

SEVERIDAD DE HUANGLONGBING (HLB) EN GENOTIPOS DE NARANJA [*Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck], MANDARINA (*Citrus reticulata* Blanco) Y LIMÓN [*Citrus ×latifolia* (Yu.) Tanaka] EN HUERTOS

Por:

Luz Diana Intriago Mendoza

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

MAESTRO EN CIENCIAS

En

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGROAMBIENTALES

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2019

Aprobado por:

Dra. Consuelo Estévez de Jensen, PhD.
Presidente, de Comité

Fecha

Dr. Carlos M. Rodríguez Minguela, PhD.
Miembro, de Comité Graduado

Fecha

Dr. Ricardo Goenaga, PhD.
Miembro, de Comité Graduado

Fecha

Dr. Fernando Gallardo, PhD.
Miembro, de Comité Graduado

Fecha

Dr. Duane A. Kolterman, PhD.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Dr. Roberto Vargas Ayala, PhD.
Director del Departamento de Ciencias Agroambientales

Fecha

RESUMEN

La enfermedad de los cítricos conocida como Huanglongbing (HLB) se reportó por primera vez en Puerto Rico en 2009. Desde entonces se ha diseminado por toda la isla ocasionando disminución en la producción y reducción de la superficie sembrada, la cual no supera las 1297 hectáreas. Esta enfermedad se asocia a la bacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' que es transmitida por el psílido *Diaphorina citri* Kuwayama. Diversos estudios han informado niveles variables de respuesta de genotipos de cítricos frente a la enfermedad. Así mismo, otras investigaciones muestran la influencia de patrones sobre la reacción a HLB por parte de genotipos injertados. En este contexto los objetivos de este estudio fueron evaluar mediante una escala visual, la severidad de HLB en ocho genotipos de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) injertados en los patrones 'C-35 Citrange', mandarina 'Cleopatra' y 'US-942' en condiciones de campo, y calcular el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC).

Adicionalmente, se evaluó la severidad de HLB en 13 genotipos de naranja dulce [*Citrus ×sinensis* (L). Osbeck] de la colección de cítricos de la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas (EEA Adjuntas) y se determinó el título de '*Ca. L. asiaticus*' en árboles de genotipos con la severidad más baja de HLB. Los resultados mostraron que el genotipo 2 de *C. reticulata* tuvo el valor de severidad de HLB más bajo en la última evaluación a los 35 meses del trasplante, el cual no difirió de los genotipos 1, 3, 6, 7 y 8 pero sí difirió estadísticamente de los genotipos 4 y 5. El patrón 'US-942' mostró el valor AUDPC más bajo. Los doce valores AUDPC más bajos, correspondieron a tratamientos de los genotipos 1, 2, 3, 6, 7 y 8. Los genotipos de *C. ×sinensis* presentaron un patrón fluctuante de severidad de HLB a través del tiempo, la cual se mantuvo entre media y baja y no aumentó en los genotipos 'Rico 3-80', 'Rico 5-50', 'Helada' y 'Lares 82' entre la primera y última evaluación. Así mismo, el título de '*Ca. L. asiaticus*' por gramo de nervadura central resultó entre medio y bajo con valores *log* de 10^7 y 10^8 , los genotipos 'Rico 7-56', 'Pietri 3-34' resultaron los títulos más bajos y no difirieron de 'Helada', 'Frontón' y 'Rico 5-50'. El híbrido 'US-942' confirió efecto de menor severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el cual los genotipos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 mostraron menor acumulación de la enfermedad. En las condiciones agroecológicas de la EEA Adjuntas, los genotipos de *C. ×sinensis* no muestran progreso significativo de HLB y deben ser considerados en investigaciones futuras para determinar los prospectos más favorables para la producción comercial de naranja dulce en la isla bajo diferentes condiciones de infección de HLB.

ABSTRACT

The citrus disease known as Huanglongbing (HLB) was reported for the first time in Puerto Rico in 2009. Since then, it has spread throughout the island causing a decrease in production and reduction in the cultivated area, which does not exceed 1297 hectares. This disease is associated with the bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' that is transmitted by the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. Several studies have informed that *Citrus* genotypes have variable levels of response to the disease. Similarly, other researches show rootstocks influence on the grafted genotypes reaction to HLB. In this context, the objective of this study was to assess visually the HLB severity in eight genotypes of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) grafted onto the rootstocks 'C-35 Citrange', 'Cleopatra' mandarin and 'US-942' under field conditions and the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated. Additionally, HLB severity in 13 sweet orange genotypes [*Citrus ×sinensis* (L). Osbeck] of the *Citrus* collection at the Adjuntas Experimental Station was evaluated and the titer of '*Ca. L. asiaticus*' was determined in trees with lowest HLB severity. The results showed that the *C. reticulata* genotype 2 had the lowest HLB severity value in the last evaluation at 35 months after transplanting and it did not differ from genotypes 1, 3, 6, 7 and 8 but differed statistically from genotypes 4 and 5. The 'US-942' rootstock showed the lowest AUDPC value. The twelve lowest AUDPC values corresponded to treatments of the genotypes 1, 2, 3, 6, 7 and 8. The genotypes of *C. sinensis* presented a fluctuating pattern of HLB severity over time, which remained between medium and low and did not increase from the first to the last evaluation in the genotypes 'Rico 3-80', 'Rico 5-50', 'Helada' and 'Lares 82'. Likewise, the '*Ca. L. asiaticus*' titer per gram of midribs was between medium and low with 10^7 and 10^8 log values and the genotypes 'Rico 7-56' and 'Pietri 3-34' registered the lowest titer and they did not differ from genotypes 'Helada', 'Frontón' and 'Rico 5-50'. The rootstock 'US-942' conferred effect of low HLB severity in *C. reticulata* experiment in which genotypes 1, 2, 3, 6, 7 and 8 showed less disease accumulation. In the agroecological conditions of the Adjuntas Agricultural Experimental Station, the *C. ×sinensis* genotypes show no significant progress of HLB and should be considered in future research to determine the most favorable prospects for the commercial production of sweet orange in the island under different conditions of HLB infection.

Keywords: '*Ca. liberibacter asiaticus*', HLB severity, *Citrus* hybrid rootstocks, bacterial titer

A la memoria de mi papá Cliofe Amable Intriago García

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los proyectos:

Citrus Clean Plant Network USDA award # 15-8130-0535-CA (Proyecto Z-284).

Hatch award # “NI17HFPXXXXXG014-0001” (Proyecto Hatch 451)

Agradezco a las autoridades, profesores y empleados que contribuyeron y respaldaron en diferentes formas la realización de la maestría y la tesis, en especial a la Doctora Consuelo Estévez de Jensen, mi orientadora durante la maestría por su guía y enseñanzas.

Dr. Carlos Rodríguez Minguela, Miembro del Comité graduado

Dr. Ricardo Goenaga, Miembro del Comité graduado

Dr. Fernando Gallardo, Miembro del Comité graduado

Dr. Duane Kolterman, Representante de Estudios Graduados

Dr. Elvin Román Paoli, Decano y Director Interino del Servicio de Extensión Agrícola

Dr. Roberto Vargas, Director del Departamento de Ciencias Agroambientales

Dra. Lydia Rivera Vargas, Profesora del Departamento de Ciencias Agroambientales

Ing. M.C. Olga González, Asistente de Investigación, Laboratorio de Diagnóstico EEA Fortuna

Agr. Julián Colley, Estudiante graduado Departamento de Ciencias Agroambientales

Agr. José Ariel Muñoz, Administrador de la Finca Alzamora

Srta. Cristina Ramírez, Secretaria Finca Alzamora

Sra. Gloria Aguilar, Secretaria Oficina del Decano Asociado

Sra. Lymari Arzola, Secretaria Departamento de Ciencias Agroambientales

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por la licencia con remuneración concedida.

A mi mamá, Luz Mendoza Campos, mi sobrino Catriel Carrera Intriago, mi hermana y mejor amiga Yanina Intriago Mendoza, mi hermano Jaime Intriago Mendoza y mi abuelita Victoria Campos Jiménez.

Agradezco la amistad y ayuda que me brindó el personal de la Estación Experimental Fortuna: especialmente a Ana Soto, Gladys Soto, Manuel Renovales, Wanda Bové, Wanda Martínez y Carlos Almodóvar.

A mis compañeros estudiantes del Departamento de Ciencias Agroambientales: Lorena Simbaña, Leidy Sarmiento, Mayra Cathme, Karla Jaramillo, Roberto Díaz y Casiani Soto.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE CUADROS..... | viii |
| LISTAS DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE APÉNDICES..... | xii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Huanglongbing de los cítricos..... | 3 |
| 2.2. Importancia de la enfermedad HLB..... | 4 |
| 2.3. Distribución mundial del HLB..... | 5 |
| 2.4. Síntomas del HLB..... | 6 |
| 2.5. Diseminación del HLB..... | 7 |
| 2.6. El insecto vector de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’..... | 8 |
| 2.7. Adquisición y transmisión de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’..... | 8 |
| 2.8. Manejo de la enfermedad..... | 10 |
| 2.9. Detección de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’..... | 13 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 3.1. Descripción de experimentos en campo..... | 16 |
| 3.1.1. Experimento de genotipos de <i>Citrus reticulata</i> Blanco..... | 16 |
| 3.1.2. Colección de <i>Citrus ×sinensis</i> (L.) Osbeck en la EEA Adjuntas..... | 17 |
| 3.1.3. Experimento de <i>Citrus ×latifolia</i> (Yu.) Tanaka injertada en cinco patrones..... | 17 |
| 3.2. Evaluaciones de severidad de HLB..... | 17 |
| 3.3. Análisis estadístico..... | 19 |
| 3.4. Cálculo del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC)..... | 19 |
| 3.5. Colecta de hojas en campo para detección y cuantificación de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’..... | 20 |
| 3.6. Experimentos de laboratorio..... | 20 |
| 3.6.1. Detección de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’..... | 20 |
| 3.6.1.1. Detección mediante PCR convencional..... | 21 |
| 3.6.1.1.1. Procesamiento de hojas para extracción de ADN..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6.1.1.2. Extracción de ADN..... | 21 |
| 3.6.1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCRc)..... | 22 |
| 3.6.1.2. Detección de ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’ mediante amplificación isoterma de ADN..... | 22 |
| 3.6.2. Clonaje de genes utilizados como marcadores moleculares en experimentos de PCR cuantitativo (qPCR)..... | 23 |
| 3.6.3. Generación de curva estándar en qPCR mediante química SYBR® Green..... | 25 |
| 3.6.4. Determinación de muestras de <i>C. ×sinensis</i> positivas para ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’..... | 26 |
| 3.6.5. Determinación del título de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ en muestras de <i>C. ×sinensis</i> | 26 |
| 3.6.5.1. PCR cuantitativo con la química TaqMan..... | 26 |
| 3.6.5.2. Cálculo del número de genomas de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ por gramo de tejido..... | 27 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 28 |
| 4.1. Experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 28 |
| 4.1.1. Determinación de presencia de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’..... | 28 |
| 4.1.2. Incidencia de HLB..... | 29 |
| 4.1.3. Severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 32 |
| 4.1.3.1. Progreso de la severidad de HLB..... | 32 |
| 4.1.3.2. Severidad de HLB por tratamientos..... | 32 |
| 4.1.3.3. Análisis general en las cinco evaluaciones de severidad..... | 41 |
| 4.1.4. Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC) en experimento de <i>C. reticulata</i> | 42 |
| 4.1.4.1. AUDPC general en el experimento..... | 42 |
| 4.1.4.2. AUDPC por tratamiento..... | 43 |
| 4.2. Experimento de <i>C. ×sinensis</i> en la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 46 |
| 4.2.1. Detección de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ en genotipos de <i>C. ×sinensis</i> | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.2. Evaluación de severidad de HLB en genotipos de <i>C. ×sinensis</i> | 47 |
| 4.2.3. Obtención de clones para uso en PCRs cuantitativos..... | 49 |
| 4.2.4. PCR cuantitativo con muestras de <i>C. ×sinensis</i> para cuantificación del número de genomas por gramo de nervadura central..... | 50 |
| 4.2.5. PCR cuantitativo para la determinación del título de ‘ <i>Ca. L.</i> <i>asiaticus</i> ’ | 52 |
| 4.2.5.1. Determinación del número de copias del gen 16S rDNA por muestra..... | 52 |
| 4.2.5.2. Determinación del número de genomas por gramo de nervadura central fresca..... | 55 |
| 4.3. Evaluación de severidad de HLB en genotipos de <i>Citrus</i> spp. y en <i>Poncirus trifoliata</i> | 58 |
| 4.3.1. Severidad de HLB en <i>Citrus ×latifolia</i> injertada en cinco patrones | 58 |
| 4.3.2. Severidad de HLB en genotipos de <i>Citrus</i> spp. y en <i>P. trifoliata</i> ... | 59 |
| 4.3.3. Título de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ en tres genotipos híbridos de <i>Citrus</i> <i>×Poncirus trifoliata</i> | 60 |
| 4.4. Información suplementaria de los genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la Estación Experimental Agrícola Adjuntas..... | 61 |
| 4.4.1. Características físicas y grados Brix de frutos..... | 61 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 62 |
| 6. RECOMENDACIONES..... | 63 |
| 7. LITERATURA CONSULTADA..... | 64 |

LISTA DE CUADROS

| | | |
|-----------|---|----|
| Cuadro 1. | Escala de evaluación visual de severidad de HLB en árboles cítricos en campo..... | 18 |
| Cuadro 2. | Promedios de la primera evaluación de severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela a los 15 meses del trasplante..... | 33 |

| | | |
|------------|---|----|
| Cuadro 3. | Promedios de la segunda evaluación de severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela a los 19 meses del trasplante..... | 34 |
| Cuadro 4. | Promedios de la tercera evaluación de severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela a los 22 meses del trasplante..... | 35 |
| Cuadro 5. | Promedios de la cuarta evaluación de severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela a los 31 meses del trasplante..... | 37 |
| Cuadro 6. | Promedios de la quinta evaluación de severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela a los 35 meses del trasplante..... | 39 |
| Cuadro 7. | Promedios de severidad de HLB de las cinco evaluaciones realizadas en experimento con ocho genotipos de <i>C. reticulata</i> injertados en tres patrones, en el USDA/TARS, Isabela..... | 41 |
| Cuadro 8. | Valores AUDPC de HLB correspondientes a los 24 tratamientos y cuatro bloques de repeticiones del experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 44 |
| Cuadro 9. | Valores AUDPC de HLB de los factores genotipo y patrón en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 46 |
| Cuadro 10. | Detección de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ mediante PCR convencional en genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 46 |
| Cuadro 11. | Promedios de severidad de HLB en 13 genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas, en cuatro fechas de evaluación..... | 48 |
| Cuadro 12. | Promedios del ciclo de cuantificación y desviación estándar obtenidos mediante PCR cuantitativo de cinco muestras de 21 árboles de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 52 |
| Cuadro 13. | Valores Ct y desviación estándar de cinco muestras de 21 genotipos/árboles de <i>C. ×sinensis</i> , obtenidos mediante PCR cuantitativo con la química TaqMan y el juego de iniciadores HLBspr..... | 54 |
| Cuadro 14. | Número de copias del gen 16S rDNA de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ presente por gramo de nervadura central foliar de genotipos/árboles de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 55 |

