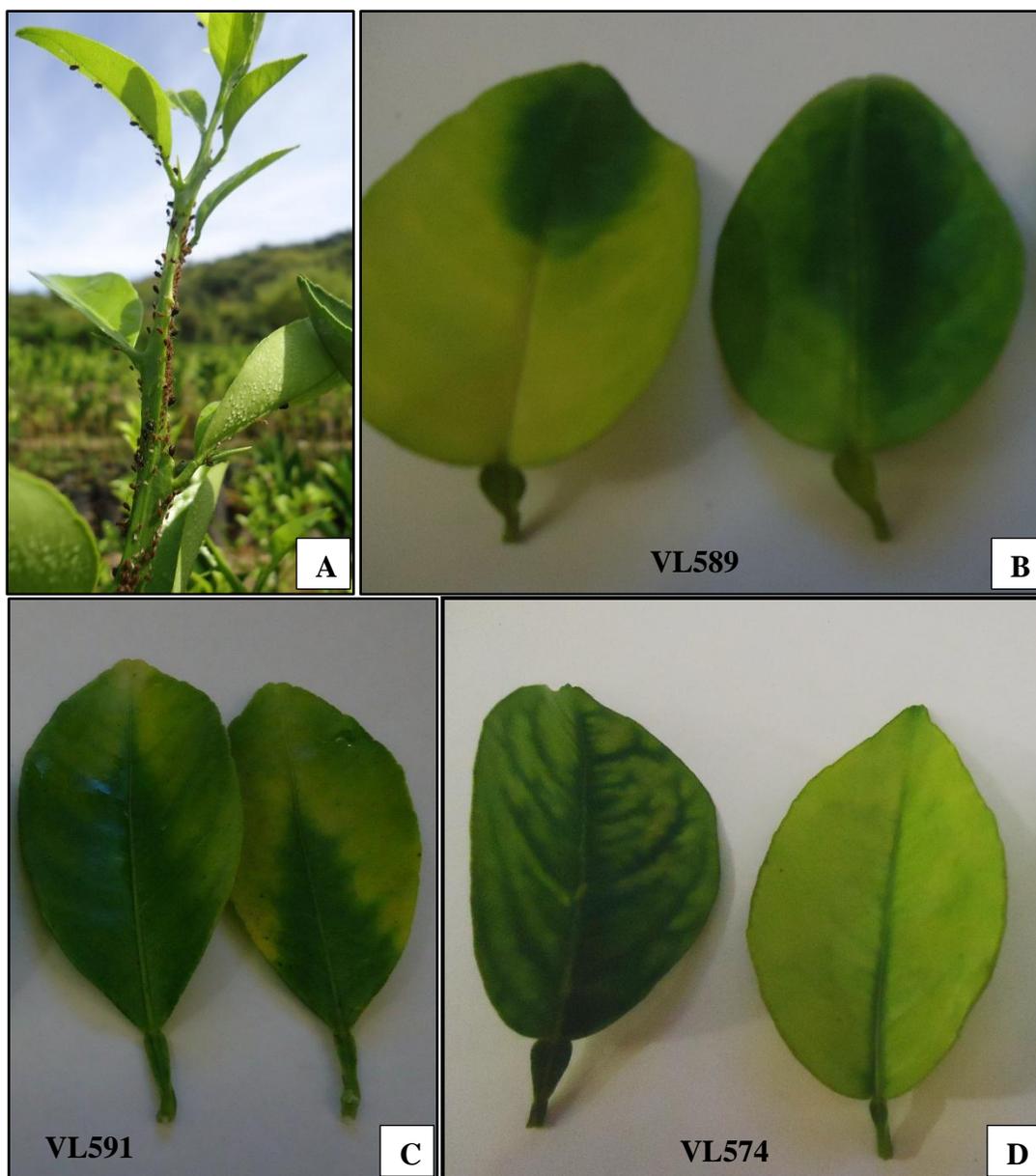
#### **2.4.1.5. Las Marías**

En el vivero Enseñat se recolectaron 11 muestras de naranja (*C. sinensis*), seis mandarinas (*C. reticulata*), cuatro limas Tahití (*C. latifolia*) y cuatro pomelos (*C. paradisi*) (Tabla 2.1). Las naranjas tenían una edad entre seis y nueve meses. Las mandarinas y pomelos muestreadas eran de cinco meses y las limas Tahití de siete meses.

Las plantas en el vivero se mantienen a cielo abierto, expuestas a la presencia de insectos plaga como áfidos (Figura 2.5A), que fueron observados durante la toma de muestras afectando a plantas de *C. sinensis*. Los áfidos son insectos chupadores que causan deformaciones en las hojas y brotes, y además son vectores de enfermedades como el CTV (Gottwald et al., 1998). Las especies de áfidos reportadas afectando cítricos en Puerto Rico son *T. citricida*, *T. aurantii* y *A. spiraecola* (Alvarado y Zamora, 2007).

En naranja y mandarina provenientes de Las Marías se observaron hojas con amarillamiento y moteado o islas verdes distribuidas de manera desigual a partir de la nervadura central, que no presentaba aclaramiento o engrosamiento (Figura 2.5B). El patrón de dicho moteado en las hojas es característico del EC, debido a que generalmente las deficiencias nutricionales presentan un patrón simétrico en la superficie foliar (Bové, 2006; Brlansky y Rogers, 2007).

En muestras de limas Tahití, pomelos y mandarinas de Las Marías se identificaron síntomas característicos de una deficiencia de magnesio (Figura 2.5C), con amarillamiento alrededor de los márgenes de las hojas y la base de color verde (Whiteside et al., 1993). En la figura 2.5D se observa una hoja de naranja con síntomas relacionados con deficiencias de zinc, donde hay un amarillamiento intervenal y las nervaduras permanecen verdes (Mattos-Junior et al., 2005). En naranjas y mandarinas también se observaron hojas cloróticas, delgadas y un poco frágiles (Figura 2.5D), lo que puede estar asociado a una deficiencia de nitrógeno en las plantas de cítricos (Molina, 2001).



**Figura 2.5.** Muestras colectadas en el vivero Enseñat, Las Marías. **(A)** Presencia de áfidos en las plantas de cítricos. **(B)** VL589: naranja con moteado irregular en las hojas. **(C)** VL591: lima Tahití con síntomas de deficiencia de magnesio. **(D)** VL574: naranja con hojas cloróticas y síntomas de deficiencia de zinc.

En ninguna de las 145 muestras colectadas se observaron lesiones circulares de color marrón en las hojas, características del cancro de los cítricos (Schubert et al., 2001). Del mismo modo, no se identificaron las lesiones oscuras y moteadas asociadas con el hongo *G. citricarpa*, causante de la mancha negra de los cítricos (Goes y Feichtenberger, 1993; Chung et al., 2009).

Estas enfermedades constituyen un riesgo para la producción de cítricos en Puerto Rico, debido a que pueden llegar inadvertidamente a la Isla a través del movimiento de material propagativo, importación de frutas o condiciones climáticas que pueden favorecer la diseminación de estos patógenos en la cuenca del Caribe (Lee, 2008; USDA, 2011).

En los cinco viveros se identificaron síntomas relacionados con deficiencia de nutrientes como magnesio, zinc, potasio, manganeso y nitrógeno. Las concentraciones demasiado bajas de nutrientes provocan insuficiencias que promueven la presencia de trastornos característicos en las raíces, tallos, hojas o frutos de las plantas. Lo mismo ocurre con las concentraciones en exceso que provocan toxicidades (Mattos-Junior et al., 2005). Los síntomas pueden confundirse si hay deficiencia o toxicidad de más de un elemento (Molina, 2001).

Otros factores, como enfermedades asociadas al sistema vascular de las plantas, pueden provocar síntomas muy parecidos, debido a que obstruyen el transporte de nutrientes a través del xilema o floema. Tal es el caso de *X. fastidiosa*, que afecta el xilema y causa una sintomatología similar a la deficiencia de zinc en hojas de cítricos (Janse y Obradovic, 2010). Mientras desde el floema, *Ca. L. asiaticus* ocasiona síntomas foliares que se confunden con deficiencias de zinc, manganeso y cobre (Bové, 2006; Irej et al., 2006; Brlansky y Rogers, 2007).

Una citricultura exitosa en Puerto Rico debe implementar protocolos de diagnóstico de enfermedades en viveros, control de insectos vectores y mejorar las condiciones nutricionales de las plantas durante su propagación. Si los elementos requeridos se abastecen en cantidades adecuadas, las plantas tienen una mayor capacidad para protegerse de nuevas infecciones y limitar las ya existentes, que cuando uno o más nutrientes se obtienen en cantidades excesivas o deficientes (Bonilla, 2002).

## **2.4.2. Detección de enfermedades**

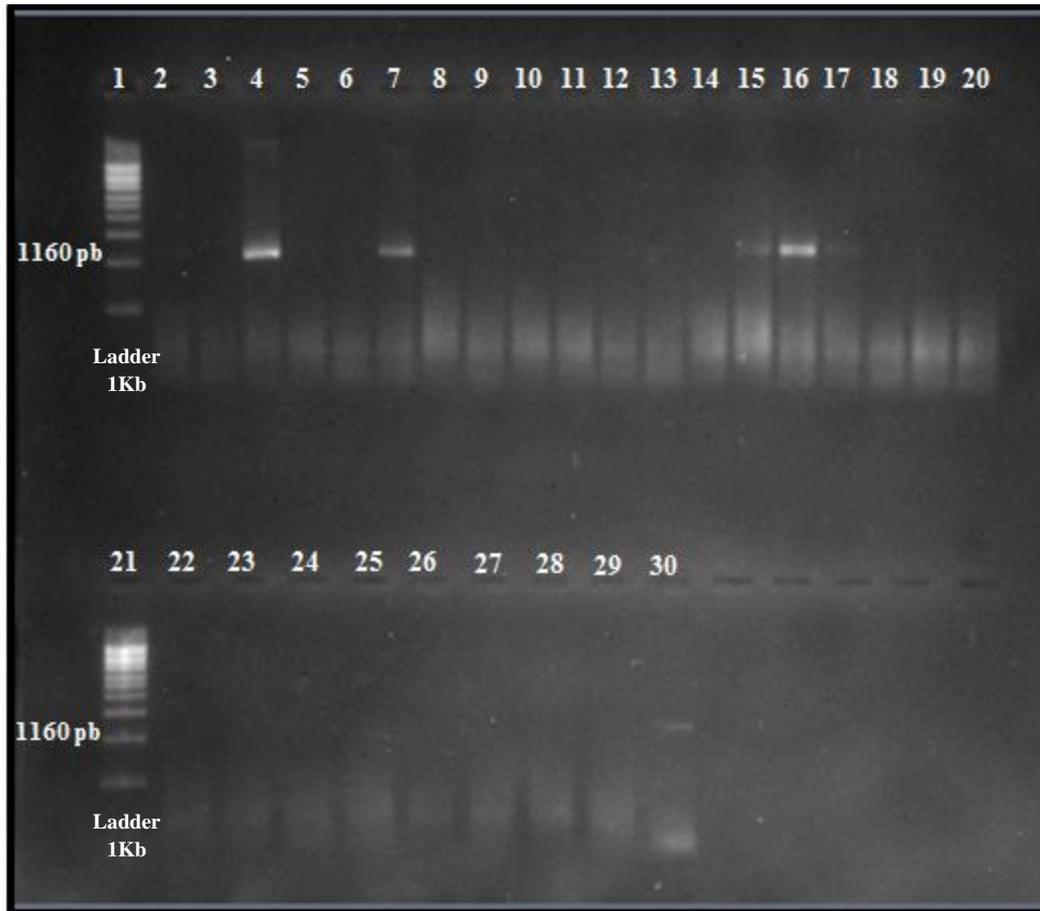
### **2.4.2.1. Enverdecimiento de los Cítricos**