| | | |
|------------|--|----|
| Cuadro 15. | Número de genomas de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ por gramo de nervadura central foliar de genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 56 |
| Cuadro 16. | Severidad de HLB en <i>C. ×latifolia</i> injertada en cinco patrones de cítricos, en la EEA Isabela..... | 58 |
| Cuadro 17. | Severidad de HLB en genotipos de <i>Citrus</i> spp. y en <i>P. trifoliata</i> , en la EEA Isabela..... | 59 |
| Cuadro 18. | Parámetros de características físicas y grados Brix de frutos de 13 genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Árbol con síntomas de amarillamiento foliar por HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 28 |
| Figura 2 | Amplificación de ADN genómico de ‘ <i>Candidatus. Liberibacter asiaticus</i> ’, de muestras foliares del experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 29 |
| Figura 3 | Síntomas de HLB observados en los árboles de <i>C. reticulata</i> en el experimento en el USDA/TARS, Isabela a los 15 meses del trasplante..... | 29 |
| Figura 4 | Síntoma de amarillamiento generalizado y pérdida de vigor en árbol del experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 30 |
| Figura 5 | Incidencia de HLB por bloque (I-IV) en cinco fechas de evaluación de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 31 |
| Figura 6 | Necrosis en ramas terminales de árboles con síntomas de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 31 |
| Figura 7 | Progreso de la severidad de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 32 |
| Figura 8 | Promedios de severidad de HLB en ocho genotipos de <i>C. reticulata</i> (factor genotipo) en la tercera evaluación de experimento en el USDA/TARS, Isabela..... | 36 |
| Figura 9 | Promedios de severidad de HLB en patrones (factor patrón) en la tercera evaluación del experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela.... | 36 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 10 | Promedios de severidad de HLB en ocho genotipos de <i>C. reticulata</i> (factor genotipo) en la cuarta evaluación del experimento en el USDA/TARS, Isabela..... | 38 |
| Figura 11 | Promedios de severidad de HLB en patrones (factor patrón) en la cuarta evaluación del experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela.... | 38 |
| Figura 12 | Promedios de severidad de HLB en ocho genotipos de <i>C. reticulata</i> (factor genotipo) en la quinta evaluación del experimento en el USDA/TARS, Isabela..... | 40 |
| Figura 13 | Promedios de severidad de HLB en patrones (factor patrón) en la quinta evaluación del experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela.... | 40 |
| Figura 14 | AUDPC general de HLB en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 43 |
| Figura 15 | Curvas de incremento de valores AUDPC de HLB por tratamiento en el periodo de 20 meses de evaluaciones de severidad en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 43 |
| Figura 16 | Valores promedio AUDPC de HLB por tratamiento en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela. Los tratamientos con los valores correspondientes están ordenados de forma ascendente de izquierda a derecha..... | 45 |
| Figura 17 | Amplificación de ADN genómico de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’ correspondiente a muestras de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 47 |
| Figura 18 | Fluctuación en el tiempo de la severidad de HLB en 13 genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas. Cuatro fechas de evaluación..... | 48 |
| Figura 19 | Valores AUDPC de HLB en los 13 genotipos de <i>C. ×sinensis</i> evaluados en la colección de cítricos de la EEA Adjuntas. Cálculos realizados con valores de cuatro fechas de evaluación..... | 49 |
| Figura 20 | Verificación de presencia de inserto de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ en 12 clones, mediante los iniciadores promotores T3/T7. El inserto corresponde a una secuencia parcial de una repetición en tándem de los genes profagos <i>hyvI/hyvII</i> | 50 |
| Figura 21 | Curva estándar con diluciones seriadas <i>log</i> 10 de ADN del plásmido recombinante conteniendo dos repeticiones en tándem de los genes <i>hvpI/hvpII</i> de la región profago de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’..... | 51 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 22 | Curvas de amplificación en PCR cuantitativo correspondientes a muestras con presencia de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’. ADNs de árboles de genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 51 |
| Figura 23 | Verificación de presencia de inserto de 1,160 pares de bases del gen 16S rDNA de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ en 16 clones con el plásmido recombinante..... | 53 |
| Figura 24 | Curvas de amplificación de ADNs de genotipos de <i>C. ×sinensis</i> mediante qPCR con la química TaqMan y el juego de iniciadores HLBaspr..... | 54 |
| Figura 25 | Número de genomas de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ por gramo de nervadura central foliar..... | 57 |
| Figura 26 | Promedio de severidad de HLB en árboles de <i>C. ×latifolia</i> injertada en cinco patrones en la EEA Isabela..... | 58 |
| Figura 27 | Promedio de severidad de HLB en genotipos de <i>Citrus</i> spp. y <i>P. trifoliata</i> en la EEA Isabela..... | 59 |
| Figura 28 | Curvas de amplificación en muestras con presencia de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’. ADNs de árboles híbridos de <i>Citrus</i> × <i>P. trifoliata</i> de experimento de la EEA Isabela..... | 60 |

LISTA DE APÉNDICES

| | | |
|------------|---|----|
| APÉNDICE 1 | Descripción de patrones utilizados en el experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 74 |
| APÉNDICE 2 | Información disponible sobre características de frutos de genotipos de <i>C. ×sinensis</i> de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 75 |
| APÉNDICE 3 | Árboles de genotipos de <i>C. ×sinensis</i> evaluados en la colección de cítricos de la EEA Adjuntas..... | 76 |
| APÉNDICE 4 | Determinación de parcelas con árboles infectados por ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela a los 14 meses del trasplante..... | 77 |
| APÉNDICE 5 | Efecto principal genotipo en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 77 |
| APÉNDICE 6 | Efecto principal patrón en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 78 |

| | | |
|------------|--|----|
| APÉNDICE 7 | Efectos simples genotipos en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 78 |
| APÉNDICE 8 | Efectos simples patrones en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de <i>C. reticulata</i> en el USDA/TARS, Isabela..... | 79 |

1. INTRODUCCIÓN

El “Huanglongbing” (HLB) o “Citrus Greening” es la enfermedad más destructiva a nivel mundial en los cultivos cítricos (Duan et al., 2009). En la última década el HLB ha amenazado la industria de los cítricos en todo el mundo (McCollum et al., 2016), y se ha convertido en la principal causa de pérdidas en todas las áreas de cultivo comercial donde ha sido reportada (Bové, 2006). Después de detectarse en Florida en el año 2005 (Halbert, 2005) el HLB se ha encontrado en países de Centroamérica y el Caribe (Matos et al., 2013). En Puerto Rico se detectó en el año 2009 (Estévez de Jensen et al., 2010), y más recientemente en Paraguay (Leite et al., 2013) y Costa Rica (Molina-Bravo et al., 2015). El HLB está asociado a tres especies de bacterias *Candidatus Liberibacter* estrechamente relacionadas entre sí, ‘*Ca. L. asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ (Li et al., 2006) y ‘*Ca. L. americanus*’, identificada en Brasil en 2004 (Teixeira et al., 2005). ‘*Ca. L. asiaticus*’ es la especie más diseminada en el norte, centro y sur de América y en el mundo y, además es la más virulenta (Ramadugu et al., 2016). Es una α -proteobacteria gram negativa (Jagoueix et al., 1994) de vida intracelular y con colonización restringida a las células del floema (Duan et al., 2009). Esta bacteria es transmitida por los psílidos *Diaphorina citri* Kuwayama y *Tryoza erythrae* Del Guercio (Hemiptera: Liviidae) (Aubert, 1987; Hoffman et al., 2013). Los síntomas de HLB en los cítricos incluyen declinamiento generalizado, amarillamiento, moteado foliar asimétrico, caída y pérdida de calidad de frutos, y finalmente muerte de los árboles (Gottwald et al., 2007). A pesar de las intensas medidas de manejo implementadas, la enfermedad ha continuado dispersándose e incrementándose hasta causar pérdidas que pueden ir del 30 al 100% (Gottwald, 2010). Las prácticas de manejo se centran en el control del vector (Lee et al., 2015). Además, se realizan prácticas para evitar que los árboles se infecten (Bové, 2006) y otras medidas como nutrición mineral mejorada (Roberts et al., 2014) y uso de técnicas como criopreservación (Ding et al., 2008) y microinjertación (Tsai et al., 2013) para obtención de plantas sanas. Por otra parte, aunque todos los genotipos de *Citrus* cultivados comercialmente son susceptibles a la enfermedad y no se han identificado genotipos resistentes dentro del género *Citrus*, diversos estudios han reportado variación entre cultivares en cuanto a su respuesta a la enfermedad (Folomonova et al., 2009; Grafton-Cardwell et al., 2013; Hajivand et al., 2009; McCollum et al., 2016).

Así mismo, se han determinado genotipos de géneros relacionados a *Citrus* (*Eremocitrus* y *Microcitrus*) y se han generado plantas de cítricos transgénicas con respuesta de resistencia/tolerancia e incluso inmunidad a este patógeno (Ramadugu et al., 2016; Dutt et al., 2015; Lu, H. et al., 2013).

Otras investigaciones han estudiado el efecto de patrones sobre la respuesta a HLB por parte de genotipos injertados, donde se ha encontrado que el patrón ejerce influencia en la reacción frente a la infección por ‘*Ca. L. asiaticus*’. En algunos casos esta reacción consiste en conferimiento de tolerancia a HLB (Bowman y McCollum, 2015; Bowman et al., 2016b).

En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar la severidad de HLB en genotipos de *Citrus ×sinensis*, *Citrus reticulata* y *Citrus ×latifolia* en experimentos individuales.
2. Determinar el título de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ en árboles individuales de *C. ×sinensis* con los menores valores de severidad de HLB.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Huanglongbing de los cítricos

Huanglongbing (HLB) que en mandarín significa enfermedad del dragón amarillo (Halbert y Manjunath, 2004), es la enfermedad más destructiva en los cítricos a nivel mundial (Bové, 2006) la cual está asociada a la bacteria '*Ca. L. asiaticus*' (Ramadugu et al., 2016) que es de naturaleza no cultivable. Por esta razón, no ha sido posible completar los postulados de Koch con este patógeno (Gottwald, 2010); sin embargo, la evidencia científica sugiere que esta bacteria es el agente causal de la enfermedad. En uno de estos estudios, mediante análisis de ADN metagenómico del floema, Tyler et al. (2009) encontraron que '*Ca. L. asiaticus*' era en algunos casos el principal y en otros casos el único microorganismo presente en árboles de cítricos con sintomatología de HLB. Su genoma completo fue secuenciado mediante análisis metagenómico, determinándose que posee un tamaño de 1.23 Mb y un contenido de guanina-citosina de aproximadamente 36.5% (Duan et al., 2009).

'*Ca. L. asiaticus*' es una α -proteobacteria Gram-negativo (Jagoueix et al., 1994) de vida intracelular y con colonización restringida exclusivamente a las células del floema, donde tiene un título o concentración baja (Duan et al., 2009). Esta localización ha sido comprobada mediante pruebas de especificidad con anticuerpos monoclonales (Ding et al., 2015). '*Ca. L. asiaticus*' se encuentra distribuida de manera irregular en el sistema vascular de los cítricos, ya que cuando se ha injertado con yemas provenientes de plantas enfermas con HLB, no siempre éstas dan origen a plantas enfermas. Gottwald en 2010 observó que la proporción de plantas enfermas está asociada a la intensidad de la infección en la planta madre. Por consiguiente, se puede encontrar gran variación en la distribución de la bacteria en los diferentes tejidos de una planta infectada (Li et al., 2009), particularmente en las nervaduras centrales de brotes terminales se han detectado las concentraciones más altas (Lee et al., 2015). En otro estudio, encontraron concentraciones variadas de la bacteria en los peciolos de diferentes hojas; en muchos casos se observó una mayor concentración en la mitad inferior de los peciolos. Contrariamente, los troncos fueron uniformemente colonizados y se observó la presencia de '*Ca. L. asiaticus*' en el círculo entero de las células del floema a lo largo del tallo. Igualmente, se ha reportado alta

concentración de '*Ca. L. asiaticus*' en vasos del floema de la cubierta de semillas de frutos provenientes de árboles con sintomatología de HLB. Mediante microscopía electrónica de transmisión, en cubierta de semillas de toronja observaron células bacterianas con características físicas y morfológicas compatibles para '*Ca. L. asiaticus*', acorde a las descritas en la literatura (Hilf et al., 2013).

La concentración de la bacteria en las raíces es baja (Ding et al., 2015). Sin embargo, en inoculaciones artificiales se encontró que las raíces son rápidamente colonizadas por la bacteria, por lo que es posible detectarla en plantas asintomáticas (Jhonson et al., 2014).

Varios autores indican que el título de '*Ca. L. asiaticus*' está relacionado a la intensidad de síntomas en las plantas (Stover et al., 2011). Así mismo, estos investigadores utilizan el parámetro de título de la bacteria como una variable adicional para establecer respuestas de susceptibilidad, tolerancia o resistencia. Contrariamente, Folimonova et al. (2009) informan que no hay una estricta correlación entre severidad de HLB y título de la bacteria y reportan, además, que '*Ca. L. asiaticus*' se multiplicó en todos los genotipos evaluados, incluidos genotipos que no mostraron síntomas.

2.2. Importancia de la enfermedad HLB

El HLB es la enfermedad más destructiva de los cítricos y especies relacionadas (Yan et al., 2015; Halbert y Manjunath, 2004). Ha causado cuantiosas pérdidas económicas en todas las regiones productoras donde ha sido reportada y representa una amenaza para todas las zonas citrícolas en el mundo (Bové, 2006). Además, todas las variedades cultivadas actualmente son susceptibles a la enfermedad (Grafton-Cardwell et al., 2013). Una vez que la plantación es afectada toma un tiempo de entre cinco y ocho años en volverse improductiva (Li et al., 2009). Es decir, que la diferencia en producción llega a ser muy significativa en una plantación antes y después del establecimiento de la enfermedad (Neupane et al., 2016). La reducción en producción puede ser de entre el 30 y 100% dependiendo de la edad de la planta en la que fue infectada (Gottwald, 2010).

En Florida (Estados Unidos de América) debido a esta enfermedad la producción ha disminuido en más del 50% en 2016 con menos de 80 millones de cajas (Neupane et al, 2016). Por otra parte, la reducción de plazas de trabajo en los diferentes eslabones de la cadena del sector cítrico se informó ser del 48% en ese estado (Hodges y Spreen, 2012). Así mismo, se informa que la producción de naranja en Florida continúa en decadencia debido a esta enfermedad (USDA, 2016) y que los incrementos en pérdidas de la producción se deben a un alto porcentaje de árboles infectados con HLB, en las regiones de mayor producción de cítricos en este estado (Singerman and Useche, 2015; USDA, 2016).

2.3. Distribución mundial del HLB

En China se encontró presencia de HLB hace más de cien años (Lin, 1956) y desde entonces esta enfermedad se ha diseminado alrededor del mundo debido a movilización humana y a transporte de cítricos (Gottwald, 2010). Hasta el año 2015 el HLB se encontraba en más de 40 países en África, América y Asia (Ding et al., 2015) y Oceanía (Davis et al., 2005); sin embargo, a la presente fecha la enfermedad se ha detectado en casi 60 países. En América, se reportó primero en Brasil en el año 2004 (Coletta-Filho et al., 2004) y luego en Estados Unidos en 2005 (Halbert, 2005) en Florida, el estado mayor productor de cítricos, con el 56% de la producción nacional (FAS/USDA, 2015). Además, la enfermedad está presente en República Dominicana (Matos et al., 2009), Cuba (Martínez et al., 2009), México [North American Plant Protection Organization's (NAPPO), 2010a], en las Islas Vírgenes (NAPPO, 2010b), Puerto Rico (Estévez de Jensen et al., 2010), Bécice (Manjunath et al., 2010), Argentina, Uruguay (Gottwald, 2012), Paraguay (Leite et al., 2013), Martinica y Guadalupe (Cellier et al., 2014) y Costa Rica (Molina-Bravo et al., 2015).

En Ecuador, no existen reportes científicos de la presencia de la enfermedad, sin embargo, ya se ha encontrado presencia del psílido vector (Cornejo y Chica, 2014). De la misma forma, en Colombia también se ha reportado el psílido [Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2007] pero en 2015 en dos municipalidades del Departamento de Guajira se detectaron brotes del insecto infectado con la bacteria [European and Mediterranean Plant Protection

Organization (EPPO), 2016], sin embargo, la enfermedad no se ha diseminado en el país debido a las medidas sanitarias adoptadas por las autoridades sanitarias gubernamentales.

2.4. Síntomas del HLB

El periodo de incubación de la bacteria puede variar significativamente de meses a incluso años después de la infección inicial (Manjunath et al., 2008). Este periodo puede depender de la edad del árbol en el momento de la infección (McCollum et al., 2016). Es decir, los síntomas de HLB se observan luego de algunos años que la bacteria infecta a la planta (Lee et al., 2015), lo que no permite detectarla a tiempo para tomar medidas antes de que continúe diseminándose.