Se analizaron mediante PCR un total de 145 muestras provenientes de viveros de Isabela, Adjuntas, Arecibo, Cabo Rojo y Las Marías. La presencia de *Ca. L. asiaticus* se detectó en cuatro muestras de *C. sinensis* (VL576, VL587, VL588 y VL589) y una de *C. reticulata* (VL579) colectadas en el vivero Enseñat, en Las Marías (Tabla 2.2, Figura 2.6). Las muestras de

*C. sinensis* presentaban nervaduras engrosadas y con aclaramiento, hojas amarillas y moteado o islas verdes distribuidas de manera desigual a partir de la nervadura central (Figura 2.5B). En la muestra de *C. reticulata* se observaron síntomas asociados con deficiencia de zinc en las hojas. De acuerdo con Bové (2006) y Brlansky y Rogers (2007) esta sintomatología es característica del EC, sin embargo recomiendan su diagnóstico mediante técnicas moleculares.

En esta investigación se utilizó la técnica de PCR convencional, considerada como uno de los métodos más confiables y utilizados a nivel mundial para el diagnóstico del EC (Li et al., 2007). En la figura 2.6 se observan los productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos OI1/OI2, que mostraron un fragmento de 1,160 pb, correspondiente a la bacteria *Ca. L. asiaticus* (Gottwald et al., 1989; Jagoueix et al., 1996; Li et al., 2007).

El vector *D. citri* no fue observado durante la recolección de muestras en los cinco viveros. En Isabela, Adjuntas, Arecibo y Cabo Rojo se identificaron síntomas similares a los encontrados en Las Marías (Figuras 2.1-2.5), sin embargo no se detectó la bacteria *Ca. L. asiaticus* en las plantas evaluadas. Ramos-Méndez (2008) establece que en muchas ocasiones los síntomas del EC en las hojas pueden confundirse con deficiencias de micronutrientes como zinc, hierro, calcio, magnesio, manganeso y cobre. El EC se caracteriza por ser una enfermedad difícil de diagnosticar debido a la naturaleza no específica de sus síntomas, la latencia prolongada de los mismos y la distribución irregular del patógeno en las plantas (Manjunath et al., 2008).



**Figura 2.6.** Muestras del vivero Enseñat en Las Marías. Gel de agarosa con los productos de 1,160 pb amplificados mediante PCR con los iniciadores OI1/OI2, específicos para *Ca. L. asiaticus*. 1 y 21: marcador de peso molecular 1Kb, 28 y 29: Control negativo, 30: Control Positivo, 2: VL574, 3: VL575, 4: VL576, 5: VL577, 6: VL578, 7: VL579, 8: VL580, 9: VL581, 10: VL582, 11: VL583, 12: VL584, 13: VL585, 14: VL586, 15: VL587, 16: VL588, 17: VL589, 18: VL590, 19: VL591, 20: VL592, 22: VL593, 23: VL594, 24: VL595, 25: VL596, 26: VL597, 27: VL598.

**Tabla 2.2.** Detección de *Ca. L. asiaticus* mediante PCR con los iniciadores específicos OI1/OI2 en los cinco viveros muestreados.

Vivero	Identificación de la Muestra	Especie hospedera	PCR: OI1/OI2 para <i>Ca. L. asiaticus</i>
EEA de Isabela	VI462	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI463	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI464	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI465	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI466	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI467	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI468	<i>C. latifolia</i>	-
	VI469	<i>C. paradisi</i>	-
	VI470	<i>C. paradisi</i>	-
	VI471	<i>C. paradisi</i>	-
	VI472	<i>C. paradisi</i>	-
	VI473	<i>C. sinensis</i>	-
	VI474	<i>C. sinensis</i>	-
	VI475	<i>C. sinensis</i>	-
	VI476	<i>C. sinensis</i>	-
	VI477	<i>C. sinensis</i>	-
	VI478	<i>C. sinensis</i>	-
	VI479	<i>C. sinensis</i>	-
	VI480	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VI481	<i>C. sinensis</i>	-
	VI482	<i>C. sinensis</i>	-
	VI483	<i>C. sinensis</i>	-
	VI484	<i>C. sinensis</i>	-
	VI485	<i>C. sinensis</i>	-
	VI486	<i>C. latifolia</i>	-
	VI487	<i>C. sinensis</i>	-
	VI488	<i>C. sinensis</i>	-
	VI489	<i>C. sinensis</i>	-
	VI490	<i>C. sinensis</i>	-
	VI491	<i>C. sinensis</i>	-
	VI492	<i>C. sinensis</i>	-
	VI493	<i>C. sinensis</i>	-
	VI494	<i>C. sinensis</i>	-
VI495	<i>C. sinensis</i>	-	
VI496	<i>C. sinensis</i>	-	
VI497	<i>C. sinensis</i>	-	
VI498	<i>C. reticulata</i>	-	
VI499	<i>C. reticulata</i>	-	
VI500	<i>C. reticulata</i>	-	
VI501	<i>C. reticulata</i>	-	

**Tabla 2.2.** Detección de *Ca. L. asiaticus* mediante PCR con los iniciadores específicos OI1/OI2 en los cinco viveros muestreados (continuación).

Vivero	Identificación de la Muestra	Especie hospedera	PCR: OI1/OI2 para <i>Ca. L. asiaticus</i>
EEA de Isabela	VI502	<i>C. latifolia</i>	-
	VI503	<i>C. latifolia</i>	-
	VI504	<i>C. latifolia</i>	-
	VI505	<i>C. latifolia</i>	-
	VI506	<i>C. limon</i>	-
	VI507	<i>C. limon</i>	-
	VI508	<i>C. latifolia</i>	-
	VI509	<i>C. reticulata</i>	-
	VI510	<i>C. limon</i>	-
	VI511	<i>C. reticulata</i>	-
	EEA de Adjuntas	VA512	<i>C. reticulata</i>
VA513		<i>C. reticulata</i>	-
VA514		<i>C. latifolia</i>	-
VA515		<i>C. latifolia</i>	-
VA516		<i>C. latifolia</i>	-
VA517		<i>C. latifolia</i>	-
VA518		<i>C. latifolia</i>	-
VA519		<i>C. reticulata</i>	-
VA520		<i>C. reticulata</i>	-
VA521		<i>C. reticulata</i>	-
VA522		<i>C. reticulata</i>	-
VA523		<i>C. reticulata</i>	-
VA524		<i>C. paradisi</i>	-
VA525		<i>C. paradisi</i>	-
VA526		<i>C. sinensis</i>	-
VA527		<i>C. sinensis</i>	-
VA528		<i>C. sinensis</i>	-
VA529		<i>C. sinensis</i>	-
VA530		<i>C. sinensis</i>	-
VA531		<i>C. sinensis</i>	-
VA532		<i>C. sinensis</i>	-
VA533		<i>C. sinensis</i>	-
VA534		<i>C. sinensis</i>	-
VA535		<i>C. sinensis</i>	-
VA536		<i>C. reticulata</i>	-
VA537		<i>C. reticulata</i>	-
VA538		<i>C. reticulata</i>	-
VA539		<i>C. reticulata</i>	-
VA540		<i>C. reticulata</i>	-
VA541		<i>C. reticulata</i>	-

**Tabla 2.2.** Detección de *Ca. L. asiaticus* mediante PCR con los iniciadores específicos OI1/OI2 en los cinco viveros muestreados (continuación).

Vivero	Identificación de la Muestra	Especie hospedera	PCR: OI1/OI2 para <i>Ca. L. asiaticus</i>
EEA de Adjuntas	VA542	<i>C. reticulata</i>	-
	VA543	<i>C. reticulata</i>	-
	VA544	<i>C. reticulata</i>	-
	VA545	<i>C. reticulata</i>	-
Jardines de Eneida Cabo Rojo	VC553	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VC554	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VC555	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VC556	<i>C. sinensis</i>	-
	VC557	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
	VC558	<i>C. limon</i>	-
	VC559	<i>C. paradisi</i>	-
	VC560	<i>C. aurantifolia</i>	-
	VC561	<i>C. latifolia</i>	-
	VC562	<i>C. sinensis</i>	-
	VC563	<i>C. sinensis</i>	-
	VC564	<i>C. limon</i>	-
	VC565	<i>C. limon</i>	-
	VC566	<i>C. limon</i>	-
	VC567	<i>C. sinensis</i>	-
	VC568	<i>C. sinensis</i>	-
	VC569	<i>C. sinensis</i>	-
	VC570	<i>C. sinensis</i>	-
	VC571	<i>C. sinensis</i>	-
VC572	<i>C. sinensis</i>	-	
VC573	<i>C. sinensis</i>	-	
Enseñat Las Marías	VL574	<i>C. sinensis</i>	-
	VL575	<i>C. sinensis</i>	-
	VL576	<i>C. sinensis</i>	+
	VL577	<i>C. reticulata</i>	-
	VL578	<i>C. reticulata</i>	-
	VL579	<i>C. reticulata</i>	+
	VL580	<i>C. reticulata</i>	-
	VL581	<i>C. sinensis</i>	-
	VL582	<i>C. sinensis</i>	-
	VL583	<i>C. sinensis</i>	-
	VL584	<i>C. reticulata</i>	-
	VL585	<i>C. reticulata</i>	-
	VL586	<i>C. sinensis</i>	-
	VL587	<i>C. sinensis</i>	+
VL588	<i>C. sinensis</i>	+	

**Tabla 2.2.** Detección de *Ca. L. asiaticus* mediante PCR con los iniciadores específicos OI1/OI2 en los cinco viveros muestreados (continuación).