Se ha informado la alteración de 988 genes/quantitative trait locus (QTLs) en plantas de cítricos infectadas con HLB (Aritua, et al., 2013). Estos genes/QTLs estuvieron involucrados en importantes funciones celulares como metabolismo de carbohidratos, organización celular, biogénesis de la pared celular y respuesta a estrés biótico y abiótico (Aritua et al., 2013). Estas alteraciones pueden explicar el desencadenamiento de síntomas en las plantas infectadas. Por ejemplo, al inicio de la enfermedad los síntomas pueden confundirse con deficiencia nutricional (Li et al., 2009), como aquellos por deficiencia de zinc y cobre (Aritua et al., 2013) y además confundirse con otras enfermedades. Los síntomas tempranos son el amarillamiento de venas de las hojas, y entre los más distintivos está la aparición de brotes amarillentos, aunque el resto del árbol tenga apariencia sana. En las hojas se observan moteados con un patrón de síntomas asimétrico en los dos lados de la hoja (Gottwald et al., 2007). El síntoma general en los cítricos puede describirse como una clorosis foliar severa (Gottwald, 2010). Mediante microscopía electrónica se ha podido determinar que en hojas afectadas por la enfermedad hay excesiva acumulación de almidón, deposiciones de callosa, obstrucción, necrosis y colapso del floema (Aritua et al., 2013). Las ramillas de árboles enfermos mueren de arriba hacia abajo (Aritua et al., 2013) ocasionando una muerte descendente (Gottwald, 2010; Lee et al., 2015). En árboles enfermos es común que se produzca caída de frutos antes de la época de cosecha (Bassanezi et al., 2009); y los frutos son pequeños, asimétricos y con presencia de parches amarillos (Bové, 2006). En general las características del fruto se ven afectadas, presentando menor tamaño,

mayor acidez y menor contenido de jugo (Gottwald, 2010). Igualmente, se observa maduración prematura y aborto de semillas (Aritua et al., 2013). También se ha encontrado que la proporción de frutos cosechados con síntomas de HLB se incrementa con relación a la severidad de la enfermedad en el árbol, lo que se traduce en una correlación negativa entre severidad de la enfermedad y producción, demostrándose que incluso bajos niveles de severidad causan reducción en la producción (Bassanezi et al., 2006). Las raíces de árboles enfermos también son afectadas (Jhonson et al., 2014) colonizadas por ‘*Ca. L. asiaticus*’, donde se observa mediante microscopía electrónica, reducción de almidón, engrosamiento y colapso de paredes celulares (Aritua et al., 2013). La evidencia sugiere que la afectación de raíces ocurre antes de que se observen síntomas en la parte foliar (Johnson, et al., 2012). De igual forma, la densidad de raíces disminuye en árboles infectados en un 32-46% con relación a árboles sanos. ‘*Ca. L. asiaticus*’ se ha detectado en las raíces meses antes de que el área foliar muestre la sintomatología descrita y pueda encontrarse presencia de la bacteria a partir de nervaduras (Johnson et al., 2012). En general se ha observado que las plantas infectadas son más susceptibles a estrés ambiental como climas extremos con relación a árboles sanos (Aritua et al., 2013).

2.5. Diseminación del HLB

El HLB puede ser diseminado a través de los insectos vectores *Trypza erytreae* del Guercio y *Diaphorina citri* Kuwayama; el primero, es el vector de ‘*Ca. L. africanus*’ y el segundo de ‘*Ca. L. asiaticus*’ y ‘*Ca. L. americanus*’ (Li et al., 2009). La enfermedad también se puede diseminar por propagación de material vegetal infectado, mediante la injertación de brotes procedentes de plantas enfermas durante el proceso de producción de árboles (Li et al., 2009) (Halbert y Manjunath, 2004). Esta transmisión también se ha logrado experimentalmente para fines de investigación (Hilf y Lewis, 2016). No se ha demostrado que la bacteria pueda transmitirse a través de semillas (Hilf et al., 2013). Por otro lado, Hartung et al. (2010) demostraron que *Cuscuta indecora* Choisy puede ser hospedero de ‘*Ca. L. asiaticus*’ y la bacteria puede llegar a multiplicarse a concentraciones altas como 1.4×10^{10} células/gramos de zarcillo de esta planta. También se encontró que la colonización de la bacteria en estos tejidos no es uniforme pudiéndose encontrar vasos de floema llenos de células de la bacteria, y a la vez vasos con completa ausencia de ésta (Hartung et al., 2010).

2.6. El insecto vector de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

El psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) es considerado el insecto plaga de mayor importancia en los cítricos alrededor del mundo, debido a su capacidad de transmitir la bacteria ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Grafton-Cardwell et al., 2013). Se ha informado que un porcentaje superior al 99% de psílicos colectados de árboles con síntomas de HLB, fueron positivos en la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Ukuda-Hosokawa et al., 2015).

Su presencia se ha informado en África meridional, central, oriental y occidental, en la península árabe e islas del océano Índico (da Graça, 2005). En América del Sur se encuentra desde 1940 y se ha diseminado hacia América Central y el Caribe (da Graça, 2005). El psílido fue encontrado por primera vez en Florida en junio de 1998 (Halbert, 2005) y en Puerto Rico en 2001 (Halbert y Nuñez, 2004). El psílido adulto se alimenta de tallos jóvenes y hojas de todas las edades, pero las ninfas lo hacen exclusivamente de tejidos jóvenes que es donde se desarrollan (Michaud, 2004), y donde el insecto adulto oviposita (Grafton-Cardwell et al., 2013; Richardson y Hall, 2013). Adicionalmente, el insecto produce daño mecánico en los árboles, por lo que infestaciones altas pueden causar deformación de brotes y reducción de su crecimiento (Michaud, 2004).

Aunque este insecto tiene un estrecho rango de hospederos (Halbert y Manjunath, 2004) se ha encontrado que no sólo se alimenta de cítricos sino de otras especies rutáceas como *Murraya paniculata* (L.) Jack y *Severina buxifolia* Poiret, especies que sirven de hospederas de la bacteria y por tanto fuente de dispersión de la enfermedad (Brlansky et al., 2009). Entre los hospederos, se ha determinado que genotipos de naranja dulce [*Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck] son más susceptibles al insecto vector con respecto a otros, como limón [*Citrus ×limon* (L.) Burm], mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), toronja (*Citrus ×paradisi* Macfad.), tangelo (*C. reticulata* ×*C. paradisi*), *Poncirus trifoliata* L. Raf., entre otras (Borgoni et al., 2014).

2.7. Adquisición y transmisión de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

El psílido vector *Diaphorina citri* adquiere la bacteria ‘*Ca. L. asiaticus*’ siendo ninfa o adulto al alimentarse del floema de plantas infectadas (Pelz-Stelinski et al., 2010). En este aspecto, resultados experimentales sugieren que estos insectos pueden adquirir la bacteria incluso en árboles de cítricos asintomáticos que se encuentran en etapas tempranas de infección (Coletta-Filho et al., 2014). Los resultados de Ammar et al. (2016) demostraron que luego de que el insecto en estado ninfal tuvo acceso a adquisición de ‘*Ca. L. asiaticus*’ durante un periodo de 1 a 7 días, entre el 49 y 59% de psílicos resultaron positivos para ‘*Ca. L. asiaticus*’; mientras que cuando los insectos fueron expuestos a la bacteria en estado adulto el porcentaje de individuos infectados fue de entre 8 y 29%, es decir significativamente menor. Posiblemente la bacteria se multiplica más rápidamente en ninfas que en adultos (Ammar et al., 2016).

Luego de la adquisición se desarrolla una infección sistémica en el cuerpo del insecto (Ukuda-Hosokawa et al., 2015) en que la bacteria se localiza tanto en la hemolinfa como en las glándulas salivares del psílido (Manjunath et al., 2008). Consecuentemente, los psílicos permanecen infecciosos durante todo su tiempo de vida (Ammar et al., 2001).

Los adultos de *D. citri*, que adquieren ‘*Ca. L. asiaticus*’ como ninfas, transmiten esta bacteria más eficientemente que aquellos insectos que adquieren la bacteria siendo adultos, lo cual puede deberse a que la bacteria requiere de un periodo latente prolongado para replicarse en el cuerpo del insecto antes de poder ser transmitida (Pelz-Stelinski et al., 2010).

Grafton-Cardwell et al. (2013) mencionan que el periodo en el cual las ninfas o adultos adquieren la bacteria (al alimentarse) y la transmiten a una planta puede ser de entre 15 minutos a 24 horas (Grafton-Cardwell et al., 2013). Se ha demostrado que la bacteria puede replicarse en el canal alimentario y glándulas salivares (Ammar et al., 2001) y la eficiencia de esta transmisión es influenciada por factores relacionados tanto al vector como al estado de desarrollo y a los periodos de alimentación (Coletta-Filho et al., 2014). Ukuda-Hosokawa et al. (2015) mencionan que se requiere de una densidad de 10^6 células bacterianas por insecto para que se produzca la transmisión y que un alto porcentaje de insectos en campo pueden contener la bacteria.

Aunque varios autores informan que ‘*Ca. L. asiaticus*’ es transmitida por el psílido en una forma persistente circulativa [(Ammar et al. (2016); Ghanim et al. (2016)], los resultados de Elz-Stelinski et al. (2010) demostraron que el insecto es capaz de transmitir el patógeno transováricamente a la progenie en una proporción del 3.6%.

2.8. Manejo de la enfermedad

Al presente no hay cura para el HLB una vez que las plantas han sido infectadas (Manjunath et al., 2008; Ramadugu et al., 2016), y tampoco existe un método efectivo de control (Lu et al., 2013), por lo que los esfuerzos se concentran en el manejo de la enfermedad, el cual se basa en la integración de métodos (Halbert y Manjunath, 2004). En este contexto, el principal método consiste en evitar que los árboles se infecten (Bové, 2006) y si ya se ha producido la infección, es primordial realizar detección temprana de árboles enfermos para tomar medidas oportunas (Li et al., 2009). Por ejemplo, en áreas geográficas donde la enfermedad aún no se ha establecido, la detección temprana del patógeno es la medida más importante (Fujikawa et al., 2013), ya que permitirá la eliminación de árboles enfermos para evitar que estos sean una fuente de inóculo para los insectos vectores. Por otro lado, si la enfermedad está establecida, la remoción es la única medida que asegurará que estos árboles infectados no sean fuente de la bacteria para adquisición y diseminación por el insecto vector (Brlansky et al., 2009).

Medidas como el uso de material de siembra certificado libre del patógeno es una práctica ampliamente recomendada (Brlansky et al., 2009). Un caso particular que se puede citar es el de Florida, donde los árboles enfermos que son removidos se reemplazan con nuevos árboles mantenidos en invernaderos cerrados libres de la enfermedad (National Research Council of the National Academies, 2010). En China, se realizó crio-preservación mediante vitrificación para obtención de plantas *in vitro* libres de ‘*Ca. L. asiaticus*’; este tratamiento eliminó el patógeno de meristemas de plantas enfermas. Un porcentaje superior al 98.1% de plantas obtenidas con este tratamiento estuvieron libres de la bacteria en contraste con el 25.3% obtenido con el método convencional consistente en cultivo de punta de meristemo (Ding et al., 2008). Otra práctica utilizada para obtención de material propagativo sano es la micro-injertación de

punta de brote, considerado el método más confiable para obtener plantas libres de ‘*Ca. L. asiaticus*’ a partir de plantas madres infectadas (Tsai et al., 2013).

Comercialmente el control de esta enfermedad se centra en el vector (Lee et al., 2015) y entre las estrategias de manejo el uso de insecticidas químicos tiene un papel fundamental, debido a su alta efectividad en el control de poblaciones que favorecen la diseminación de la enfermedad (Qureshi et al., 2014). Entre los insecticidas más utilizados para reducir las poblaciones del insecto están imidacloprid, fenpropathrin, clorpirifos y dimetoato (Yan et al., 2015), así como flupyradifurone (Qureshi et al., 2011). Aplicaciones de insecticidas químicos selectivos en mezcla con aceite vegetal, pueden disminuir las poblaciones del insecto durante más de 17 días después de su aplicación (Qureshi et al., 2011). De entre 42 productos evaluados, 38 suprimieron significativamente entre el 90 y 100%, los adultos del insecto en comparación con el control sin aplicación. De estos productos, 40 redujeron el número de insectos en estado ninfal en un 90% en promedio (Qureshi et al., 2014). La aplicación de aceite durante la etapa de crecimiento redujo la población del psílido y los ingredientes activos que ejercieron mayor reducción del insecto tanto en estadio ninfal como adulto en primavera fueron: spirotetramat, tolfenpyrad, abamectin + thiamethoxam y diflubenzuron aplicados en mezcla con aceite 435 y fenpyroximate aplicado solo; mientras que en verano, los ingredientes activos que más suprimieron al psílido fueron: spinetoram más aceite 435 y flupyradifurone (Qureshi et al., 2011).

Se han publicado resultados acerca del uso de hongos entomopatógenos, parasitoides y depredadores para el control biológico del insecto (Grafton-Cardwell et al., 2013). Entre los hongos entomopatógenos se mencionan a *Isaria fumosorosea* Wize, *Lecanicillium lenanii* R. Zare y W. Gams, *Beauveria bassiana* Balls (Vuill) e *Hirsutella citriformis* Speare (Hall et al., 2012). Existen depredadores del psílido como escarabajos y arañas (Qureshi et al., 2014), moscas sírfidos y crisopas. En Asia se han identificado a las especies *Tamarixia radiata* Waterston y *Diaphorencyctus aligarhensis* Shafee, Alam y Agarwal, parasitando al psílido (Hall, 2001), el primero de los cuales se encuentra en Puerto Rico (Qureshi y Stansly, 2010). *T. radiata* no se considera muy efectivo para el control de *D. citri* (Michaud, 2002), sin embargo, en Puerto Rico las tasas de parasitismo pueden llegar al 88% (Pluke et al., 2008). Por otro lado, los depredadores

Chrysoperla comanche y *Diomus pumilio* se informan como promisorios agentes del control del psílido (Goldmann, 2017). Se han realizado investigaciones mediante evaluación de repelentes físicos como películas de partículas de arcilla y manto de polietileno metalizado, materiales que han reducido la diseminación de *D. citri* (Yan et al., 2015).

Se ha informado tolerancia a *D. citri* en accesiones de *Citrus ×Poncirus trifoliata*, donde el 36% de éstas de entre 81 accesiones evaluadas, no presentaron oviposición del psílido, en contraste con el control *Citrus macrophylla* Wester, en el que hubo abundancia de posturas. Esta resistencia podría deberse a un efecto de antixenosis y antibiosis de *P. trifoliata* hacia el insecto (Richardson y Hall, 2013). En *P. trifoliata* se ha observado menos incidencia del insecto vector por mecanismos químicos de la planta y no por características estructurales de la misma (Boava et al., 2015).

La aplicación de los antibióticos (penicilina G y estreptomicina) y KO (kasugamicina y oxitetraciclina) combinados redujeron el título de '*Ca. L. asiaticus*' (Zhang et al., 2013). Igualmente, en injertos, se evaluaron 29 antibióticos entre los cuales ampicilina, carbenicilina, penicilina, cefalexina, rifampicina y sulfadimetoxina mostraron ser efectivos en reducción del título (concentración) de la bacteria en árboles infectados (Zhang et al., 2014). Compuestos antimicrobiales como plata y aluminio en forma iónica o en nanopartículas son efectivos contra la bacteria al interferir con procesos biológicos fundamentales (Yang et al., 2018).

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la reducción del título de '*Ca. L. asiaticus*' en plántulas infectadas, se evaluaron diferentes temperaturas en periodos de entre dos días y cuatro meses y se determinó que las plantas expuestas a temperaturas de 40 a 42°C durante un periodo mínimo 48 horas produjeron una reducción de la bacteria a niveles indetectables mediante PCR cuantitativo y en otros casos la eliminación del patógeno (Hoffman et al., 2013). Los tratamientos con calor y antibióticos son efectivos para tratar cortes de brotes a utilizarse en injertación en condiciones de invernadero, pero no eliminan por completo la bacteria de árboles infectados (National Research Council of the National Academies, 2010).

En bioensayos de campo con naranja dulce ‘Valencia’ utilizando inyecciones con fosfito y manganeso-carbonato, manganeso-metalosato, cobre-metalosato, zinc-metalosato y los tratamientos cobre soluble o plata mezclado con un polímero, comparados con fertilización estándar y control de psíidos, no hubo diferencias en el título de la bacteria, productividad de los árboles, número de frutos caídos, y variables de calidad del jugo como grados Brix, ácido y relación grados Brix: ácido. Otro experimento realizado por estos mismos investigadores mostró que no hubo diferencias en producción, progreso de la enfermedad y dinámica epidémica entre parcelas de tres bloques con fertilización convencional y parcelas de tres bloques con programas nutricionales mejorados (Gottwald et al., 2012).