Vivero	Identificación de la Muestra	Especie hospedera	PCR: OI1/OI2 para <i>Ca. L. asiaticus</i>
Enseñat  Las Marías	VL589	<i>C. sinensis</i>	+
	VL590	<i>C. sinensis</i>	-
	VL591	<i>C. latifolia</i>	-
	VL592	<i>C. latifolia</i>	-
	VL593	<i>C. paradisi</i>	-
	VL594	<i>C. paradisi</i>	-
	VL595	<i>C. paradisi</i>	-
	VL596	<i>C. paradisi</i>	-
	VL597	<i>C. latifolia</i>	-
	VL598	<i>C. latifolia</i>	-
Byron Pike  Arecibo	VB610	<i>C. aurantifolia</i>	-
	VB611	<i>C. sinensis</i>	-
	VB612	<i>C. aurantifolia</i>	-
	VB613	<i>C. sinensis</i>	-
	VB614	<i>C. sinensis</i>	-
	VB615	<i>C. aurantifolia</i>	-
	VB616	<i>C. sinensis</i>	-
	VB617	<i>C. aurantifolia</i>	-
	VB618	<i>C. sinensis</i>	-
	VB619	<i>C. sinensis</i>	-
	VB620	<i>C. aurantifolia</i>	-
	VB621	<i>C. sinensis</i>	-
	VB622	<i>C. sinensis</i>	-
	VB623	<i>C. aurantifolia</i>	-
VB624	<i>C. aurantifolia</i>	-	

### 2.4.2.2. Clorosis Variegada de los Cítricos

Mediante la técnica DAS-ELISA se evaluaron las muestras de los viveros de Isabela, Adjuntas, Cabo Rojo, Arecibo y Las Marías para detección de *X. fastidiosa*, agente causal de la CVC. En los cinco viveros se observaron síntomas de amarillamiento del tejido localizado entre las venas foliares, mientras que el tejido adyacente a las venas secundarias y primarias permanece verde (Figuras 2.1-2.5). Esta sintomatología es asociada con deficiencias de zinc en la planta y con la CVC (Mattos-Junior et al., 2005; Janse y Obradovic, 2010). No obstante, sólo la muestra de *C. limon* (VC566) colectada en Cabo Rojo resultó positiva a *X. fastidiosa*, con una absorbancia de 0.756. A una longitud de onda de 405 nm, el control positivo presentó una absorbancia de 1.345, mientras que el negativo fue de 0.049 (Tabla 2.5).

Los síntomas del limón VC566 con CVC fueron hojas débiles, deformadas, con amarillamiento alrededor de las márgenes y aclaramiento de las nervaduras (Figura 2.7). Sin embargo, los síntomas comunes de la CVC corresponden a pequeñas manchas cloróticas intervenales, muy similares a los síntomas de deficiencia de zinc. En etapas más avanzadas de la CVC, se observan manchas marrones necróticas en el envés, correspondientes a las áreas cloróticas sobre el haz de las hojas afectadas (Janse y Obradovic, 2010).



**Figura 2.7.** *Citrus limon* colectado en Cabo Rojo, positivo para CVC mediante la técnica DAS-ELISA.

Las muestras de la EEA de Isabela presentaron un valor máximo de absorbancia de 0.168. El control positivo para esta reacción fue de 0.514 y el negativo 0.052 (Tabla 2.3). Con el material colectado en Adjuntas también se evidenció una reacción ELISA negativa, las absorbancias oscilaron entre 0.044 y 0.089, mientras que el control positivo fue de 0.493 (Tabla 2.4).

La absorbancia del control positivo para las muestras de Las Marías fue de 1.069, mientras que la del negativo fue de 0.067. En la muestra de *C. sinensis* VL588, que resultó positiva para EC (Figura 2.6, Tabla 2.2), se observó un leve cambio de coloración. Sin embargo, la absorbancia fue de 0.203, valor que no supera la mitad del valor mostrado por el control positivo. Lo mismo sucedió con la muestra de *C. reticulata* VL580 con la que se obtuvo una absorbancia de 0.201 (Tabla 2.6).

En la Tabla 2.7 se muestran los resultados obtenidos en la reacción ELISA para CVC de las muestras de Arecibo. Las absorbancias variaron entre 0.135 y 0.316, valores relativamente altos al compararlos con los datos de los otros viveros, no obstante, no se evidenció un cambio de coloración y ninguna de las muestras superó el valor del control positivo que fue de 0.973.

La prueba DAS-ELISA con la que se evaluó la presencia de la CVC en los cinco viveros es ampliamente utilizada para el diagnóstico de *X. fastidiosa* a nivel mundial (Batista et al., 2008). Fue desarrollada a partir de una mezcla de anticuerpos de tres aislamientos serológicamente diferentes de *X. fastidiosa* (Agdia, 2011a), lo que le confiere una alta especificidad. Sherald y Lei (1991) evaluaron esta técnica para detectar la presencia de *X. fastidiosa* en diferentes hospederos y la recomiendan como una herramienta de diagnóstico rápida y efectiva. No obstante, es importante mencionar que en Puerto Rico, Zapata y colaboradores encontraron algunas reacciones no específicas utilizando el kit comercial DAS-ELISA para *X. fastidiosa* (M. Zapata, 2012. Comunicación personal).

**Tabla 2.3.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero de la EEA de Isabela, Puerto Rico.

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
Control negativo	0.052	0.001	-	0.085	0.001	-
Control positivo	0.514	0.002	+	1.447	0.089	+
VI462	0.076	0.005	-	0.094	0.013	-
VI463	0.168	0.049	-	0.070	0.013	-
VI464	0.172	0.031	-	0.097	0.013	-
VI466	0.082	0.032	-	0.084	0.002	-
VI468	0.075	0.002	-	0.085	0.002	-
VI469	0.058	0.000	-	0.107	0.023	-
VI471	0.057	0.000	-	0.416	0.421	-
VI474	0.077	0.006	-	0.460	0.443	-
VI476	0.061	0.001	-	0.081	0.001	-
VI477	0.065	0.003	-	0.083	0.002	-
VI478	0.079	0.021	-	0.079	0.000	-
VI479	0.057	0.004	-	0.092	0.009	-
VI480	0.052	0.004	-	0.089	0.006	-
VI481	0.058	0.001	-	0.087	0.005	-
VI482	0.055	0.002	-	0.096	0.001	-
VI483	0.058	0.003	-	0.335	0.223	-
VI485	0.056	0.003	-	0.082	0.006	-
VI486	0.052	0.004	-	0.077	0.001	-
VI487	0.061	0.013	-	0.080	0.001	-
VI490	0.052	0.001	-	0.078	0.001	-
VI491	0.067	0.006	-	0.081	0.010	-
VI492	0.068	0.001	-	0.082	0.003	-
VI493	0.061	0.004	-	0.088	0.010	-
VI494	0.056	0.001	-	0.080	0.001	-
VI495	0.053	0.001	-	0.095	0.020	-
VI496	0.052	0.000	-	0.082	0.003	-
VI497	0.168	0.005	-	0.074	0.007	-
VI498	0.067	0.004	-	0.080	0.004	-

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;  
<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

**Tabla 2.3.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero de la EEA de Isabela, Puerto Rico (continuación).

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
VI499	0.060	0.001	-	0.087	0.011	-
VI503	0.059	0.009	-	0.082	0.003	-
VI506	0.058	0.006	-	0.080	0.004	-
VI508	0.060	0.004	-	0.083	0.005	-
VI509	0.061	0.008	-	0.100	0.016	-
VI510	0.055	0.004	-	0.082	0.018	-

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;

<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

**Tabla 2.4.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero de la EEA de Adjuntas, Puerto Rico.

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
Control negativo	0.045	0.010	-	0.029	0.001	-
Control positivo	0.493	0.014	+	2.595	0.073	+
VA512	0.054	0.057	-	1.963	0.057	+
VA513	0.062	0.025	-	1.729	0.059	+
VA514	0.049	0.169	-	2.146	0.085	+
VA515	0.055	0.076	-	2.618	0.140	+
VA516	0.048	0.009	-	2.773	0.173	+
VA517	0.057	0.057	-	1.388	0.006	+
VA518	0.056	0.138	-	2.082	0.199	+
VA519	0.079	0.093	-	1.705	0.226	+
VA520	0.050	0.042	-	0.664	0.136	-
VA521	0.049	0.142	-	0.609	0.006	-
VA522	0.052	0.001	-	1.888	0.273	+
VA523	0.050	0.134	-	2.795	0.291	+

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;

<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

**Tabla 2.4.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero de la EEA de Adjuntas, Puerto Rico (continuación).

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
VA524	0.052	0.276	-	2.379	0.379	+
VA525	0.050	0.041	-	1.405	0.192	+
VA526	0.048	0.088	-	1.441	0.018	+
VA527	0.072	0.011	-	2.243	0.193	+
VA528	0.055	0.421	-	1.394	0.031	+
VA529	0.054	0.443	-	1.313	0.045	+
VA530	0.058	0.001	-	0.670	0.378	-
VA531	0.058	0.002	-	1.360	0.177	+
VA532	0.061	0.000	-	2.094	1.281	+
VA533	0.089	0.009	-	2.100	0.890	+
VA534	0.047	0.006	-	1.365	0.249	+
VA535	0.044	0.005	-	1.829	0.123	+
VA536	0.046	0.001	-	3.000	0.000	+
VA537	0.047	0.223	-	2.179	0.447	+
VA538	0.046	0.030	-	1.961	0.025	+
VA539	0.046	0.041	-	1.960	0.316	+
VA540	0.046	0.144	-	2.652	0.417	+
VA541	0.048	0.008	-	1.367	0.174	+
VA542	0.047	0.025	-	1.350	0.502	+
VA543	0.047	0.006	-	2.214	0.230	+
VA544	0.047	0.023	-	3.000	0.000	+
VA545	0.048	0.000	-	1.929	0.422	+

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;

<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

**Tabla 2.5.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero Jardines de Eneida de Cabo Rojo, Puerto Rico.

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
Control negativo	0.049	0.079	-	0.081	0.378	-
Control positivo	1.345	0.050	+	2.501	0.001	+
VC553	0.077	0.049	-	0.721	0.397	-
VC554	0.072	0.052	-	1.305	0.023	+
VC555	0.161	0.050	-	0.406	0.026	-
VC556	0.217	0.052	-	3.000	0.002	+
VC557	0.157	0.050	-	1.424	0.157	+
VC558	0.205	0.048	-	0.393	0.178	-
VC559	0.220	0.072	-	1.843	0.018	+
VC560	0.050	0.055	-	2.954	0.027	+
VC561	0.056	0.056	-	2.908	0.071	+
VC562	0.081	0.052	-	1.976	0.093	+
VC563	0.091	0.061	-	1.374	0.161	+
VC564	0.105	0.052	-	2.547	0.168	+
VC565	0.467	0.067	-	1.503	0.155	+
VC566	0.756	0.068	+	0.656	0.138	-
VC567	0.089	0.061	-	0.594	0.002	-
VC568	0.107	0.056	-	3.000	0.002	+
VC569	0.066	0.053	-	3.000	0.023	+
VC570	0.050	0.052	-	2.649	0.421	+
VC571	0.071	0.168	-	1.383	0.443	+
VC572	0.106	0.067	-	1.905	0.001	+
VC573	0.397	0.060	-	3.000	0.002	+

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;

<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

**Tabla 2.6.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero Enseñat de Las Marías, Puerto Rico.

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
Control negativo	0.067	0.088	-	0.078	0.002	-
Control positivo	1.069	0.086	+	2.749	0.005	+
VL574	0.179	0.145	-	0.878	0.108	-
VL575	0.187	0.112	-	0.705	0.706	-
VL576	0.189	0.000	-	0.856	0.209	-
VL577	0.141	0.079	-	2.796	0.214	+
VL578	0.189	0.153	-	0.712	0.057	-
VL579	0.161	0.157	-	2.062	0.438	+
VL580	0.201	0.095	-	0.320	0.093	-
VL581	0.182	0.157	-	1.416	0.042	+
VL582	0.181	0.178	-	2.271	0.142	+
VL583	0.189	0.018	-	1.503	0.001	+
VL584	0.070	0.027	-	1.390	0.034	+
VL585	0.103	0.071	-	1.383	0.076	+
VL586	0.122	0.093	-	1.498	0.041	+
VL587	0.172	0.161	-	1.507	0.088	+
VL588	0.203	0.168	-	0.169	0.011	-
VL589	0.163	0.155	-	0.851	0.013	-
VL590	0.152	0.138	-	0.108	0.016	-
VL591	0.112	0.080	-	0.119	0.002	-
VL592	0.113	0.081	-	0.144	0.042	-
VL593	0.129	0.107	-	0.391	0.119	-
VL594	0.147	0.079	-	0.286	0.055	-
VL595	0.137	0.120	-	0.379	0.019	-
VL596	0.107	0.013	-	0.144	0.000	-
VL597	0.061	0.006	-	0.106	0.005	-
VL598	0.045	0.001	-	1.685	0.180	+

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;  
<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

**Tabla 2.7.** Resultados de las pruebas ELISA para la detección de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en las muestras del vivero Byron Pike de Arecibo, Puerto Rico.

Identificación de la muestra	CVC			CTV		
	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>	A405 <sup>∞</sup>	D.E. <sup>±</sup>	Reacción ELISA <sup>γ</sup>
Control negativo	0.059	0.065	-	0.076	0.003	-
Control positivo	0.973	0.049	+	2.733	0.378	+
VB610	0.135	0.025	-	0.096	0.001	-
VB611	0.169	0.138	-	1.396	0.067	+
VB612	0.260	0.019	-	0.120	0.023	-
VB613	0.200	0.039	-	0.122	0.026	-
VB614	0.197	0.004	-	0.101	0.002	-
VB615	0.249	0.012	-	0.100	0.010	-
VB616	0.261	0.018	-	1.655	0.114	+
VB617	0.242	0.030	-	0.878	0.057	-
VB618	0.223	0.041	-	1.787	0.025	+
VB619	0.193	0.144	-	2.188	0.169	+
VB620	0.264	0.008	-	2.879	0.076	+
VB621	0.257	0.025	-	0.105	0.009	-
VB622	0.244	0.006	-	0.093	0.008	-
VB623	0.257	0.023	-	0.097	0.006	-
VB624	0.316	0.031	-	3.000	0.000	+

<sup>∞</sup> Lectura de la absorbancia (405 nm) de las placas ELISA. Cada valor es el promedio de dos celdas;

<sup>±</sup> Desviación Estándar; <sup>γ</sup> +: reacción positiva, -: reacción negativa.

### 2.4.2.3. Tristeza de los Cítricos

El virus de la Tristeza fue detectado mediante TAS-ELISA en 63 de las 145 muestras procesadas, provenientes de los viveros de Adjuntas, Cabo Rojo, Las Marías y Arecibo. En las muestras del vivero de la EEA de Isabela no se identificó la presencia del virus (Tabla 2.3).

En el vivero de la EEA de Adjuntas, el CTV fue detectado en el 91% de las muestras (Figura 2.8), correspondientes a 15 mandarinas, nueve de naranjas, cinco de lima Tahití y dos de pomelo (Tabla 2.4). Una vez se adicionó la solución reveladora PNP, las muestras se tornaron de color amarillo intenso, incluso las celdas correspondientes a VA515, VA516, VA523, VA536, VA540 y VA544 superaron el valor total de la absorbancia del control positivo que fue de 2.595. Los controles negativos permanecieron incoloros y presentaron una absorbancia promedio de  $0.029 \pm 0.001$  (Tabla 2.4).

Las muestras con CTV de Adjuntas presentaron síntomas de amarillamiento alrededor de las márgenes de las hojas, similares a deficiencias de magnesio y manganeso (Figura 2.2). De acuerdo con Rocha-Peña et al. (1995) esta sintomatología en la hojas puede asociarse con el síndrome del CTV denominado acanaladuras del tallo, presente en la mayoría de áreas cítricas en el mundo y responsable de hojas débiles, pequeñas y con diferentes patrones de amarillamiento.

Los resultados obtenidos en el vivero de la EEA de Adjuntas concuerdan con lo reportado por Rodríguez y colaboradores (1994b), quienes encontraron que el 45% de 1,285 árboles evaluados mediante pruebas ELISA resultaron positivos para el virus CTV en el huerto de la EEA de Adjuntas, de donde se obtienen los materiales de propagación utilizados en el vivero para preparar los injertos. Además, también observaron colonias del áfido vector *T. citricida* alimentándose de árboles de cítricos.

En Cabo Rojo, nueve muestras de naranja, dos de tangelo, dos limones, un pomelo, una lima Tahití y un limón del país resultaron positivos para el CTV (Tabla 2.5). Los síntomas observados fueron hojas pequeñas, amarillamiento, deformaciones y aclaramiento en las nervaduras (Figura 2.4). De acuerdo con Moreno et al. (2008) estos síntomas en plantas positivas para CTV se asocian a los síndromes de acanaladura del tallo y aclaramiento, éste último común en plantas de vivero. El control positivo de la reacción presentó una absorbancia de 2.501 a una longitud de onda de 405 nm. La absorbancia del control negativo fue de 0.081 (Tabla 2.5).

El 40% de las muestras procesadas para CTV de Las Marías resultaron positivas (Figura 2.8, Tabla 2.6), correspondientes a cinco naranjas, cuatro mandarinas y una lima Tahití. Durante la recolección de muestras se observó la presencia de áfidos alimentándose de plantas de *C. sinensis* (Figura 2.5A). Entre las especies de áfidos con la capacidad de adquirir el CTV y transmitirlo eficientemente se encuentra *T. citricida* (Gottwald et al., 1998). Esta especie fue reportada en el huerto de la finca Enseñat, junto con una incidencia de CTV del 70% en 408 árboles de cítricos analizados mediante serología (Rodríguez et al., 1994b). A partir de ese huerto se obtiene el material propagativo utilizado en el vivero que fue evaluado en esta investigación.

En la Tabla 2.6 se observan las absorbancias obtenidas durante la detección de CTV en Las Marías. Los valores de las diez muestras positivas oscilaron entre 1.383 y 2.796. El control positivo presentó una absorbancia de 2.749, mientras que la del negativo fue 0.078. La muestra de naranja VL587 colectada en Las Marías resultó positiva para CTV (Tabla 2.6) y también para la presencia de *Ca. L. asiaticus* (Figura 2.6, Tabla 2.2). En las hojas se observó una coloración amarilla pálida con áreas de color verde irregulares (moteado), manchas asimétricas, engrosamiento y aclaración de las nervaduras. En estados avanzados de EC se afecta el desarrollo del sistema radicular, en el floema se observan lesiones necróticas, acumulación de almidón y efecto sinérgico con otras enfermedades (Irey et al., 2006).

En Arecibo, se detectó la presencia del CTV en seis de las plantas analizadas (Tabla 2.7). Las muestras positivas fueron las naranjas VB611, VB616, VB618, VB619 con absorbancias de 1.396, 1.655, 1.787 y 2.188, respectivamente. Los limones del país VB620 con 2.879 y VB624 con 3.000 también fueron positivos para CTV. La absorbancia del control positivo de la reacción fue de 2.733 y la del negativo fue 0.076 (Tabla 2.7).

En Arecibo los síntomas de hojas débiles con patrones de amarillamiento similares a deficiencias de zinc y magnesio (Figura 2.3) se asocian al síndrome de aclaramiento del CTV. Este síndrome es común en viveros y se caracteriza por inducir atrofia, pequeñas hojas pálidas o amarillas y sistema radicular reducido. En algunos casos, las plantas que presentan este síndrome se recuperan y producen de nuevo hojas normales (Wallace y Drake, 1972).