No se ha encontrado fuentes de resistencia a la enfermedad en el género *Citrus* (Boava et al., 2015), ni en especies relacionadas (Manjunath et al., 2008; Boava et al., 2015). Las variedades de *Citrus* spp. comerciales son susceptibles al patógeno (Folimonova et al., 2009). Sin embargo, se han identificado cultivares de *Citrus* (Ramadugu et al., 2016) y la especie *P. trifoliata* L. (Raf) y a varios híbridos de esta especie como poseedoras de tolerancia a la enfermedad (Boava et al., 2015). Ramadugu et al. (2016), encontraron que, entre 65 accesiones de *Citrus* y 33 accesiones de 20 géneros relacionados, dos accesiones de géneros relacionados a *Citrus* tuvieron respuesta inmune a ‘*Ca. L. asiaticus*’, seis fueron resistentes y 14 tolerantes, las que toleran la replicación de la bacteria y luego la suprimen completamente. Folimonova et al. (2009) reportaron diferencias en respuestas de 30 genotipos a la enfermedad, las que variaron de tolerantes a sensibles. Además, McCollum et al. (2016) mencionan a los híbridos 1-4-59 y Fallglo como genotipos de menor susceptibilidad.

Adicionalmente, se ha evaluado el uso de diversos patrones, destacándose híbridos del cruce entre *Citrus* y *P. trifoliata*, como los genotipos ‘US-897’ y ‘US-942’ por sus respuestas de tolerancia a HLB (Albrecht y Bowman, 2012). Otro estudio similar corroboró la menor severidad de síntomas en el híbrido ‘US-897’ y menor severidad en la copa en árboles injertados sobre el patrón híbrido ‘US-802’ (Albrecht, McCollum y Bowman, 2012). Se cree que, a futuro, alternativas como transformación genética de la planta hospedera, de la bacteria y/o el insecto vector podrían ser soluciones a esta grave enfermedad (Duan et al., 2009).

2.9. Detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’

Puede haber dificultades en la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ debido a su baja concentración en los tejidos, su distribución desuniforme en la planta y por efecto de inhibidores presentes en el tejido vegetal (Li et al., 2009; Hocquellet et al., 1999; Manjunath et al., 2007). Por otro lado, los resultados pueden ser variables incluso con un mismo grupo de muestras, debido a la distribución desigual en los diferentes tejidos y partes del árbol (Lu, L. et al., 2013).

Antes del desarrollo de técnicas moleculares para detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’, el diagnóstico se realizaba observando tejidos de plantas infectadas mediante microscopía electrónica de transmisión (Folimonova y Achor, 2010). Luego se desarrollaron técnicas de detección como el PCR convencional que es una de las más utilizadas para detectar este patógeno en plantas y en el vector (Fujikawa et al., 2013) debido a su bajo costo y fácil realización (Fujikawa et al., 2013; Li et al., 2009).

La técnica de PCR cuantitativo (qPCR) se ha utilizado exitosamente por Li et al. (2009), con la cual mostraron que la concentración de la bacteria es significativamente variable en los tejidos de diferentes especies de *Citrus*. También determinaron que en la membrana locular y septa del fruto en limón, los valores del umbral de detección [*cycle threshold* (Ct)] fueron menores, lo que indica mayor concentración de la bacteria en estos tejidos. El PCR cuantitativo puede detectar la bacteria en órganos de psílidos adultos individualmente, y se ha demostrado que el porcentaje de detección es más bajo en las glándulas salivares que en otras partes del cuerpo del insecto (Ammar et al., 2011). Actualmente, el qPCR es el método de detección preferido ya que es “10 veces más sensitivo que nested PCR” y de 100 a 1000 veces más que el PCR convencional (Morgan et al., 2012) por lo que ha ganado la mayor aceptación para la detección temprana de distintos fitopatógenos (Mirmajlessi et al., 2015).

Fujikawa et al. (2013) lograron extraer células de la bacteria a partir de nervaduras centrales de hojas de árboles infectados, mediante pulverización y centrifugación utilizando mini tubos de homogenización. El PCR con el uso directo del sedimentado obtenido de esta forma y el par de iniciadores Las606/LSS, permitieron detectar la bacteria, ahorrando el tiempo y costo de

extracción de ADN. Los autores afirman que este método resultó más exitoso y eficiente que el PCR convencional con el par de iniciadores OI1/OI2c.

Diferentes métodos han sido desarrollados para la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’. Mediante análisis de metagenómica realizado a tejidos del floema de plantas con síntomas de HLB, se ha determinado la presencia únicamente de ‘*Ca. L. asiaticus*’ y no de otro patógeno adicional (Tyler et al., 2009), corroborándose la asociación entre la enfermedad y ‘*Ca. L. asiaticus*’. Utilizando como inmunógenos extractos de tejidos del floema de plantas infectadas de *Vinca minor* L., se han desarrollado más de 10 anticuerpos monoclonales contra ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Lu, L. et al., 2013). También se ha desarrollado un método ELISA para la detección del patógeno (Ding et al., 2016). Adicionalmente, mediante el uso de espectroscopía transformada de Fourier infrarroja (FTIR, por sus siglas en inglés) se desarrolló una tecnología que permite identificar cambios en compuestos químicos y reacciones en hojas aún asintomáticas permitiendo la detección temprana de la enfermedad y discriminando de hojas sanas (USDA, 2011).

Aunque ‘*Ca. L. asiaticus*’ puede ser detectada en cualquier época del año una vez que la bacteria ha alcanzado concentraciones detectables en la planta, Sauer et al. (2015) señala al otoño como la mejor época para detectar la bacteria en los cítricos, debido a que, en ésta su concentración en los tejidos es más alta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos de laboratorio se efectuaron en el laboratorio de la Clínica de Diagnóstico de la Subestación Experimental Agrícola Fortuna de la Universidad de Puerto Rico, ubicada en, Juana Díaz, PR. El clonaje de genes utilizados para experimentos de PCR cuantitativo se realizó en el Laboratorio de Microorganismos Extremófilos del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, PR. Se evaluó la severidad de síntomas por HLB en huertos de cítricos establecidos en las Estaciones Experimentales de Adjuntas e Isabela de la Universidad de Puerto Rico y en la Estación de Investigaciones en Agricultura Tropical (TARS, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) como se detalla en los párrafos siguientes.

3.1. Descripción de experimentos en campo

Se describen los experimentos con los tipos de cítricos: especies, híbridos y cultivares que los componen, a los cuales se nombran siguiendo la información del Sistema de Germoplasma de Plantas Nacional de los Estados Unidos (NPGS, por sus siglas en inglés) a través de la información taxonómica disponible en la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN, por sus siglas en inglés).

3.1.1. Experimento de genotipos de *Citrus reticulata* Blanco

El experimento de *Citrus reticulata* (mandarina) fue establecido por el Dr. Ricardo Goenaga en la Estación de Investigaciones en Agricultura Tropical del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, ubicada en Isabela, PR. El experimento está constituido por ocho genotipos de *C. reticulata*, injertados en los patrones ‘C-35 Citrange’, mandarina ‘Cleopatra’ y ‘US-942’ (características en Apéndice 1), los que resultan en un total de 24 combinaciones o tratamientos dispuestos en un diseño de bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones y donde cada parcela está compuesta por tres árboles. El arreglo de los árboles en el campo fue en tresbolillo con una distancia entre árboles de 18 pies y entre líneas de 9 pies. Según comunicación personal del Dr. Goenaga, los patrones se originaron de semilla y los

genotipos injertados se obtuvieron de la colección de cítricos del USDA en Fort Pierce, Florida. Tanto injertos como patrones fueron certificados como libres de HLB. Las plantas fueron mantenidas en invernadero desde su injertación hasta los seis meses de edad, cuando se realizó el trasplante en campo en agosto 5 de 2015.

3.1.2. Colección de *Citrus* ×*sinensis* en la EEA Adjuntas

En un huerto de cítricos de la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas de la Universidad de Puerto Rico se conservan genotipos de *Citrus* ×*sinensis* seleccionados hace unas seis a siete décadas por horticulturistas puertorriqueños. Esta Estación Experimental está ubicada en la región montañosa del centro de Puerto Rico, Adjuntas, PR. La colección de cítricos fue establecida entre los años 2003 y 2005. Los árboles están sembrados a una distancia de 5 m x 6 m, aproximadamente. Cada genotipo tiene entre uno y seis árboles dispuestos aleatoriamente en el lote de la colección. Estos árboles están injertados sobre el patrón mandarina ‘Cleopatra’ (*Citrus reticulata* Blanco). Para la evaluación se consideraron 13 genotipos: ‘Rico 1-28’, ‘Rico 1-374’, ‘Rico 3-80’, ‘Rico 4-45’, ‘Rico 5-50’, ‘Rico 7-56’, ‘Rico 2-376’, ‘Frontón’, ‘Helada’, ‘Lares 82’, ‘Padilla’, ‘Pietri 334’ y ‘Salustiana’ (Apéndice 2).

3.1.3. Experimento de *Citrus* ×*latifolia* (Yu. Tanaka) injertada en cinco patrones

Se evaluaron árboles de *Citrus* ×*latifolia* (limón persa) en la Estación Experimental Agrícola de Isabela, ubicada en Isabela, PR. Los árboles formaron parte de un experimento establecido en 2009, el cual consistió en *C. ×latifolia* injertado en cinco patrones de cítricos: ‘Swingle Citrumelo’ [*C. ×paradisi* Macfad. ×*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], ‘Carrizo Citrange’ [*C. ×sinensis* (L.) Osbeck ×*P. trifoliata* (L.) Raf.], ‘HRS 812’ [mandarina ‘Sunki’ *C. reticulata* Blanco ×*P. trifoliata* (L.) Raf.], limón rugoso (*C. ×jambhiri* Lush) y mandarina ‘Cleopatra’ (*C. reticulata* Blanco). Los árboles se encontraban sembrados a una distancia de 4.5 m x 5.9 m.

3.2. Evaluaciones de severidad de HLB

En cada lote experimental con los genotipos descritos se realizaron evaluaciones de severidad de HLB, mediante el uso de la escala visual del 1 al 7 (Cuadro 1), propuesta por Rouse et al., (2010) la cual se modificó para ajustarla a las condiciones de los árboles de los experimentos.

Cuadro 1. Escala de evaluación visual de severidad de HLB en árboles en campo.

| Grado | Descripción |
|-------|--|
| 1 | Ausencia de síntomas de HLB, árbol vigoroso |
| 2 | Árbol vigoroso, amarillamiento de brotes y engrosamiento de nervaduras centrales |
| 3 | Declinamiento moderado, amarillamiento de varias ramas (aproximadamente el 10% de la copa del árbol) |
| 4 | Declinamiento moderado del árbol, amarillamiento de varias ramas (aproximadamente el 25% de la copa del árbol) y apariencia no vigorosa del árbol. |
| 5 | Severo declinamiento del árbol (aproximadamente el 50% de la copa del árbol) y apariencia no vigorosa del árbol. |
| 6 | Declinamiento severo y secamiento (aproximadamente el 75% de la copa del árbol afectado) |
| 7 | Árbol muerto |

En el experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela, se realizaron cinco evaluaciones visuales de severidad. Estas evaluaciones se efectuaron a los 15, 19, 22, 31 y 35 meses después del trasplante (noviembre 7 de 2016, marzo 3 y junio 23 de 2017 y, marzo 20 y julio 11 de 2018).

En la colección de *C. ×sinensis* en la EEA Adjuntas se evaluaron entre uno y seis árboles por cada uno de los 13 genotipos de la colección: ‘Rico 1-28’ (5 árboles), ‘Rico 1-374’ (6 árboles), ‘Rico 2-376’ (4 árboles), ‘Rico 3-80’ (2 árboles), ‘Rico 4-45’ (3 árboles), ‘Rico 5-50’ (2 árboles), ‘Rico 7-56’ (2 árboles), ‘Frontón’ (4 árboles), ‘Helada’ (3 árboles), ‘Lares 82’ (6 árboles), ‘Padilla’ (4 árboles), ‘Pietri 334’ (5 árboles), ‘Salustiana’ (5 árboles) (Apéndice 3). Estos árboles se evaluaron en cuatro fechas: julio, agosto y diciembre de 2017 y febrero de 2018.

En el experimento de *C. ×latifolia* en Isabela se evaluaron cuatro repeticiones (2 árboles por repetición) por tratamiento. En este experimento se realizó una evaluación de la enfermedad, utilizando la escala de severidad previamente descrita.

3.3. Análisis estadístico

Para identificar genotipos con menor severidad de síntomas de HLB, los datos de severidad se sometieron a un análisis de varianza utilizando el programa estadístico Infostat versión estudiantil 2018. En los experimentos de *C. reticulata* y *C. ×latifolia* se realizó un análisis de diseño de bloques completos aleatorizados y en *C. reticulata* adicionalmente se realizó un análisis factorial 8x3 (ocho genotipos, tres patrones). La comparación de medias se realizó con la prueba LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher a un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0.05$). La normalidad de los datos se verificó realizando la prueba de Shapiro-Wilks y se comprobó además la homogeneidad de varianzas mediante gráficos de residuos y predichos. En la primera evaluación de severidad en el experimento de *C. reticulata* en que no se encontró homogeneidad y normalidad de varianzas, se realizó transformación de datos a logaritmo 10 previo al análisis de varianza.

3.4. Cálculo del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC)

El AUDPC (por sus siglas en inglés) es la medición cuantitativa de la intensidad de una enfermedad en el transcurso del tiempo. De modo que, se utiliza para comparar la intensidad de una enfermedad específica, en una especie vegetal determinada, entre diferentes localidades, genotipos, lapsos de tiempo, etc. (American Phytopathological Society, sf).

Se calcularon los valores AUDPC en los experimentos de *C. reticulata* y *C. ×sinensis*, los que sirvieron como un criterio adicional para determinar resistencia, tolerancia o susceptibilidad de los genotipos evaluados frente a HLB. El AUDPC se basó en determinar el desarrollo y acumulación de la enfermedad en el tiempo por cada genotipo. Para su estimación se utilizaron los valores obtenidos de las evaluaciones de severidad, los que se sometieron en la siguiente fórmula:

$$AUDPC = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[(y_i + y_{i+1}) / 2 \right] * (t_{i+1} - t_i) \right\}$$

Donde:

Σ = sumatoria

n = número de evaluaciones

i = iésima observación

y = calificación de la severidad

t = tiempo en días

Los valores del AUDPC obtenidos también se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico Infostat versión estudiantil 2018 y las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba LSD de Fisher a un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0.05$).

3.5. Colecta de hojas en campo para detección y cuantificación de ‘*Ca. L. asiaticus*’

Para detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en el experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela, se colectó una muestra por cada una de las 96 parcelas del experimento (24 tratamientos en cuatro bloques de repeticiones). Cada una de estas 96 muestras estuvo compuesta por seis hojas de los tres árboles de la parcela. Para detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los genotipos de *Citrus × sinensis*, se colectaron cinco hojas de 32 árboles seleccionados aleatoriamente en la colección. Las hojas se colocaron en bolsas plásticas rotuladas y se mantuvieron en una caja térmica con hielo hasta su traslado al laboratorio.

Para cuantificación del título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los genotipos de *Citrus × sinensis* de la colección de cítricos de Adjuntas, se colectaron aleatoriamente cinco muestras individuales por árbol (5 hojas por muestra), seleccionándose los árboles con calificación de 3 o menor (calificación 1, 2, o 3), según la escala de severidad utilizada, previamente descrita. En el experimento de *C. × latifolia* de la EEA Isabela se colectaron cinco hojas por árbol.

3.6. Experimentos de laboratorio

3.6.1. Detección de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

La detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en las muestras colectadas se realizó mediante PCR convencional y mediante la química DNable, que se describen más adelante.

3.6.1.1. Detección mediante PCR convencional

3.6.1.1.1. Procesamiento de hojas para extracción de ADN

De las hojas colectadas se extrajeron las nervaduras centrales, las cuales se picaron en cortes finos con un bisturí industrial (VWR 55411-050). Muestras de 200 mg de este tejido picado se transfirieron a microtubos plásticos de 1.5 ml (Eppendorf) conteniendo cuatro esferas de vidrio sólido (borosilicato) de 3 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) para eventualmente homogenizarlas mediante agitación en un mini agitador (Biospec 3110BX).

3.6.1.1.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el “kit” comercial DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con modificaciones propuestas por la División de Cuarentena de Plantas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA, APHIS, PPQ, CPHST (2009)]. Se procedió de la siguiente forma: a cada tubo con los 200 mg de tejido de nervaduras foliares picadas se le agregó 800 μ L de la solución amortiguadora AP1 y 8 μ L de RNasa A y se homogenizó con un vórtex por 15 segundos. Seguido, estos tubos se colocaron en una incubadora agitadora a 65 °C, 300 rpm, por 10 minutos. Luego a cada uno se le agregaron 260 μ L de la solución amortiguadora AP1, se agitaron por 10 segundos con un vórtex y se colocaron en hielo por cinco minutos. Se procedió a centrifugar las muestras a 14000 rpm por 10 minutos y se transfirieron aproximadamente 500 μ L del sobrenadante de cada tubo a una columna de centrifugado (QIAshredder), y se centrifugó a 14000 rpm por dos minutos. Se transfirieron aproximadamente 500 μ L del eluido de la columna a tubos de microcentrifuga nuevos de 2 mL y se agregó 1.5 volúmenes (aproximadamente 750 μ L) de la solución amortiguadora AW1 e inmediatamente se mezcló por pipeteo. De la mezcla resultante para cada muestra se transfirieron 650 μ L a una columna de purificación con su respectivo tubo colector se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. Se descartó el tubo colector conteniendo el eluido y la columna de purificación fue colocada sobre un tubo colector nuevo

para repetir la centrifugación con el volumen de mezcla restante. Luego de este paso la columna de purificación se colocó en otro tubo colector nuevo para realizar dos lavados consecutivos utilizando 500 µL de la solución amortiguadora AW2. Después del primer lavado el tubo se centrifugó a 8000 rpm por un minuto y luego del segundo lavado se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos para secar la membrana. En el centro de la membrana se colocó 100 µL de la solución amortiguadora de elución AE. Se incubó a temperatura ambiente \pm °C 25 por cinco minutos y luego se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Finalmente el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf AG Biophotometer, No. 6132 01221).

3.6.1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCRc)

Se realizó la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en muestras del experimento de *C. reticulata* de USDA/TARS a los 14 meses del trasplante mediante la técnica de PCRc, con la amplificación de la región 16S del rDNA, utilizando los iniciadores OI1 (forward 5’- GCGCGTATGCAAGAGCGGCA-3’) y OI2c (reverse 5’- GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3’) (Li et al., 2006). Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 25 µL con la siguiente composición: 12.5 µL de Go Taq® Master Mix de (Promega, Madison, WI) el cual contiene una solución premezclada de *Taq* ADN polimerasa, dNTPs (400µM de cada uno), MgCl₂ (3 mM) en solución amortiguadora, 2.5 µL de cada iniciador (1 µM), 2.5 µL de agua molecular y 5 µL de ADN (20 ng/µL). El programa de amplificación fue de 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos y 72 °C por un minuto, utilizando un termociclador (Biometra T3000). Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (45 minutos y 100 voltios) teñida con el tinte intercalante SYBR® Safe (Invitrogen). Para determinar el tamaño de bandas se utilizó un marcador de peso molecular BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). La visualización de los productos migrados se realizó en un fotodocumentador Bio-Rad modelo Universal Hood II.

3.6.1.1.2. Detección de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ mediante amplificación isotermal de ADN

La amplificación isotermal de ADN es un método de detección molecular patentado que utiliza la química DNable, basada en un proceso similar al PCR. En la detección se utilizó el

“kit” comercial de Enviroligix Inc. (Portland, Maine) y la amplificación se realizó con el instrumento lector AmpliFire™. Todo el proceso de detección de la bacteria se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se procesaron en grupos de ocho simultáneamente. Se colocó 500 µL de solución amortiguadora de extracción MB5 en microtubos plásticos de 1.5 mL debidamente identificados con el código de cada muestra. Seguido, utilizando una herramienta perforadora de Harris limpia, se cortaron discos del peciolo de cuatro hojas por muestra y se colocaron en los tubos con solución amortiguadora MB5. El contenido de los tubos se mezcló por inversión diez veces. Seguido, los tubos se colocaron en bloque previamente calentado a 95 °C, durante cinco minutos. Los tubos se retiraron del bloque caliente y se agregó la solución amortiguadora D1 hasta completar un volumen total en los tubos de 1 mL e inmediatamente el contenido de éstos se mezcló por inversión diez veces. De cada tubo con las muestras procesadas se tomó un volumen de 10 µL que se agregó a cada uno de los ocho microtubos verdes dispuestos en tiras (incluidos en el “kit”), y el contenido se mezcló delicadamente. Luego se tomó 50 µL de la mezcla de cada microtubo verde y se agregó a la tira de microtubos transparentes con contenido en polvo color blanco (incluidos en el “kit”) y se mezcló por agitación manual. Seguido, estos microtubos transparentes se colocaron en el instrumento lector AmpliFire® para la amplificación y obtención de resultados.

3.6.2. Clonaje de genes utilizados como marcadores moleculares en experimentos de PCR cuantitativo (qPCR)

Para la obtención de los dos amplicones a clonar y posteriormente usar para cuantificación de ‘*Ca. L. asiaticus*’ se realizaron dos experimentos independientes de PCR convencional con ADN de hojas de *C. reticulata* infectadas con ‘*Ca. L. asiaticus*’ provenientes del experimento realizado en TARS-Isabela. Con el par de iniciadores LJ900fr (forward: GCCGTTTTAACACAAAAGATGAATATC; reverse: ATAAATCAATTTGTTCTAGTTTACGAC) propuestos por (Morgan et al., 2012), que amplifican un fragmento de 100 bp se obtuvo un producto de amplificación de 200 bp correspondiente a repeticiones intragénicas en tándem, presentes en los genes profagos *hyvI* y *hyvII* de ‘*Ca. L. asiaticus*’. Con el par de iniciadores OI/OI2c descritos previamente se obtuvieron clones con un inserto de 1,160 bp. La mezcla maestra PCR estuvo compuesta por 12.5 µL de GoTaq® Master Mix, 2.5 µL de agua molecular y 2.5 µL de los iniciadores a una

concentración de 5 μ M. El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización de 95 °C por tres minutos, y 40 ciclos de 95 °C por tres segundos y 62 °C por 30 segundos. En el segundo PCR convencional, se utilizaron los iniciadores OI1/OI2c detallados anteriormente y se realizó bajo las mismas condiciones de amplificación descritas para estos iniciadores. Los productos PCR se migraron en gel de agarosa al 1% para corroborar la amplificación y fueron ligados al vector PCR TOPO 4 e introducido a células químicamente competentes de *E. coli* mediante choque termal utilizando el TOPO® TA Cloning® Kit según se indica más adelante. El plásmido recombinante se utilizó en la generación de una curva estándar en la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ mediante la química de SYBR® Green con los iniciadores LJ900fr. Este experimento de qPCR permitió la detección de muestras positivas de los genotipos de *C. xsinensis* de Adjuntas y la determinación del valor del ciclo de cuantificación de la carga de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en muestras de *C. xlatifolia* en la EEA Isabela. Se realizó un segundo clonaje para disponer de un control positivo para uso en experimentos qPCR con la química TaqMan. Se obtuvieron clones con un inserto de 1,160 bp (amplicón obtenido con los iniciadores OI/OI2c) correspondiente a la región 16S rADN. Mediante este qPCR se determinó el título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los genotipos de *C. xsinensis*. En los dos clonajes se siguió la misma metodología.

Clonación de amplicón de ‘*Ca. L. asiaticus*’

Las reacciones de PCR para cada marcador genético usado en la cuantificación de ‘*Ca. L. asiaticus*’ fueron realizadas en réplicas y sus respectivos productos fueron combinados, concentrados y purificados de manera independiente utilizando el kit de purificación QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Los amplicones purificados se cuantificaron mediante densidad óptica a 260 nm con un NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer). Se utilizó el “kit” TOPO TA Cloning Kit para ligar los amplicones al vector pCR® 4-TOPO®. Según descrito a continuación. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando 15 y 14 ng de producto de PCR (inserto), respectivamente (OI1/OI2c y LJ900fr), 1 μ L de solución salina, 3 μ L de agua y 1 μ L del plásmido vector, completando un volumen final de 6 μ L. Esta mezcla se dejó en incubación a temperatura ambiente por una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción de ligación completa (6 μ L) se agregó a un tubo con las células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes que se incubó en hielo durante una hora. Seguido, las células

mezcladas con el plásmido recombinante fueron sometidas a un choque termal para insertarles el plásmido el cual consistió en transferirlas del hielo a un baño de agua calibrado a 42 °C, durante 30 segundos e inmediatamente se transfirieron a hielo nuevamente. Luego del choque termal se agregaron 250 µL de medio SOC a los tubos y estos fueron incubados horizontalmente en una agitadora a 200 rpm (temperatura ambiente) durante una hora. Transcurrido este tiempo las células transformadas fueron recuperadas por dispersión en platos Petri con medio de cultivo LB agar suplementado con 50 µg/mL de kanamicina previamente equilibrados (2 horas) a 37 °C con 24 horas de anticipación. Toda la reacción de transformación fue vertida en alícuotas de 70 µL por plato Petri y dispersada con una espátula de vidrio. Seguido, los platos se colocaron en incubadora a 37 °C durante 24 horas. Luego se seleccionaron 16 y diez colonias individuales (16 clones con inserto 16S rADN y 10 clones con inserto *hyvI/hyvII*), y se transfirieron a nuevos platos Petri con LB + kanamicina (50 µg/mL). Los clones transferidos se cultivaron en LB líquido (7 mL/tubo) durante 24 horas a 200 rpm y se purificó el ADN del plásmido recombinante. Se realizó verificación de la presencia del inserto ligado en los dos grupos de clones mediante PCR convencional utilizando los iniciadores T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') y T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') los cuales flanquean el lugar de clonaje del vector. El programa de amplificación fue de 94 °C por dos minutos, 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 46 °C por un minuto, 72 °C por 2 minutos y 30 segundos, y una extensión final de 72 °C por siete minutos. Los productos amplificados se migraron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

3.6.3. Generación de curva estándar en qPCR mediante química de SYBR® Green

Para establecer la calidad y precisión de los experimentos de qPCR en la determinación de muestras positivas de '*Ca. L. asiaticus*', se generó una curva estándar utilizando ocho concentraciones conocidas y seriadas del ADN plasmidial de uno de los clones obtenidos con presencia de inserto de 200 bp (LJ900fr, genes profagos). Las concentraciones se establecieron en número de copias. Para establecer este número, se calculó el número de pares de bases del plásmido (incluido el tamaño del inserto ligado) y su masa molecular. Se multiplicó el número de pares de bases por la masa molecular promedio de un par de bases de ADN de doble cadena que

es de 660 Dalton. Se establecieron entre seis y ocho diluciones seriadas del estándar, siendo las concentraciones de entre 1×10^8 y 10 copias.

3.6.4. Determinación de muestras de *C. ×sinensis* positivas para ‘*Ca. L. asiaticus*’

Para determinar las muestras positivas para ‘*Ca. L. asiaticus*’ se utilizó la química SYBR® Green I con el par de iniciadores LJ900fr descritos previamente (Morgan et al., 2012). La mezcla de reacción para qPCR consistió de un volumen total de 20 μ L y estuvo compuesta por 200 nM de cada iniciador, 7.2 μ L de agua grado molecular y 10 μ L de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, Applied Biosystems (Thermo Fisher). La mezcla maestra se dispensó en microplacas qPCR, donde a cada muestra se evaluó por duplicado (dos pocillos de la placa) y se agregó 25 ng de ADN total por reacción (obtenido de 200 mg de nervaduras centrales). La placa se selló con una lámina de plástico óptico transparente. La amplificación se efectuó en el instrumento Eco Real-Time PCR System Illumina utilizando el Software EcoStudy Illumina. En el programa de amplificación el ciclo de activación de la polimerasa fue de 3 minutos a 95 °C, con 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y un minuto a 60 °C.

Se consideró el valor del ciclo de cuantificación (cycle quantification), el cual es el número de ciclo del PCR en el cual la señal fluorescente de la muestra cruza el umbral de detección [Cycle Threshold (Ct)]; es decir, el cq representa del ciclo en el ocurre intersección con la línea Ct. El análisis de los datos para obtención de la curva estándar, el valor R_2 (exactitud del experimento), el porcentaje de eficiencia y los valores Ct explicados arriba, se obtuvieron mediante el software mencionado. Los valores Ct se sometieron a análisis de varianza utilizando el programa estadístico Infostat y la comparación de medias se efectuó con la prueba LSD de Fisher al 5 % de probabilidad.

3.6.5. Determinación del título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en muestras de *C. ×sinensis*

3.6.5.1. PCR cuantitativo con la química TaqMan

Para la cuantificación del título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ se realizó un PCR cuantitativo con la química TaqMan utilizando el par de iniciadores HLBaspr propuestos por Li et al. (2006); Li et al. (2008) [(forward: TCGAGCGCGTATGCAATACG) (reverse: GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG) (probe: AGACGGGTGAGTAACGCG)]. La mezcla maestra estuvo compuesta por 10 µL de PrimeTime Gene Expression Master mix (Integrated DNA Technologies), el cual contiene *Taq* DNA polimerasa, dNTPs y MgCl₂. La concentración de iniciadores HLBas y HLBp fue de 250 nM, y del iniciador HLBp fue de 150 nM. La concentración de ADN total de cada muestra fue de 25 ng (obtenido de 200 mg de nervaduras centrales), con un volumen total de reacción de 20 µL. En el programa de amplificación el ciclo de activación de polimerasa fue de 3 minutos a 95 °C, con 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y un minuto a 60 °C. Cada muestra se analizó por duplicado en la microplaca qPCR. Se utilizó como control positivo uno de los clones obtenidos, los cuales contenían un fragmento de 1,160 pares de bases correspondiente al gen 16S del rDNA de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

3.6.5.2. Cálculo del número de genomas de ‘*Ca. L. asiaticus*’ por gramo de tejido

Para obtener el número de copias del gen 16S rADN por cada muestra sometida a PCR cuantitativo, se utilizaron los valores del ciclo de cuantificación, los cuales se introdujeron en la ecuación de regresión denominada *Grand Universal equation* $Y=13.82-0.2866X$, propuesta por Li et al. (2008), en donde Y= concentración log y X= el valor Ct obtenido en el experimento de PCR cuantitativo. Una vez se calculó la concentración log se realizó el cálculo del número de copias del gen. Para obtener el número de células por gramo de tejido fresco se consideró el volumen de ADN extraído requerido por cada muestra para obtener los 25 nanogramos que se utilizaron en el PCR cuantitativo. Además, se consideró que el volumen total de ADN obtenido a partir de 200 mg de tejido por muestra fue de 100 µL. Una vez calculado el número de copias en 100 µL de ADN, el valor se multiplicó por cinco, para obtener el número de copias por gramo y finalmente, este valor se dividió para tres ya que el genoma de ‘*Ca. L. asiaticus*’ posee tres copias del gen 16S rDNA. Esta fórmula ha sido utilizada por varios grupos de investigadores para determinar el título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ [Yang et al. (2016), Kunta et al. (2014), Zhou et al. (2011), Li et al. (2009)].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela

4.1.1. Detección de la presencia de ‘*Ca. L. asiaticus*’

A los 14 meses del trasplante, se analizaron 96 muestras correspondientes a las parcelas del experimento; cada muestra estuvo compuesta por hojas de los tres árboles de la parcela. Los síntomas observados fueron amarillamiento de hojas (Figura 1) y engrosamiento de nervaduras.



Figura 1. Árbol con síntomas de amarillamiento foliar por HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

En los resultados de los análisis se detectaron doce parcelas con presencia de árboles infectados por ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Apéndice 4). Al analizar los árboles individuales de estas parcelas, se detectó ‘*Ca. L. asiaticus*’ únicamente en once árboles (Figura 2) de un total de 288 árboles experimentales, número que corresponde a un 3.82% del total. Los resultados indican que el porcentaje de árboles sintomáticos, con título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ a niveles detectables mediante PCR convencional y amplificación isotérmica DNable fue bajo lo que sugiere que las plantas estuvieron sanas al momento del trasplante. Adicionalmente, la distribución desuniforme de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en las diferentes partes del árbol, puede resultar en falsos negativos.