En la presente investigación se utilizó la técnica TAS-ELISA, desarrollada a partir de una mezcla de anticuerpos monoclonales que reaccionan con la mayoría de aislados conocidos de CTV (Iracheta-Cárdenas et al., 2009; Agdia, 2011b). Es necesario llevar a cabo pruebas

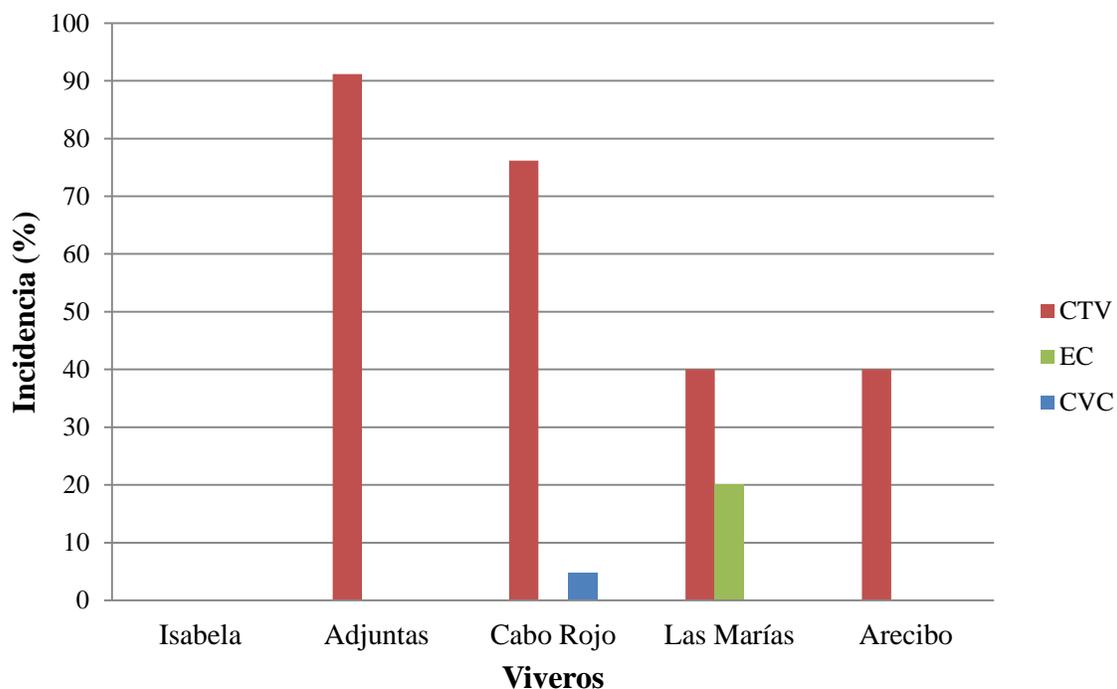
biológicas para caracterizar la agresividad de las cepas (Moreno et al., 2008) encontradas en Puerto Rico.

Actualmente las técnicas inmunoenzimáticas ELISA son el método recomendado por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (2004), tras su validación en comparación con otras técnicas de detección de CTV, y además son las más utilizadas debido a que permiten un diagnóstico rápido con alta sensibilidad y bajo costo (Batista et al., 2008).

La versatilidad y la automatización de todas las fases de la prueba ELISA han facilitado notablemente el incremento del número de análisis que se han realizado con diversos fines en todo el mundo. Su uso ha influido positivamente en el desarrollo de los programas de producción y certificación de material de propagación, mejoramiento genético y manejo de las enfermedades (Batista et al., 2008; Martin et al., 2000).

En la Figura 2.8 se muestra un resumen de la incidencia de las enfermedades detectadas en los cinco viveros visitados. El CTV se identificó en Adjuntas, Cabo Rojo, Las Marías y Arecibo con una incidencia de 91, 76, 40 y 40%, respectivamente. La CVC sólo estuvo presente en una muestra de *C. limon* en Cabo Rojo. El EC se detectó en el 5% de las muestras del vivero Enseñat, en Las Marías.

En el vivero de la EEA de Isabela ninguna de las enfermedades evaluadas estuvo presente, lo cual se debe a que las plantas certificadas se mantienen bajo una estructura cerrada a prueba de insectos vectores. Los grandes productores a nivel mundial han optado por este tipo de alternativas para evitar la diseminación y establecimiento de enfermedades que producen pérdidas millonarias cada año. Un ejemplo de esto ocurrió en Sao Paulo, Brasil, donde el cancro de los cítricos (CC) contaminó 42 viveros en el período de 1992 a 2003, ninguno de los cuales era protegido, en los que se producía un total de tres millones de plantas. A partir del inicio de la obligatoriedad del sistema de producción de plantas de cítricos en ambiente protegido en este estado, se registraron casos de CC en 16 viveros protegidos en 2006. En los años subsiguientes esta cifra disminuyó a cuatro viveros en 2007, un vivero en 2008 y en 2009 no se informó de CC en ningún vivero (Dibbern, 2010).



**Figura 2.8.** Incidencia del Virus de la Tristeza (CTV), Clorosis Variegada (CVC) y Enverdecimiento de los Cítricos (EC) en los cinco viveros muestreados.

La propagación de enfermedades como CTV, CVC y EC desde viveros afectados amenaza la producción de cítricos en la Isla. El diagnóstico de estas enfermedades de forma precisa y confiable es la base para la aplicación exitosa de programas de producción de material de propagación certificado en Puerto Rico. Los protocolos de diagnóstico evaluados en la presente investigación permitieron detectar de manera rápida y efectiva la presencia de estas enfermedades en las diferentes especies de cítricos propagadas en los viveros visitados.

Los programas de saneamiento y certificación, así como la protección de las fuentes de material de propagación contra insectos, deben implementarse para limitar la diseminación de las enfermedades detectadas en los huertos y viveros en la Isla. El material libre de patógenos transmisibles por injerto, debe mantenerse bajo control y debe ser analizado periódicamente para detectar la presencia de fitopatógenos, antes de su distribución a los productores (Lee, 2008).

## 2.5. CONCLUSIONES

- Mediante la PCR se detectó el Enverdecimiento de los Cítricos en cuatro muestras de *C. sinensis* y una muestra de *C. reticulata* colectadas en el vivero Enseñat, en Las Marías.
- Los resultados obtenidos para CVC con el DAS-ELISA fueron ambiguos. Las lecturas obtenidas para los controles positivos en cada una de las reacciones fueron bajas, debido que no se utilizó el largo de onda recomendado por el protocolo. La muestra VC566 que resultó positiva para *X. fastidiosa*, debe ser confirmada con pruebas adicionales debido a la posibilidad de obtener falsos positivos con el DAS-ELISA.
- El CTV se detectó mediante TAS-ELISA en 63 de las 145 muestras analizadas en los viveros de Las Marías, Cabo Rojo, Adjuntas y Arecibo.
- En el vivero de la EEA de Isabela, en donde se mantienen las plantas de cítricos en una estructura protegida, no se detectó la presencia de CTV, CVC y EC.
- En ninguno de los viveros se observó los síntomas característicos de la mancha negra y el cancro de los cítricos.
- Los protocolos de diagnóstico evaluados en la presente investigación permitieron detectar de manera rápida y efectiva la presencia de estas enfermedades en las diferentes especies de cítricos propagadas en los viveros visitados. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad del DAS-ELISA para *X. fastidiosa* debe ser verificada.

## **2.6. RECOMENDACIONES**

- El inicio de una citricultura exitosa en la Isla en áreas donde hay insectos vectores dependerá de plantar árboles libres de enfermedades, monitorear la presencia de vectores, realizar controles químicos y eliminar los árboles infectados.
- Caracterizar la agresividad de los aislados de CTV presentes en el Isla mediante pruebas biológicas.

## 2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agdia. 2011a. Agdia product catalog, DAS ELISA for *Xylella fastidiosa*. Online: (Consultado Agosto 2011) <https://orders.agdia.com/Documents/m17.pdf>.
- Agdia. 2011b. Agdia product catalog, TAS ELISA for CTV. Online: (Consultado Agosto 2011) <https://orders.agdia.com/Documents/m12.pdf>.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth edition. United States, Elsevier Academic Press, San Diego, CA. 922P.
- Ayres, A. J. 2001. Control de las enfermedades de los cítricos en Brasil. China/FAO Simposio sobre cítricos. Beijing, República Popular China. Pp. 107-115.
- Alvarado, A. y J. L. Zamora. 2007. Guía práctica de plagas y enfermedades en cítricos. Servicio de extensión agrícola, Colegio de Ciencias Agrícolas de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. 61P.
- Batista, L., I. Peña, D. López, J. M. Pérez y R. Lauger. 2008. Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. Pp. 1-12.
- Besoain, X., F. Ramella, C. Canales, M. Valenzuela, M. Castro, M.T. Gorris y M. Cambra. 2003. Caracterización serológica de 100 aislados de Citrus Tristeza Virus (CTV), colectados desde las principales regiones citrícolas de Chile. 13er Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Marbella, España. Pp. 28-31.
- Boaretto, R. M., J. A. Quiaggio, F. A. A. Mourao-Filho, M. F. Giné and A. E. Boareito. 2008. Absorption and mobility of boron in young citrus plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis 39: 2502-2514.

- Bonilla, L. 2002. El cultivo de cítricos. Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Boletín Técnico No. 10. Santo Domingo, República Dominicana. 20 P.
- Brlansky, R. H. and M. E. Rogers. 2007. Citrus huanglongbing: Understanding the vector-pathogen interaction for disease management. Plant Health Progress. Published online: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Huanglongbing.aspx>.
- Cambra, M. 1983. Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica ELISA: interés y aplicaciones. Levante Agrícola 245:11-17.
- Cambra, M. y P. Moreno. 2000. Tristeza. In: Moreno, P. y N. Durán- Villa (eds.). Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. N°2. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa.
- Cambra, M., M. T. Gorris, M. T. Marroquín, C. Román, M. Olmos, A. Martínez, M. Hermoso de Mendoza, A. López and L. Navarro. 2000. Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. Virus Research 71: 85-95.
- Cambra, M., M. T. Gorris, A. Olmos, M. C. Martínez, M. P. Román, E. Bertolini, A. López, E. A. Carbonell. 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for Citrus tristeza virus in adult trees. In: Durán-Villa, N., R.G. Milne and J. V. Da Graca (eds.). Proceeding of the 15th conference of International Organization of Citrus Virologit (IOCV), Riverside, CA. Pp. 69-77.
- Carvalho, S. A., C. C. Graf and A. R. Violante. 2005. Produção de material básico e propagação. Citros, Brazil. 38 P.
- Civerolo, E.L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. Journal Rio Grande Valley Horticultural Society 37: 127-146.

- Compton L. 2006. USDA. Determines citrus canker eradication not feasible. Online (Consultado Julio 2011): [www.doacs.state.fl.us/press/2006/01112006\\_2.html](http://www.doacs.state.fl.us/press/2006/01112006_2.html)
- Chung, K. R., N. A. Peres and W. Timmer. 2009. Citrus diseases exotic to Florida: Black spot. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville. 4 P.
- Dibbern, C. C. 2010. Rol de los viveros de cítricos en la estrategia para el manejo de HLB. Vivecitrus, Brasil. Pp. 1-16.
- Durán- Villa, N. y P. Moreno. 2000. Enfermedades de los cítricos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 234 P.
- Estévez De Jensen, C., F. Román, E. Abreu, A. Alvarado y O. Ortiz. 2009. Presencia del “Enverdecimiento de los Cítricos” en Puerto Rico. Resúmenes Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas. Pp. 7.
- Estévez De Jensen, C., A. Vitoreli y F. Román. 2010. Citrus greening in commercial orchards in Puerto Rico. *Phytopathology* 100: S34.
- Folimonova, S. Y., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda and W. O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of *Citrus* to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99: 1346-1354.
- García, C. 2009. Distribución del Huanglongbing (HLB)- Greening en el Mundo. SENASA Dirección de Vigilancia y Monitoreo. ). On line (Consultado Julio 2011): <http://www.sina.vimo.gov.ar>.
- Garnsey, S.M., D.J. Gumpf, C.N. Roistacher, E.L. Civerolo, R.F. Lee, R.K. Yokomi, M. Bar-Joseph. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica*. 19(2):151-157.

- Goes, A. and E. Feichtenberger. 1993. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 15: 73-75.
- Gottwald, T. R., B. Aubert and X. Y. ZHAO. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79: 687-693
- Gottwald, T. R. 1993. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Disease* 77(10): 1004-1007.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey and J. Borbón. 1998. Increase and patterns of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology* 88:621-636.
- Gottwald, T. R., G. J. Gibson, S. M. Garnsey and M. Irey. 1999. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by Stochastic Modeling. *Phytopathology* 89: 603-606.
- Halbert, S. E. and C. A. Núñez. 2004. Distribution of the Asian *Citrus* psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. *Florida Entomologist* 87(3):401-402.
- He, C. X., W. B. Li, A. J. Ayres, J. S. Hartung, V. S. Miranda and D. C. Teixeira. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease*. 84:622-626.
- Herron, C. M., T. E. Mirkov, N. Solís-Gracia, C. J. Kahlke, M. Skaria and J. V. DA GRAÇA. 2005. Severity of Citrus tristeza virus isolates from Texas. *Plant Disease*. 89:575-580.

- Iracheta-Cárdenas, M. M., P. Metheney, M. L. Polek K. L. Manjunath, R. F. Lee and M. A. Rocha-Peña. 2009. Serological detection of Citrus tristeza virus with antibodies developed to the recombinant coat protein. *Plant Disease* 93:11-16.
- Ito, T., H. Ieki, K. Ozaki, T. Iwanami, K. Nakahara, T. Hataya, T. Ito, M. Isaka and T. Kano. 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92:542-547.
- Jagoueix, S., J. M. Bové and Garnier, M. 1996. PCR detection of the two ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10:43-50.
- Janse, J. D. and A. Obradovic. 2010. *Xylella fastidiosa*: Its Biology, Diagnosis, Control and Risks. *Journal of Plant Pathology* 92 (1): S1.35-S1.48.
- Karasev, A. V., V.P. Boyko, S. Gowda, O.V. Nikolaeva, M. E. Hilf, E.V. Koonin, C.L. Niblett, K. Cline, D.J. Gumpf, R.F. Lee, S. M. Garnsey, D.J. Lewandowsky and W.O. Dawson. 1995. Complete sequence of citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Karasev, A. V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293-324.
- Lee, R. 2008. Programas de certificación para cítricos. USDA ARS. 15 P. Online (Consultado Julio 2011): <http://www.concitver.com/manualdesaneamientoydiagnostico/PROGRAMAS%20DE%20CERTIFICACION%20PARA%20C%3%8DTRICOS.pdf>.
- Li, W., J. S. Hartung and L. Levy. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improves detection of “*Candidatus* Liberibacter Species” associated with Citrus Huanglongbing. *Plant Disease* 91: 51-58.
- Loussert, R. 1992. Los agrios. Ediciones mundi-prensa, Madrid, España. 319 P.

- Malavolta, E. 1994. Leaf analysis in Brazil - present and perspectives. Proceedings of the International Society of Citriculture. 7th International Citrus Congress - Italy – Vol. 2, 570-574.
- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S., and Lee, R. F. 2008. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98:387-396.
- Martin, R. R., D. James and C. A. Lévesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review Phytopathology* 38: 207–239.
- Martínez, G.C., S.M. Mazza de Gaiad y V.A. Rodríguez. 1995. Relevamiento de las concentraciones de Cu, Mn, Fe en naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia Late tratada con diferentes niveles de Zn. *Horticultura Argentina* 14 (37): 17 - 22.
- Mattos- Junior, D. O. C. Bataglia and J. A. Quaggio. 2005. Nutrição dos citros. In: Mattos- Junior, D., R. M. De Negri and E. J. Pio (Eds.). Citros. Instituto Agronómico, Campinas, Brasil. Pp. 197-219.
- McClellan, A.P.D. 1960. Seedling-yellows in South African citrus trees. *South African Journal of Agriculture Science* 3:259-279.
- Molina, E. 2001. Nutrición y fertilización de la naranja. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. *Informaciones Agronómicas* 40: 5-13.
- Moreno, P., S. Ambrós, M. R. Albiach-Martí, J. Guerri and L. Peña. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Review. *Plant disease that changed the world. Molecular Plant Pathology* 9(2): 251-268.

- Navarro, L., J.A. Pina, J. Juárez, J.F. Ballester-Olmos, J.M. Arregui, C. Ortega, A. Navarro, N. Durán-Villa, J. Guerri, P. Moreno, M. Cambra y S. Zaragoza. 2003. Situación actual de los programas de saneamiento, cuarentena y certificación de cítricos en España. *Phytoma España*: 68-73.
- Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. Citrus tristeza closterovirus. *Bulletin OEPP/EPPO* 34: 239-246.
- Pruvost, O., G. Vernieri, J. Hartung, T. Gottwald and H. Quetelard. 1997. Towards an improvement of Citrus canker control in Reunion Island. *Fruits* 52 (6): 375-382.
- Quaggio, J. A., D. Mattos-Junior and E. H. Cantarella. 2005. Manejo da fertilidade do solo na citricultura. In: Mattos-Junior, D., R. M. De Negri and E. J. Pio (Eds.). *Citros*. Instituto Agronómico, Campinas, Brasil. Pp. 483-517.
- Ramos-Méndez, E. 2008. Huanglongbing (“Citrus Greening”) y el psílido asiático de los cítricos, Una perspectiva de su situación actual. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. *Revista Técnica Agrosanitario*: 5-19.
- Reanwarakorn, K. and J. S. Semancik. 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology* 89:568-574.
- Rocha-Peña, M. A., R. Lee, R. Lastra, C. Niblett, F. Ochoa-Corona, S. Garnsey and S. Yokomi. 1995. Citrus tristeza virus its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79(5): 437-445.
- Rodríguez, V.A., G.C. Martínez y S.M. Mazza de Gaiad. 1994a. Aplicaciones foliares de Zn en naranjo (*Citrus sinensis*) var. Valencia Late: absorción mensual e influencia en la productividad. *Horticultura Argentina* 13 (34-35): 61 – 65.

- Rodríguez, R., J. Escudero, C. Flores, W. González y D. Rivera. 1994b. Incidencia del virus de la tristeza de los cítricos en dos fincas en Puerto Rico. Proceedings Annual Meeting, Puerto Rican Society of Agricultural Science, Isabela, Puerto Rico. Pp. 18.
- Roistacher, C. N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. Pp. 286.
- Rosa, C., M. Polek, B. W. Falk and A. Rowhani. 2007. Improved efficiency for quantitative and qualitative indexing for Citrus tristeza virus and Citrus psorosis virus. Plant Disease 91:1089- 1095.
- Rosetti, V. 2000. Citrus variegated chlorosis (CVC) in Brazil: an overview. In: Proc. 14th Conf. IOCV. IOCV, Riverside. Pp. 213-215.
- Schneider, H. 1959. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: Citrus Virus Diseases. Wallace, J. M. (ed.). University of California Division of Agricultural Sciences, Berkeley, C.A. Pp. 73-84.
- Schubert, T., A. R. Shabbir, S. Xioaoan, T. Gottwald, J. H. Graham, A. Lake and W. N. Dixon. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida again. Plant Disease 85(4): 340-356.
- Sherald, J. L. and J. D. Lei. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. Plant Disease 75: 200-203.
- Sobrinho, J. 1991. Propagação de citros. In: Rodriguez, O. (ed). Citricultura brasileira. Fundação Cargill, Campinas, Brasil. Pp. 281-301.
- Timmer, L. W., S. M. Garnsey and J. H. Graham. 2000. Compendium of Citrus Diseases. APS PRESS. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 74 P.

- Timmer, L., S.M. Garnsey and P. Broadbent. 2003. Diseases of Citrus. Pp. 163-195. In: Ploetz, R. C. (ed). Diseases of Tropical Fruit Crops. CAB International, Wallingford, UK.
- USDA. 2011. Salve los cítricos. On line (Consultado Julio 2011): <http://salveloscitricos.org/practice-safe-citrus/>
- Wallace, J. M. and R. J. Drake. 1951. Recent developments in studies quick decline and related diseases. *Phytopathology* 41: 785-793.
- Wallace, J. M. and R. J. Drake. 1972. Studies on recovery of citrus plants from seedling yellows and the resulting protection against reinfection. In: Price, W.C. (ed.). Proceedings of the 5<sup>th</sup> conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). University of Florida Press, Gainesville. Pp. 127-136.
- Whiteside, J.O., S. M. Garnsey and L. W. Timmer. 1993. Compendium of Citrus Diseases. APS PRESS. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 80 P.
- Yokomi, R. K., D. Rivera, S. M. Garnsey, T. R. Gottwald, E. Abreu-Rodriguez, V. Damsteegt, P. A. Stansly, V. J. Febres and C. L. Niblett. 1996. Incidence of Brown Citrus Aphid and Citrus Tristeza Virus in Puerto Rico. Thirteenth IOCV Conference, 1996- Citrus Tristeza Virus. Pp. 83-91.
- Zapata, M, J. Hartung , B. Brodbeck and P. Andersen. 2011. Endophytic bacteria from the vascular tissue of coffee (*Coffea arabica* L.) and citrus (*Citrus sinensis* L.) leaves found during the attempt to isolate the pathogen, *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. *Phytopathology* 101:S279.