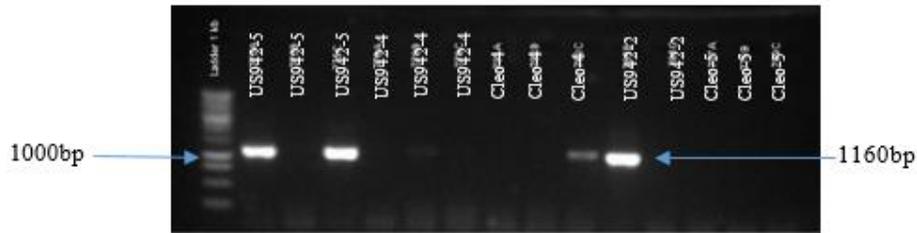


Figura 2. Amplificación de ADN genómico de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, de muestras foliares del experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela. PCR con el par de iniciadores OI1/OI2c. Productos migrados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Presencia de bandas de 1,160 pares de bases. A la izquierda, marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

4.1.2. Incidencia de HLB

A los 15 meses del trasplante (noviembre 7 de 2016), con base a observación de síntomas, la incidencia promedio de HLB en el experimento fue del 30.21%. Los síntomas fueron principalmente: moteado asimétrico entre las dos mitades de las hojas, engrosamiento de la nervadura central, hojas pequeñas, alargadas y en posición vertical, síntomas de deficiencia nutricional, similares a zinc, manganeso, calcio, boro y magnesio (Figura 3).

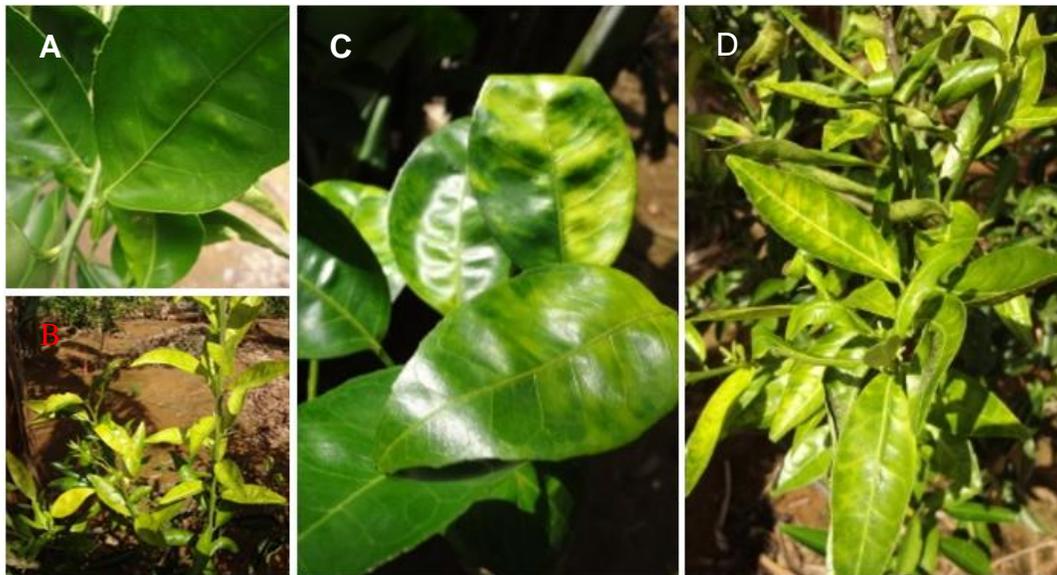


Figura 3. Síntomas de HLB observados en los árboles de *C. reticulata* en experimento en el USDA/TARS, Isabela a los 15 meses del trasplante. A= engrosamiento de nervaduras centrales; B= amarillamiento y alargamiento de hojas; C= moteado asimétrico de hojas; D= síntomas similares a deficiencia nutricional.

La incidencia más alta se determinó en el bloque uno con un 52.78% de plantas sintomáticas, mientras que la menor incidencia se registró en el bloque tres con 18.06%. A los 19 meses del trasplante (marzo 3, 2017), la incidencia promedio fue del 24.31%. En esta evaluación la incidencia más alta se registró en el bloque uno con 33.33% y la menor en el bloque dos con 15.28%. En esta evaluación se observó amarillamiento de ramas jóvenes, apariencia de pérdida de vigor en los árboles sintomáticos (Figura 4).



Figura 4. Síntoma de amarillamiento generalizado y pérdida de vigor en árbol del experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

A los 22 meses del trasplante (junio 23, 2017), la incidencia de HLB en el experimento fue del 72.22%; en la que se registró mayor número de plantas en el bloque uno con 81.94% y la menor en el bloque dos con 61.11%. Luego, en la evaluación a los 31 meses del trasplante (marzo 20, 2018), la incidencia de HLB en el experimento fue del 97.56% y a los 35 meses (junio 11, 2018) fue del 100% de plantas afectadas (Figura 5), es decir, luego de casi tres años del trasplante. Los síntomas observados en este periodo incluyeron además necrosis de ramas (Figura 6). En una plantación joven Rouse et al. (2010) detectaron incremento en el porcentaje de árboles infectados por '*Ca. L asiaticus*' del 81 al 100% en un periodo de dos años, mientras que en el presente estudio la incidencia se incrementó del 72.22% al 100% en un periodo de un

año. Estos árboles pudieron haber sido infectados poco tiempo después de su trasplante al campo y no mostraron síntomas por tiempo superior a 14 meses, que fue cuando se empezaron a identificar árboles sintomáticos. Lo cual está relacionado a que el periodo de incubación de la bacteria es largo y, por lo tanto, puede tomar entre varios meses y 2 a 3 años hasta que se muestren los primeros síntomas desde la infección inicial (Lee et al., 2015; Bové, 2006).

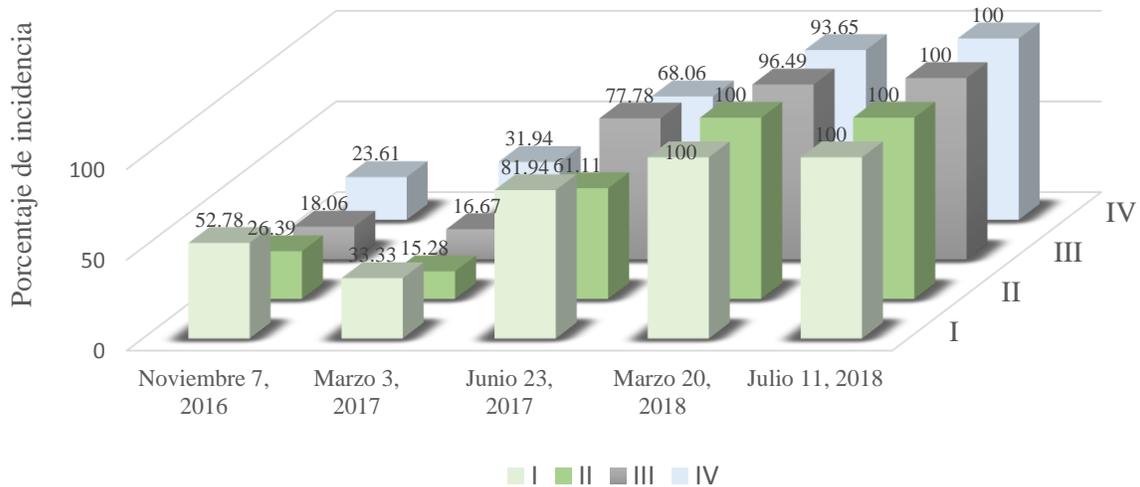


Figura 5. Incidencia de HLB por bloque (I-IV) en cinco fechas de evaluación de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.



Figura 6. Necrosis en ramas terminales de árboles con síntomas de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

4.1.3. Severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela

4.1.3.1. Progreso de la severidad de HLB

En el momento del trasplante en campo, las plantas se encontraban libres de HLB ya que provinieron de plantas sanas mantenidas en un vivero con malla contra insectos. Los patrones fueron originados desde semilla sexual y se realizó el injerto con yemas de plantas certificadas como libres de HLB (comunicación personal del Dr. Ricardo Goenaga). Las evaluaciones de severidad de HLB en el experimento se efectuaron a los 15, 19, 22, 31 y 35 meses después del trasplante. Esta severidad aumentó en el tiempo (Figura 7); en la primera evaluación a los 15 meses del trasplante (noviembre 7 de 2016) se determinó una severidad de HLB promedio de 1.41 según la escala utilizada. En las evaluaciones sucesivas siguientes, los valores fueron de 1.70, 2.75, 3.36 y 3.64. Es decir, que el incremento de severidad fue de 2.64 puntos en la escala en un periodo de 36 meses luego del trasplante en el campo.

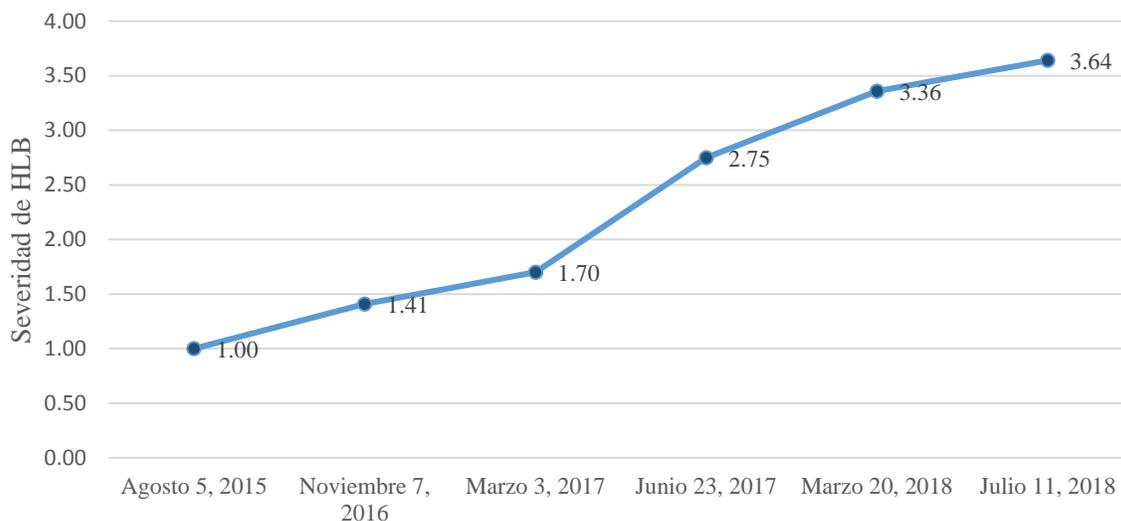


Figura 7. Progreso de la severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

4.1.3.2. Severidad de HLB por tratamientos

En el análisis estadístico de la primera evaluación a los 15 meses del trasplante (Cuadro 2) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (ocho genotipos injertados en tres patrones) (p -valor >0.05). En el análisis factorial no hubo efecto interacción, así

como tampoco efecto genotipo o efecto patrón significativos. Sin embargo, el menor valor promedio de severidad de 1.29 se registró en aquellos tratamientos en que los genotipos estuvieron injertados en el patrón ‘US-942’, seguido por los patrones ‘C-35 Citrange’ con 1.42 y mandarina ‘Cleopatra’, con 1.53. Los tratamientos con menor promedio de severidad se registraron en los tratamientos *US942-7*, *Cleo-3*, *US942-2*, *US942-3* y *US942-8*.

Cuadro 2. Promedios de la primera evaluación de severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela a los 15 meses del trasplante

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Bloques | | | | Promedio |
|------------|-----------------|----------------|---------|------|------|------|----------|
| | | | I | II | III | IV | |
| Genotipo 1 | | <i>C-35-1</i> | 1.33 | 1.67 | 1.67 | 1.00 | 1.42 |
| Genotipo 2 | | <i>C-35-2</i> | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.25 |
| Genotipo 3 | | <i>C-35-3</i> | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 1.67 | 1.42 |
| Genotipo 4 | ‘C-35 Citrange’ | <i>C-35-4</i> | 1.67 | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.25 |
| Genotipo 5 | | <i>C-35-5</i> | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 2.00 | 1.50 |
| Genotipo 6 | | <i>C-35-6</i> | 2.67 | 2.00 | 1.33 | 1.00 | 1.75 |
| Genotipo 7 | | <i>C-35-7</i> | 2.00 | 1.00 | 1.67 | 1.33 | 1.50 |
| Genotipo 8 | | <i>C-35-8</i> | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.25 |
| Genotipo 1 | | <i>Cleo-1</i> | 2.00 | 2.00 | 1.67 | 1.00 | 1.67 |
| Genotipo 2 | | <i>Cleo-2</i> | 2.00 | 1.00 | 1.33 | 1.00 | 1.33 |
| Genotipo 3 | | <i>Cleo-3</i> | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.33 | 1.08 |
| Genotipo 4 | ‘Cleopatra’ | <i>Cleo-4</i> | 2.00 | 2.33 | 1.33 | 2.67 | 2.08 |
| Genotipo 5 | | <i>Cleo-5</i> | 2.33 | 1.00 | 1.33 | 1.33 | 1.50 |
| Genotipo 6 | | <i>Cleo-6</i> | 1.67 | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.25 |
| Genotipo 7 | | <i>Cleo-7</i> | 2.00 | 2.33 | 1.00 | 1.67 | 1.75 |
| Genotipo 8 | | <i>Cleo-8</i> | 1.67 | 1.00 | 1.67 | 2.00 | 1.58 |
| Genotipo 1 | | <i>US942-7</i> | 1.67 | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.25 |
| Genotipo 2 | | <i>US942-2</i> | 1.67 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.17 |
| Genotipo 3 | | <i>US942-3</i> | 1.33 | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.17 |
| Genotipo 4 | ‘US-942’ | <i>US942-4</i> | 3.00 | 1.00 | 1.00 | 2.00 | 1.75 |
| Genotipo 5 | | <i>US942-5</i> | 2.67 | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.50 |
| Genotipo 6 | | <i>US942-6</i> | 1.33 | 1.00 | 1.67 | 1.33 | 1.33 |
| Genotipo 7 | | <i>US942-7</i> | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Genotipo 8 | | <i>US942-8</i> | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.33 | 1.17 |

En la segunda evaluación de severidad de HLB (Cuadro 3) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (p -valor>0.05). El análisis factorial no mostró efecto interacción, así como tampoco efecto genotipo o patrón. Los menores valores promedio se

registraron en los tratamientos *C-35-4* y *US942-7* con promedios de 1.08 y 1.17, respectivamente. Seguidos por los tratamientos *Cleo-1*, *Cleo-2* y *Cleo-3*, con un promedio de 1.33 en cada caso.

Cuadro 3. Promedios de la segunda evaluación de severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela a los 19 meses del trasplante.