**APÉNDICE 1.1.**  
**REGISTRO DE MUESTRAS COLECTADAS**

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (EC).

<b>Fecha de Colecta</b>	<b>Localidad</b>	<b>Identificación de la muestra</b>	<b>Especie hospedera</b>	<b>Detección <i>Ca. L. asiaticus</i></b>
10-Feb-2011	Isabela EEA (Vivero)	EC128	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
		EC129	<i>C. sinensis</i>	-
		EC130	<i>C. sinensis</i>	-
		EC131	<i>C. sinensis</i>	-
		EC132	<i>C. sinensis</i>	-
		EC133	<i>C. sinensis</i>	-
10-Feb-2011	Isabela EEA (Huerto)	EC134	<i>C. latifolia</i>	-
		EC135	<i>C. latifolia</i>	-
		EC136	<i>C. latifolia</i>	-
		EC137	<i>C. latifolia</i>	-
26-Feb-2011	Ciales (Huerto)	EC138	<i>C. latifolia</i>	-
		EC139	<i>C. sinensis</i>	-
		EC140	<i>C. sinensis</i>	-
		EC141	<i>C. sinensis</i>	-
		EC142	<i>C. sinensis</i>	-
		EC143	<i>C. latifolia</i>	-
		EC144	<i>C. reticulata</i>	-
		EC145	<i>C. sinensis</i>	-
		EC146	<i>C. reticulata</i>	-
EC147	<i>C. latifolia</i>	-		
29-Mar-2011	Juana Díaz EEA (Huerto)	EC148	<i>C. latifolia</i>	-
		EC149	<i>C. latifolia</i>	-
		EC150	<i>C. latifolia</i>	-
		EC151	<i>C. latifolia</i>	+
05-Abr-2011	Adjuntas EEA (Vivero)	EC152	<i>C. sinensis</i>	-
		EC153	<i>C. sinensis</i>	-
		EC154	<i>C. sinensis</i>	-
		EC155	<i>C. sinensis</i>	-
		EC156	<i>C. sinensis</i>	-
		EC157	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
		EC158	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	+
		EC159	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
		EC160	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
		EC161	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
EC162	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-		
EC163	<i>C. reticulata</i>	-		

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
05-Abr-2011	Adjuntas EEA (Vivero)	EC164	<i>C. reticulata</i>	-
		EC165	<i>C. reticulata</i>	-
		EC166	<i>C. reticulata</i>	-
		EC167	<i>C. reticulata</i>	-
		EC168	<i>C. latifolia</i>	-
		EC169	<i>C. latifolia</i>	-
		EC170	<i>C. latifolia</i>	-
		EC171	<i>C. latifolia</i>	-
		EC172	<i>C. latifolia</i>	-
05-Abr-2011	Adjuntas Barrio Castañer (Huerto)	EC173	<i>C. sinensis</i>	-
		EC174	<i>C. sinensis</i>	-
		EC175	<i>C. sinensis</i>	-
		EC176	<i>C. sinensis</i>	-
		EC177	<i>C. sinensis</i>	-
		EC178	<i>C. sinensis</i>	-
		EC179	<i>C. sinensis</i>	-
		EC180	<i>C. sinensis</i>	-
		EC181	<i>C. sinensis</i>	-
		EC182	<i>C. sinensis</i>	-
		EC183	<i>C. sinensis</i>	-
		EC184	<i>C. sinensis</i>	-
		EC185	<i>C. sinensis</i>	-
		EC186	<i>C. sinensis</i>	-
		EC187	<i>C. sinensis</i>	-
EC188	<i>C. sinensis</i>	-		
EC189	<i>C. sinensis</i>	-		
EC190	<i>C. sinensis</i>	-		
EC191	<i>C. sinensis</i>	-		
EC192	<i>C. sinensis</i>	-		
08-Abr-2011	Guánica (Huerto)	EC193	<i>C. latifolia</i>	-
		EC194	<i>C. latifolia</i>	-
		EC195	<i>C. latifolia</i>	-
		EC196	<i>C. latifolia</i>	-
		EC197	<i>C. latifolia</i>	-
		EC198	<i>C. latifolia</i>	-
		EC199	<i>C. latifolia</i>	-
		EC200	<i>C. latifolia</i>	-
		EC201	<i>C. latifolia</i>	-
		EC202	<i>C. latifolia</i>	-

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
08-Abr-2011	Guánica (Huerto)	EC203	<i>C. sinensis</i>	-
		EC204	<i>C. sinensis</i>	-
26-Abr-2011	Coamo (Huerto)	EC205	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC206	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC207	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC208	<i>C. aurantifolia</i>	+
		EC209	<i>C. aurantifolia</i>	+
13-May-2011	Corozal (Vivero)	EC210	<i>C. paradisi</i>	-
		EC211	<i>C. sinensis</i>	-
		EC212	<i>C. sinensis</i>	-
		EC213	<i>C. reticulata</i>	-
		EC214	<i>C. paradisi</i>	-
		EC215	<i>C. latifolia</i>	-
		EC216	<i>C. sinensis</i>	-
		EC217	<i>C. sinensis</i>	-
		EC218	<i>C. reticulata</i>	-
		EC219	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-
17-May-2011	Adjuntas EEA (Huerto)	EC220	<i>C. reticulata</i>	-
		EC221	<i>C. reticulata</i>	-
		EC222	<i>C. reticulata</i>	-
		EC223	<i>C. reticulata</i>	-
		EC224	<i>C. reticulata</i>	-
		EC225	<i>C. reticulata</i>	-
		EC226	<i>C. reticulata</i>	-
		EC227	<i>C. reticulata</i>	-
		EC228	<i>C. reticulata</i>	-
		EC229	<i>C. reticulata</i>	-
20-May-2011	Yauco (Huerto)	EC230	<i>C. sinensis</i>	-
		EC231	<i>C. sinensis</i>	-
		EC232	<i>C. sinensis</i>	-
		EC233	<i>C. sinensis</i>	-
		EC234	<i>C. sinensis</i>	-
		EC235	<i>C. sinensis</i>	-
		EC236	<i>C. sinensis</i>	-
		EC237	<i>C. sinensis</i>	-
		EC238	<i>C. sinensis</i>	-
		EC239	<i>C. sinensis</i>	-
EC240	<i>C. sinensis</i>	-		

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
24-May-2011	Santa Isabel (Vivero)	EC241	<i>C. sinensis</i>	+
		EC242	<i>C. sinensis</i>	-
		EC243	<i>C. sinensis</i>	-
		EC244	<i>C. sinensis</i>	-
		EC245	<i>C. sinensis</i>	-
		EC246	<i>C. sinensis</i>	+
		EC247	<i>C. sinensis</i>	-
		EC248	<i>C. sinensis</i>	+
		EC249	<i>C. sinensis</i>	+
		EC250	<i>C. sinensis</i>	+
03-Jun-2011	Ciales (Vivero)	EC251	<i>C. reticulata</i>	-
		EC252	<i>C. reticulata</i>	-
		EC253	<i>C. reticulata</i>	-
		EC254	<i>C. reticulata</i>	-
		EC255	<i>C. reticulata</i>	-
		EC256	<i>C. reticulata</i>	-
		EC257	<i>C. sinensis</i>	-
		EC258	<i>C. sinensis</i>	-
		EC259	<i>C. sinensis</i>	-
		EC260	<i>C. sinensis</i>	-
		EC261	<i>C. sinensis</i>	-
09-Jun-2011	Las Marías (Vivero)	EC262	<i>C. reticulata</i>	-
		EC263	<i>C. reticulata</i>	-
		EC264	<i>C. reticulata</i>	-
		EC265	<i>C. reticulata</i>	-
		EC266	<i>C. reticulata</i>	-
		EC267	<i>C. latifolia</i>	-
		EC268	<i>C. latifolia</i>	-
		EC269	<i>C. latifolia</i>	-
		EC270	<i>C. latifolia</i>	-
		EC271	<i>C. sinensis</i>	-
		EC272	<i>C. sinensis</i>	-
		EC273	<i>C. sinensis</i>	-
		EC274	<i>C. sinensis</i>	-
		EC275	<i>C. sinensis</i>	-
		EC276	<i>C. nobilis</i>	-
		EC277	<i>C. nobilis</i>	-
		EC278	<i>C. nobilis</i>	-
		EC279	<i>C. nobilis</i>	-

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
09-Jun-2011	Las Marías (Vivero)	EC280	<i>C. nobilis</i>	-
		EC281	<i>C. reticulata</i>	-
		EC282	<i>C. reticulata</i>	-
		EC283	<i>C. reticulata</i>	-
		EC284	<i>C. reticulata</i>	-
		EC285	<i>C. reticulata</i>	-
09-Jun-2011	Las Marías (Huerto)	EC286	<i>C. latifolia</i>	-
		EC287	<i>C. latifolia</i>	-
		EC288	<i>C. latifolia</i>	-
		EC289	<i>C. latifolia</i>	-
		EC290	<i>C. latifolia</i>	-
		EC291	<i>C. latifolia</i>	-
		EC292	<i>C. reticulata</i>	-
		EC293	<i>C. reticulata</i>	-
		EC294	<i>C. reticulata</i>	-
		EC295	<i>C. reticulata</i>	+
EC296	<i>C. paradisi</i>	-		
17-Jun-2011	Corozal (Huerto)	EC297	<i>C. sinensis</i>	-
		EC298	<i>C. sinensis</i>	-
		EC299	<i>C. reticulata</i>	-
		EC300	<i>C. sinensis</i>	-
		EC301	<i>C. reticulata</i>	-
		EC302	<i>C. sinensis</i>	-
		EC303	<i>C. sinensis</i>	-
		EC304	<i>C. sinensis</i>	-
		EC305	<i>C. sinensis</i>	-
		EC306	<i>C. sinensis</i>	-
12-Jul-2011	Cabo Rojo (Vivero)	EC307	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	-
		EC308	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	-
		EC309	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	-
		EC310	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	-
		EC311	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	-
		EC312	<i>C. nobilis</i>	-
		EC313	<i>C. nobilis</i>	-
		EC314	<i>C. nobilis</i>	+
		EC315	<i>C. nobilis</i>	-
		EC316	<i>C. nobilis</i>	-
		EC317	<i>C. nobilis</i>	-
		EC318	<i>C. nobilis</i>	-