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Bloques | | | | Promedio |
|------------|--------------------|----------------|---------|------|------|------|----------|
| | | | I | II | III | IV | |
| Genotipo 1 | | <i>C-35-1</i> | 1.00 | 1.00 | 3.00 | 1.00 | 1.50 |
| Genotipo 2 | | <i>C-35-2</i> | 3.33 | 1.00 | 1.00 | 3.00 | 2.08 |
| Genotipo 3 | | <i>C-35-3</i> | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 3.33 | 1.58 |
| Genotipo 4 | 'C-35 Citrange' | <i>C-35-4</i> | 1.00 | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 1.08 |
| Genotipo 5 | | <i>C-35-5</i> | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 4.00 | 2.00 |
| Genotipo 6 | | <i>C-35-6</i> | 4.00 | 1.00 | 2.33 | 1.00 | 2.08 |
| Genotipo 7 | | <i>C-35-7</i> | 2.00 | 1.00 | 2.33 | 1.33 | 1.67 |
| Genotipo 8 | | <i>C-35-8</i> | 3.67 | 1.67 | 1.00 | 1.00 | 1.83 |
| Genotipo 1 | | <i>Cleo-1</i> | 2.33 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.33 |
| Genotipo 2 | | <i>Cleo-2</i> | 2.00 | 1.00 | 1.33 | 1.00 | 1.33 |
| Genotipo 3 | | <i>Cleo-3</i> | 1.00 | 1.00 | 2.33 | 1.00 | 1.33 |
| Genotipo 4 | 'Cleopatra' | <i>Cleo-4</i> | 3.00 | 2.33 | 1.67 | 2.67 | 2.42 |
| Genotipo 5 | | <i>Cleo-5</i> | 1.67 | 1.00 | 2.33 | 2.67 | 1.92 |
| Genotipo 6 | | <i>Cleo-6</i> | 1.00 | 2.00 | 1.33 | 1.33 | 1.42 |
| Genotipo 7 | | <i>Cleo-7</i> | 2.00 | 2.33 | 1.00 | 3.33 | 2.17 |
| Genotipo 8 | | <i>Cleo-8</i> | 3.00 | 1.33 | 2.33 | 3.67 | 2.58 |
| Genotipo 1 | | <i>US942-1</i> | 2.67 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.42 |
| Genotipo 2 | | <i>US942-2</i> | 2.67 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.42 |
| Genotipo 3 | | <i>US942-3</i> | 1.00 | 3.00 | 1.00 | 1.00 | 1.50 |
| Genotipo 4 | 'US-942' | <i>US942-4</i> | 3.67 | 1.00 | 1.00 | 3.67 | 2.33 |
| Genotipo 5 | | <i>US942-5</i> | 3.33 | 1.67 | 1.00 | 1.33 | 1.83 |
| Genotipo 6 | | <i>US942-6</i> | 1.33 | 1.00 | 1.00 | 2.33 | 1.42 |
| Genotipo 7 | | <i>US942-7</i> | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.67 | 1.17 |
| Genotipo 8 | | <i>US942-8</i> | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 2.67 | 1.42 |

En la tercera evaluación (Cuadro 4) se determinó diferencia estadística significativa en los datos (p -valor <0.05). Los tratamientos con los menores valores de severidad fueron: *US942-8*, *Cleo-2*, *US942-1*, *US942-7* y *Cleo-1*, con promedios de 1.75, 1.92, 2.0, 2.08 y 2.08. Estos tratamientos corresponden a plantas injertadas en el patrón 'US-942' y 'Cleopatra', indicando

que en esta evaluación se destacan el genotipo 1, 2, 7 y 8. Estos tratamientos no fueron estadísticamente diferentes entre sí; mientras que los ocho tratamientos con los promedios más altos de severidad resultaron: *Cleo-4*, *C-35-5*, *C-35-6*, *US942-4*, *Cleo-5*, *C-35-7*, *Cleo-7*, *US-942-5*. El tratamiento *US942-8* fue diferente de los ocho tratamientos con mayor severidad; *Cleo-2* fue diferente de seis de éstos; *US942-1* fue diferente de cinco y los tratamientos *US942-7* y *Cleo-1* fueron estadísticamente diferentes de los cuatro tratamientos con mayor severidad.

Cuadro 4. Promedios de la tercera evaluación de severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela a los 22 meses del trasplante.

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Bloques | | | | Promedio* | |
|------------|-----------------|----------------|---------|------|------|------|-----------|---------|
| | | | I | II | III | IV | | |
| Genotipo 1 | | <i>C-35-1</i> | 1.67 | 2.67 | 3.33 | 1.00 | 2.17 | abcd |
| Genotipo 2 | | <i>C-35-2</i> | 3.00 | 1.33 | 1.33 | 3.33 | 2.25 | abcde |
| Genotipo 3 | | <i>C-35-3</i> | 2.67 | 2.00 | 1.33 | 5.00 | 2.75 | abcdefg |
| Genotipo 4 | 'C-35 Citrange' | <i>C-35-4</i> | 3.00 | 2.67 | 4.00 | 2.00 | 2.92 | abcdefg |
| Genotipo 5 | | <i>C-35-5</i> | 4.00 | 3.33 | 3.67 | 4.67 | 3.92 | fg |
| Genotipo 6 | | <i>C-35-6</i> | 4.67 | 3.67 | 5.00 | 2.33 | 3.92 | fg |
| Genotipo 7 | | <i>C-35-7</i> | 4.33 | 1.67 | 4.00 | 3.33 | 3.33 | cdefg |
| Genotipo 8 | | <i>C-35-8</i> | 3.67 | 2.33 | 2.67 | 1.33 | 2.50 | abcde |
| Genotipo 1 | | <i>Cleo-1</i> | 3.67 | 1.33 | 1.67 | 1.67 | 2.08 | abcd |
| Genotipo 2 | | <i>Cleo-2</i> | 3.00 | 1.00 | 1.33 | 2.33 | 1.92 | ab |
| Genotipo 3 | | <i>Cleo-3</i> | 2.33 | 1.67 | 4.67 | 1.67 | 2.58 | abcdef |
| Genotipo 4 | 'Cleopatra' | <i>Cleo-4</i> | 5.33 | 2.67 | 3.67 | 4.67 | 4.08 | g |
| Genotipo 5 | | <i>Cleo-5</i> | 4.33 | 1.67 | 3.67 | 4.00 | 3.42 | defg |
| Genotipo 6 | | <i>Cleo-6</i> | 2.33 | 4.33 | 2.67 | 3.00 | 3.08 | abcdefg |
| Genotipo 7 | | <i>Cleo-7</i> | 2.67 | 4.33 | 3.00 | 3.00 | 3.25 | bcdefg |
| Genotipo 8 | | <i>Cleo-8</i> | 2.00 | 1.33 | 3.00 | 2.67 | 2.25 | abcde |
| Genotipo 1 | | <i>US942-1</i> | 3.00 | 1.33 | 2.00 | 1.67 | 2.00 | abc |
| Genotipo 2 | | <i>US942-2</i> | 3.00 | 1.33 | 2.67 | 2.33 | 2.33 | abcde |
| Genotipo 3 | | <i>US942-3</i> | 1.67 | 3.67 | 2.00 | 1.33 | 2.17 | abcd |
| Genotipo 4 | 'US-942' | <i>US942-4</i> | 4.67 | 2.67 | 2.67 | 4.33 | 3.58 | efg |
| Genotipo 5 | | <i>US942-5</i> | 5.00 | 3.00 | 2.00 | 2.67 | 3.17 | bcdefg |
| Genotipo 6 | | <i>US942-6</i> | 1.67 | 1.67 | 3.00 | 3.67 | 2.50 | abcde |
| Genotipo 7 | | <i>US942-7</i> | 1.33 | 2.67 | 1.33 | 3.00 | 2.08 | abcd |
| Genotipo 8 | | <i>US942-8</i> | 2.00 | 1.00 | 1.33 | 2.67 | 1.75 | a |

*Tratamientos con una o más letras en común no difieren estadísticamente entre sí.

En el análisis factorial no hubo efecto interacción y efecto patrón con significancia estadística. Sin embargo, se encontró efecto genotipo (p -valor <0.05) (Figura 8). Según este análisis los genotipos 1, 2, 3 y 8 no fueron diferentes entre sí, con valores de severidad de HLB de entre 2.08 y 2.50. El genotipo 3 no fue diferente de los genotipos 6 y 7 con valores de 3.17 y 2.89, respectivamente.

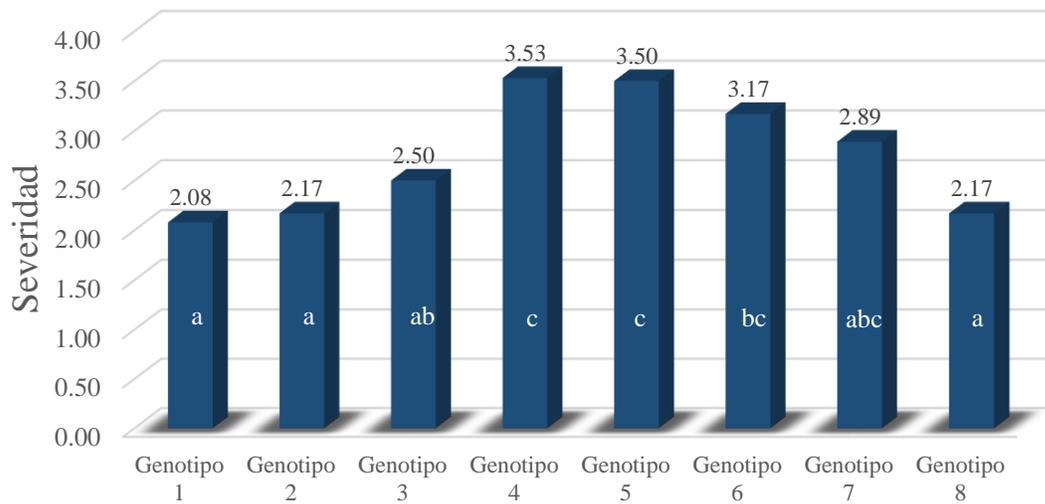


Figura 8. Promedios de severidad de HLB en ocho genotipos de *C. reticulata* (factor genotipo), en la tercera evaluación de experimento en el USDA/TARS, Isabela.

En los promedios del factor patrón en la tercera evaluación, el genotipo ‘US-942’ mostró la menor severidad con un valor 2.45 en la escala (Figura 9).

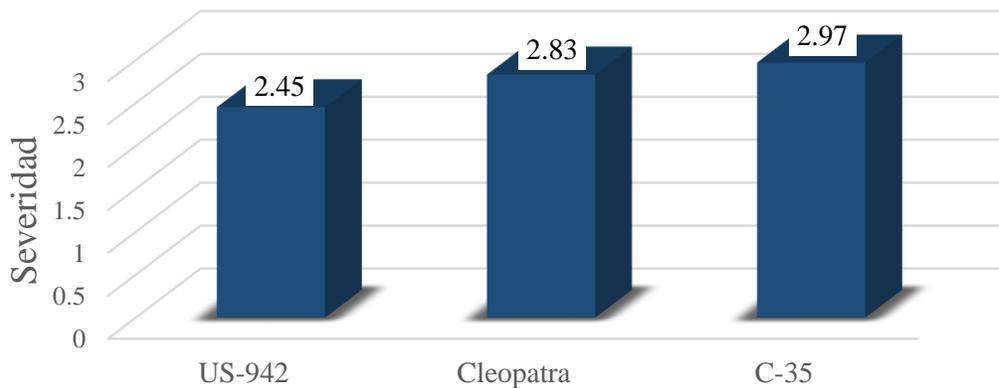


Figura 9. Promedios de severidad de HLB en patrones (factor patrón) en la tercera evaluación del experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

El análisis de los datos de la cuarta evaluación (Cuadro 5) mostró diferencias estadísticas significativas (p-valor <0.05). La menor severidad se determinó en los tratamientos *US942-2*, *Cleo-2*, *Cleo-6*, *US942-7* y *Cleo-8*, con valores de 2.00, 2.08, 2.25, 2.46 y 2.75, respectivamente, los cuales no difirieron entre sí estadísticamente. Los tratamientos *US942-2* y *Cleo-2* fueron diferentes de los 19 tratamientos con mayor severidad.

Cuadro 5. Promedios de la cuarta evaluación de severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela a los 31 meses del trasplante.

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Bloques | | | | Promedio* | |
|------------|--------------------|----------------|---------|------|------|------|-----------|-------|
| | | | I | II | III | IV | | |
| Genotipo 1 | | <i>C-35-1</i> | 3.00 | 4.00 | 3.50 | 2.67 | 3.29 | cdefg |
| Genotipo 2 | | <i>C-35-2</i> | 4.00 | 3.67 | 3.50 | 2.67 | 3.46 | defgh |
| Genotipo 3 | | <i>C-35-3</i> | 4.00 | 4.00 | 3.00 | 3.50 | 3.63 | efghi |
| Genotipo 4 | 'C-35 Citrange' | <i>C-35-4</i> | 4.67 | 5.50 | 4.00 | 4.33 | 4.63 | jk |
| Genotipo 5 | | <i>C-35-5</i> | 4.00 | 5.33 | 4.50 | 5.50 | 4.83 | k |
| Genotipo 6 | | <i>C-35-6</i> | 4.33 | 4.50 | 4.00 | 2.67 | 3.88 | ghij |
| Genotipo 7 | | <i>C-35-7</i> | 4.33 | 4.00 | 4.00 | 3.00 | 3.83 | fghij |
| Genotipo 8 | | <i>C-35-8</i> | 4.00 | 3.50 | 4.00 | 4.00 | 3.88 | ghij |
| Genotipo 1 | | <i>Cleo-1</i> | 3.50 | 3.00 | 3.00 | 2.33 | 2.96 | bcde |
| Genotipo 2 | | <i>Cleo-2</i> | 2.00 | 2.33 | 1.67 | 2.33 | 2.08 | a |
| Genotipo 3 | | <i>Cleo-3</i> | 3.67 | 3.00 | 3.00 | 2.33 | 3.00 | bcdef |
| Genotipo 4 | 'Cleopatra' | <i>Cleo-4</i> | 4.67 | 5.00 | 4.67 | 3.33 | 4.42 | ijk |
| Genotipo 5 | | <i>Cleo-5</i> | 5.00 | 5.00 | 4.17 | 2.50 | 4.17 | hijk |
| Genotipo 6 | | <i>Cleo-6</i> | 2.00 | 2.33 | 1.67 | 3.00 | 2.25 | ab |
| Genotipo 7 | | <i>Cleo-7</i> | 2.33 | 3.33 | 4.00 | 3.67 | 3.33 | defgh |
| Genotipo 8 | | <i>Cleo-8</i> | 3.00 | 3.00 | 3.33 | 1.67 | 2.75 | abcd |
| Genotipo 1 | | <i>US942-1</i> | 2.33 | 4.00 | 2.50 | 3.00 | 2.96 | bcde |
| Genotipo 2 | | <i>US942-2</i> | 2.67 | 2.00 | 2.00 | 1.33 | 2.00 | a |
| Genotipo 3 | | <i>US942-3</i> | 3.00 | 4.00 | 3.33 | 3.00 | 3.33 | defgh |
| Genotipo 4 | 'US-942' | <i>US942-4</i> | 3.00 | 4.00 | 4.67 | 3.00 | 3.67 | efghi |
| Genotipo 5 | | <i>US942-5</i> | 4.00 | 3.00 | 3.67 | 3.50 | 3.54 | defgh |
| Genotipo 6 | | <i>US942-6</i> | 3.33 | 3.67 | 2.50 | 2.33 | 2.96 | bcde |
| Genotipo 7 | | <i>US942-7</i> | 3.33 | 3.00 | 2.50 | 1.00 | 2.46 | abc |
| Genotipo 8 | | <i>US942-8</i> | 4.67 | 3.00 | 3.00 | 2.50 | 3.29 | cdefg |

*Tratamientos con una o más letras en común no difieren estadísticamente entre sí.

En el análisis factorial no se determinó efecto interacción significativa. Sin embargo, se encontró efecto genotipo y efecto patrón significativos (p-valor<0.05), donde el genotipo 2 tuvo

la menor severidad con 2.51 y fue estadísticamente diferente de los demás genotipos. Le siguieron los genotipos 6, 1, 7, 8 y 3 con valores de 3.03, 3.07, 3.21, 3.31 y 3.32, los que a su vez no fueron estadísticamente diferentes entre sí, pero sí fueron diferentes de los genotipos de mayor severidad 4 y 5, con valores de 4.18 y 4.24, respectivamente.

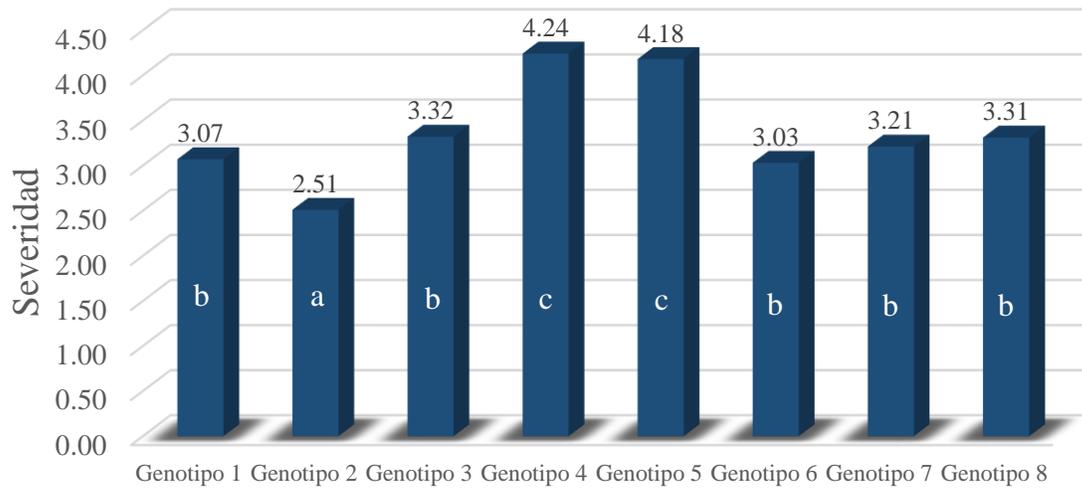


Figura 10. Promedios de severidad de HLB en ocho genotipos de *C. reticulata* (factor genotipo) en la cuarta evaluación del experimento en el USDA/TARS, Isabela.