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
12-Jul-2011	Cabo Rojo (Vivero)	EC319	<i>C. nobilis</i>	-
		EC320	<i>C. nobilis</i>	-
		EC321	<i>C. nobilis</i>	-
		EC322	<i>C. latifolia</i>	-
		EC323	<i>C. latifolia</i>	-
		EC324	<i>C. latifolia</i>	-
		EC325	<i>C. latifolia</i>	-
		EC326	<i>C. latifolia</i>	-
		EC327	<i>C. limon</i>	-
		EC328	<i>C. limon</i>	-
		EC329	<i>C. limon</i>	-
		EC330	<i>C. limon</i>	-
		EC331	<i>C. limon</i>	-
		EC332	<i>C. reticulata</i>	-
		EC333	<i>C. reticulata</i>	-
		EC334	<i>C. reticulata</i>	-
		EC335	<i>C. reticulata</i>	-
		EC336	<i>C. reticulata</i>	-
		EC337	<i>C. reticulata</i>	-
		EC338	<i>C. reticulata</i>	+
		EC339	<i>C. reticulata</i>	-
		EC340	<i>C. reticulata</i>	-
		EC341	<i>C. reticulata</i>	-
		EC342	<i>C. reticulata</i>	+
		EC343	<i>C. sinensis</i>	-
		EC344	<i>C. paradisi</i>	-
		EC345	<i>C. nobilis</i>	-
		EC346	<i>C. nobilis</i>	+
		EC347	<i>C. nobilis</i>	-
		EC348	<i>C. nobilis</i>	-
		EC349	<i>C. nobilis</i>	-
		EC350	<i>C. sinensis</i>	-
EC351	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-		
EC352	<i>C. reticulata x C. paradisi</i>	-		
12-Sep-2011	Utuaado (Huerto)	EC353	<i>C. reticulata</i>	-
		EC354	<i>C. reticulata</i>	-
		EC355	<i>C. reticulata</i>	-
		EC356	<i>C. reticulata</i>	-
		EC357	<i>C. reticulata</i>	-

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
12-Sep-2011	Utuaado (Huerto)	EC358	<i>C. reticulata</i>	-
		EC359	<i>C. reticulata</i>	-
		EC360	<i>C. sinensis</i>	-
		EC361	<i>C. nobilis</i>	-
		EC362	<i>C. reticulata</i>	-
		EC363	<i>C. sinensis</i>	-
		EC364	<i>C. sinensis</i>	-
		EC365	<i>C. sinensis</i>	-
		EC366	<i>C. sinensis</i>	-
		EC367	<i>C. sinensis</i>	-
		EC368	<i>C. sinensis</i>	-
		EC369	<i>C. sinensis</i>	-
		EC370	<i>C. sinensis</i>	-
		EC371	<i>C. sinensis</i>	-
EC372	<i>C. sinensis</i>	-		
03-Oct-2011	Sabana Grande (Huerto)	EC373	<i>C. reticulata</i>	-
		EC374	<i>C. reticulata</i>	-
		EC375	<i>C. reticulata</i>	-
		EC376	<i>C. sinensis</i>	-
		EC377	<i>C. sinensis</i>	-
		EC378	<i>C. sinensis</i>	-
		EC379	<i>C. sinensis</i>	-
		EC380	<i>C. reticulata</i>	-
		EC381	<i>C. sinensis</i>	-
		EC382	<i>C. sinensis</i>	-
		EC383	<i>C. sinensis</i>	-
05-Oct-2011	Adjuntas EEA (Huerto)	EC384	<i>C. sinensis</i>	-
		EC385	<i>C. sinensis</i>	-
		EC386	<i>C. sinensis</i>	-
		EC387	<i>C. sinensis</i>	-
19-Nov-2011	San Sebastián (Huerto)	EC388	<i>C. sinensis</i>	-
		EC389	<i>C. sinensis</i>	-
		EC390	<i>C. sinensis</i>	-
		EC391	<i>C. sinensis</i>	-
		EC392	<i>C. sinensis</i>	-
		EC393	<i>C. sinensis</i>	-
		EC394	<i>C. sinensis</i>	-
		EC395	<i>C. sinensis</i>	-
EC396	<i>C. sinensis</i>	-		

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
19-Nov-2011	San Sebastián (Huerto)	EC397	<i>C. sinensis</i>	-
27-Oct-2011	Lares (Huerto)	EC398	<i>C. sinensis</i>	-
		EC399	<i>C. reticulata</i>	-
		EC400	<i>C. paradisi</i>	-
10-Nov-2011	Ciales (Huerto)	EC401	<i>C. sinensis</i>	-
		EC402	<i>C. sinensis</i>	-
10-Nov-2011	Morovis (Huerto)	EC403	<i>C. paradisi</i>	-
		EC404	<i>C. paradisi</i>	-
06-Nov-2011	Cayey (Huerto)	EC405	<i>C. reticulata</i>	-
		EC406	<i>C. reticulata</i>	-
10-Nov-2011	Dorado (Huerto)	EC407	<i>C. sinensis</i>	-
		EC408	<i>C. sinensis</i>	-
		EC409	<i>C. sinensis</i>	-
		EC410	<i>C. sinensis</i>	-
16-Nov-2011	Guánica (Huerto)	EC411	<i>C. sinensis</i>	-
		EC412	<i>C. sinensis</i>	-
		EC413	<i>C. sinensis</i>	-
07-Dic-2011	Dorado (Huerto)	EC414	<i>C. reticulata</i>	-
		EC415	<i>C. reticulata</i>	+
		EC416	<i>C. reticulata</i>	-
		EC417	<i>C. reticulata</i>	+
		EC418	<i>C. reticulata</i>	+
		EC419	<i>C. reticulata</i>	+
		EC420	<i>C. reticulata</i>	-
		EC421	<i>C. reticulata</i>	-
		EC422	<i>C. reticulata</i>	-
		EC423	<i>C. reticulata</i>	-
		EC424	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC425	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC426	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC427	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC428	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC429	<i>C. aurantifolia</i>	-
EC430	<i>C. aurantifolia</i>	-		
EC431	<i>C. aurantifolia</i>	-		
EC432	<i>C. aurantifolia</i>	-		
EC433	<i>C. aurantifolia</i>	+		
EC434	<i>C. aurantifolia</i>	-		

**Tabla 1.5.** Muestras de cítricos colectadas en Puerto Rico para la detección de *Ca. L. asiaticus*, agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos (continuación).

Fecha de Colecta	Localidad	Identificación de la muestra	Especie hospedera	Detección <i>Ca. L. asiaticus</i>
07-Dic-2011	Dorado (Huerto)	EC435	<i>C. aurantifolia</i>	-
		EC436	<i>C. aurantifolia</i>	-
23-Ene-2012	Arecibo (Huerto)	EC437	<i>C. reticulata</i>	-
		EC438	<i>C. reticulata</i>	-
		EC439	<i>C. reticulata</i>	-
		EC440	<i>C. reticulata</i>	-
		EC441	<i>C. reticulata</i>	-
		EC442	<i>C. reticulata</i>	-
		EC443	<i>C. reticulata</i>	-
		EC444	<i>C. reticulata</i>	-
		EC445	<i>C. reticulata</i>	-
		EC446	<i>C. reticulata</i>	-
		EC447	<i>C. sinensis</i>	-
		EC448	<i>C. sinensis</i>	-
		EC449	<i>C. sinensis</i>	-
		EC450	<i>C. sinensis</i>	-
		EC451	<i>C. sinensis</i>	-
		EC452	<i>C. sinensis</i>	-
		EC453	<i>C. sinensis</i>	-
		25-Ene-2012	Villalba (Huerto)	EC454
EC455	<i>C. sinensis</i>			-
EC456	<i>C. sinensis</i>			-
EC457	<i>C. reticulata</i>			-
EC458	<i>C. reticulata</i>			-
27-Mar-2012	Añasco (Huerto)	EC459	<i>C. reticulata</i>	-
		EC460	<i>C. reticulata</i>	-
		EC461	<i>C. reticulata</i>	-
		EC599	<i>C. sinensis</i>	-
		EC600	<i>C. sinensis</i>	+
		EC601	<i>C. sinensis</i>	-
		EC602	<i>C. sinensis</i>	+
		EC603	<i>C. sinensis</i>	-
		EC604	<i>C. sinensis</i>	-
EC605	<i>C. sinensis</i>	-		
27-Mar-2012	Juana Díaz (Huerto)	EC606	<i>C. sinensis</i>	-
		EC607	<i>C. sinensis</i>	+
		EC608	<i>C. sinensis</i>	-
27-Mar-2012	Juana Díaz (Huerto)	EC609	<i>C. latifolia</i>	+

## APÉNDICE 1.2.

### ANÁLISIS ESPACIAL DEL EC OBTENIDO A TRAVÉS DE SaTScan™

---

SaTScan v9.1.1

---

Purely Spatial analysis  
scanning for clusters with high or low rates  
using the Bernoulli model.

---

#### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2010/1/1 to 2012/12/31  
Number of locations.....: 22  
Total population.....: 348  
Total number of cases.....: 36

---

#### MOST LIKELY CLUSTER

1.Location IDs included.: Adjuntas, Yauco, Castañer, Lares,  
LasMarías, SabanaGrande, Guánica,  
Utado, SanSebastián  
Coordinates / radius.: (18.175400 N, 66.798500 W) / 27.83 km  
Population.....: 116  
Number of cases.....: 1  
Expected cases.....: 12.00  
Observed / expected...: 0.083  
Relative risk.....: 0.057  
P-value.....: 0.00021

#### SECONDARY CLUSTERS

2.Location IDs included.: Cayey, Coamo, SantaIsabel, Villalba,  
Corozal, Morovis, JuanaDiaz, Dorado,  
Ciales  
Coordinates / radius.: (18.078000 N, 66.151000 W) / 47.16 km  
Population.....: 126  
Number of cases.....: 25  
Expected cases.....: 13.03  
Observed / expected...: 1.92  
Relative risk.....: 4.00  
P-value.....: 0.0020

---