Los promedios en el efecto patrón en la cuarta evaluación (Figura 11) los patrones ‘US-942’ y ‘Cleopatra’ no fueron estadísticamente diferentes entre sí, y tuvieron promedios de 3.03 y 3.12, respectivamente. El patrón ‘C-35 Citrange’ tuvo la severidad más alta con un promedio de 3.93.

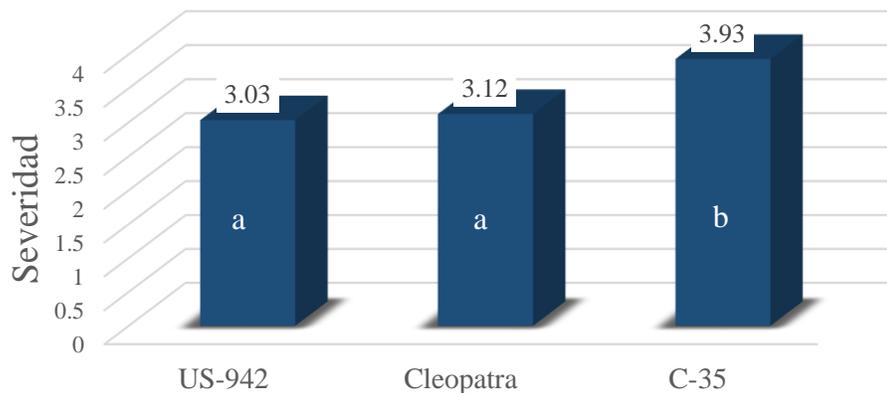


Figura 11. Promedios de severidad de HLB en patrones (factor patrón) en la cuarta evaluación del experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

En la quinta evaluación a los 35 meses del trasplante (julio 11, 2018), luego de cuatro meses de la anterior evaluación, se encontraron diferencias estadísticas significativas (p-valor <0.05) (Cuadro 6). En esta evaluación se destacaron las combinaciones de tratamientos con genotipos en los patrones ‘US 942’ y ‘Cleopatra’ como los de menor severidad. En cuatro tratamientos (*Cleo-6*, *US942-7*, *Cleo-2* y *US942-5*) se registraron promedios inferiores a 3 según la escala, mientras que 12 tratamientos tuvieron valores de entre 3.00 y 3.88. Es notable que los genotipos injertados sobre el patrón ‘C-35 Citrange’ presentaron alta severidad, este patrón ha sido utilizado desde 1987 por su tolerancia a *Citrus tristeza virus* y *Phytophthora*.

Cuadro 6. Promedios de la quinta evaluación de severidad de HLB en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela a los 35 meses del trasplante.

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Bloques | | | | Promedio* |
|------------|-----------------|----------------|---------|------|------|------|--------------|
| | | | I | II | III | IV | |
| Genotipo 1 | ‘C-35 Citrange’ | <i>C-35-1</i> | 3.33 | 5.00 | 4.50 | 4.00 | 4.21 fghij |
| Genotipo 2 | | <i>C-35-2</i> | 4.00 | 4.67 | 4.00 | 3.33 | 4.00 defghij |
| Genotipo 3 | | <i>C-35-3</i> | 4.00 | 4.00 | 3.67 | 3.50 | 3.79 cdefgh |
| Genotipo 4 | | <i>C-35-4</i> | 4.67 | 6.00 | 3.50 | 5.00 | 4.79 ij |
| Genotipo 5 | | <i>C-35-5</i> | 4.00 | 5.33 | 3.50 | 5.50 | 4.58 hij |
| Genotipo 6 | | <i>C-35-6</i> | 4.33 | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.08 efghij |
| Genotipo 7 | | <i>C-35-7</i> | 4.67 | 4.00 | 5.00 | 3.00 | 4.17 fghij |
| Genotipo 8 | | <i>C-35-8</i> | 4.00 | 3.50 | 4.00 | 4.00 | 3.88 cdefghi |
| Genotipo 1 | ‘Cleopatra’ | <i>Cleo-1</i> | 3.50 | 4.00 | 3.00 | 4.00 | 3.63 cdefg |
| Genotipo 2 | | <i>Cleo-2</i> | 2.00 | 2.67 | 2.33 | 3.33 | 2.58 ab |
| Genotipo 3 | | <i>Cleo-3</i> | 3.67 | 2.33 | 4.33 | 4.00 | 3.58 cdefg |
| Genotipo 4 | | <i>Cleo-4</i> | 4.67 | 5.67 | 4.67 | 4.67 | 4.92 j |
| Genotipo 5 | | <i>Cleo-5</i> | 4.33 | 4.00 | 3.78 | 3.00 | 3.78 cdefgh |
| Genotipo 6 | | <i>Cleo-6</i> | 2.00 | 2.00 | 2.67 | 3.33 | 2.50 a |
| Genotipo 7 | | <i>Cleo-7</i> | 2.33 | 3.33 | 4.00 | 4.33 | 3.50 bcdef |
| Genotipo 8 | | <i>Cleo-8</i> | 3.67 | 3.67 | 3.33 | 3.67 | 3.58 cdefg |
| Genotipo 1 | ‘US-942’ | <i>US942-1</i> | 2.00 | 4.00 | 2.50 | 3.67 | 3.04 abc |
| Genotipo 2 | | <i>US942-2</i> | 2.67 | 3.00 | 3.67 | 3.00 | 3.08 abcd |
| Genotipo 3 | | <i>US942-3</i> | 2.00 | 3.00 | 2.67 | 4.33 | 3.00 abc |
| Genotipo 4 | | <i>US942-4</i> | 3.00 | 4.50 | 5.00 | 5.33 | 4.46 ghij |
| Genotipo 5 | | <i>US942-5</i> | 2.00 | 3.33 | 3.00 | 3.50 | 2.96 abc |
| Genotipo 6 | | <i>US942-6</i> | 3.00 | 4.00 | 2.50 | 3.33 | 3.21 abcde |
| Genotipo 7 | | <i>US942-7</i> | 3.00 | 2.00 | 2.33 | 3.00 | 2.58 ab |
| Genotipo 8 | | <i>US942-8</i> | 4.00 | 3.67 | 3.00 | 3.00 | 3.42 abcdef |

*Tratamientos con una o más letras en común no difieren estadísticamente entre sí.

El análisis factorial, al igual que en las previas cuatro evaluaciones, no reveló efecto interacción genotipo x patrón significativa. Sin embargo, sí hubo efectos genotipo y patrón significativos (p -valor <0.05). En la comparación de medias (Figura 12) los genotipos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 no difirieron estadísticamente entre sí. Los valores estuvieron entre 3.22 y 3.63. El genotipo 2, con el menor promedio de severidad (3.22) fue diferente de los genotipos 4 y 5 con los valores más altos de esta evaluación (3.77 y 4.72, respectivamente). El genotipo 4 tuvo una severidad significativamente superior a la de los restantes tratamientos.

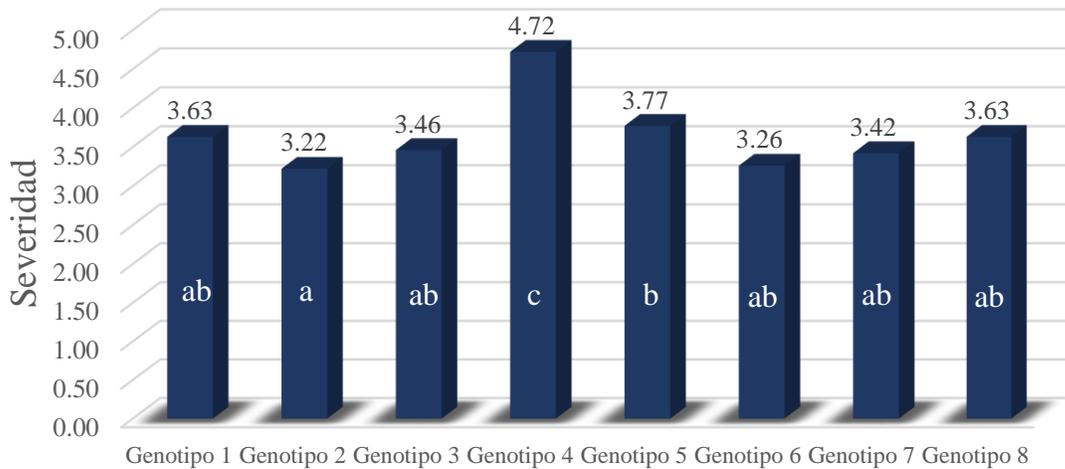


Figura 12. Promedios de severidad de HLB en ocho genotipos de *C. reticulata* (factor genotipo) en la quinta evaluación del experimento en el USDA/TARS, Isabela.

En la quinta evaluación a los 35 meses del trasplante, al igual que en la evaluación previa, la severidad de HLB en el efecto patrón, fue menor en los patrones ‘US-942’ y ‘Cleopatra’, promedios que no difirieron entre sí (3.22 y 3.51, respectivamente) (Figura 13).

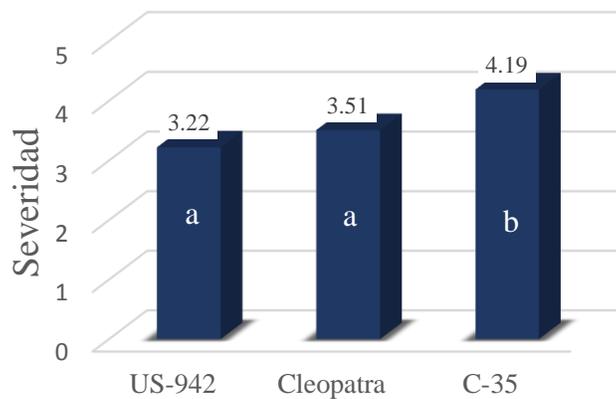


Figura 13. Promedios de severidad de HLB en patrones (factor patrón) en la quinta evaluación del experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

4.1.3.3. Análisis general en las cinco evaluaciones de severidad

En el Cuadro 7 siguiente se resaltan en color verde los seis tratamientos con menor promedio de severidad en cada evaluación. Se observa que los genotipos 1, 2 y 6 injertados en el patrón ‘Cleopatra’, así como los genotipos 1, 2, 3 y 7 injertados en el patrón ‘US-942’ destacan por su menor promedio de severidad de HLB.

Cuadro 7. Promedios de severidad de HLB de las cinco evaluaciones realizadas en experimento con ocho genotipos de *C. reticulata* injertados en tres patrones, en el USDA/TARS, Isabela.

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Meses después del trasplante | | | | |
|------------|---------------|--------------|------------------------------|------|------|------|------|
| | | | 15m | 19m | 22m | 31m | 35m |
| Genotipo | C-35 Citrange | C-35-1 | 1.33 | 1.50 | 2.17 | 3.29 | 4.21 |
| Genotipo 2 | | C-35-2 | 1.33 | 2.08 | 2.25 | 3.46 | 4.00 |
| Genotipo 3 | | C-35-3 | 1.56 | 1.58 | 2.75 | 3.63 | 3.79 |
| Genotipo 4 | | C-35-4 | 1.33 | 1.08 | 2.92 | 4.63 | 4.79 |
| Genotipo 5 | | C-35-5 | 1.67 | 2.00 | 3.92 | 4.83 | 4.58 |
| Genotipo 6 | | C-35-6 | 1.89 | 2.08 | 3.92 | 3.88 | 4.08 |
| Genotipo 7 | | C-35-7 | 1.44 | 1.67 | 3.33 | 3.83 | 4.17 |
| Genotipo 8 | | C-35-8 | 1.33 | 1.83 | 2.50 | 3.88 | 3.88 |
| Genotipo 1 | Cleopatra | Cleo-1 | 1.67 | 1.33 | 2.08 | 2.96 | 3.63 |
| Genotipo 2 | | Cleo-2 | 1.33 | 1.33 | 1.92 | 2.08 | 2.58 |
| Genotipo 3 | | Cleo-3 | 1.11 | 1.33 | 2.58 | 3.00 | 3.58 |
| Genotipo 4 | | Cleo-4 | 2.33 | 2.42 | 4.08 | 4.42 | 4.92 |
| Genotipo 5 | | Cleo-5 | 1.56 | 1.92 | 3.42 | 4.17 | 3.78 |
| Genotipo 6 | | Cleo-6 | 1.33 | 1.42 | 3.08 | 2.25 | 2.50 |
| Genotipo 7 | | Cleo-7 | 2.00 | 2.17 | 3.25 | 3.33 | 3.50 |
| Genotipo 8 | | Cleo-8 | 1.56 | 2.58 | 2.25 | 2.75 | 3.58 |
| Genotipo 1 | US-942 | US942-1 | 1.33 | 1.42 | 2.00 | 2.96 | 3.04 |
| Genotipo 2 | | US942-2 | 1.22 | 1.42 | 2.33 | 2.00 | 3.08 |
| Genotipo 3 | | US942-3 | 1.22 | 1.50 | 2.17 | 3.33 | 3.00 |
| Genotipo 4 | | US942-4 | 2.00 | 2.33 | 3.58 | 3.67 | 4.46 |
| Genotipo 5 | | US942-5 | 1.67 | 1.83 | 3.17 | 3.54 | 2.96 |
| Genotipo 6 | | US942-6 | 1.22 | 1.42 | 2.50 | 2.96 | 3.21 |
| Genotipo 7 | | US942-7 | 1.00 | 1.17 | 2.08 | 2.46 | 2.58 |
| Genotipo 8 | | US942-8 | 1.22 | 1.42 | 1.75 | 3.29 | 3.42 |

Los efectos principales en la evaluación a los 35 meses del trasplante (Apéndices 5 y 6) mostraron que en el caso de efectos genotipos: el genotipo 1 ejerció efecto de reducción de la severidad únicamente en los genotipos 4 y 5, con valores de -0.1 y -1.1, de acuerdo con la escala utilizada. El genotipo 2, afectó una reducción de hasta -1.5 en seis de los siete genotipos restantes, ejerciendo en promedio una reducción de -0.48. Los efectos simples se muestran en (Apéndices 7 y 8).

Al analizar el efecto del patrón en la severidad de HLB en los ocho genotipos, se determinó que el híbrido ‘US-942’ (*C. reticulata* × *P. trifoliata*) ejerció efecto en la menor severidad de HLB sobre los genotipos injertados. La influencia del patrón sobre la severidad de HLB ha sido estudiada y documentada en diversos estudios (Albrecht et al., 2012; Bowman y McCollum, 2015). Bowman et al. (2016b) reportaron el efecto de 17 patrones sobre el título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en naranja dulce, y señalaron al patrón ‘US-942’ como tolerante a HLB, al ser uno de los patrones en los que hubo menor severidad. La selección de variedades para el establecimiento de un huerto dependerá de la utilización de un patrón adecuado, condiciones apropiadas para su desarrollo, acompañadas de un buen manejo agronómico son determinantes para la producción de cítricos. En Puerto Rico se mantiene un programa de producción de cítricos donde se requiere la utilización de nuevos patrones que ofrezcan mayor tolerancia a HLB. Este estudio aporta con esta información en base al progreso de la enfermedad a través del tiempo. El patrón ‘US-942’ y la selección del genotipo apropiado es una alternativa sustentable para la producción de mandarinas en la isla.

4.1.4. Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC) en experimento de *C. reticulata*

4.1.4.1. AUDPC general en el experimento

En la Figura 14 el área bajo la curva de progreso de la enfermedad general del experimento muestran que desde la primera evaluación a los 15 meses del trasplante con un valor AUDPC de 554.30 hasta los 35 meses del trasplante con 2,263.91 hubo un incremento de 1,709.61 puntos.

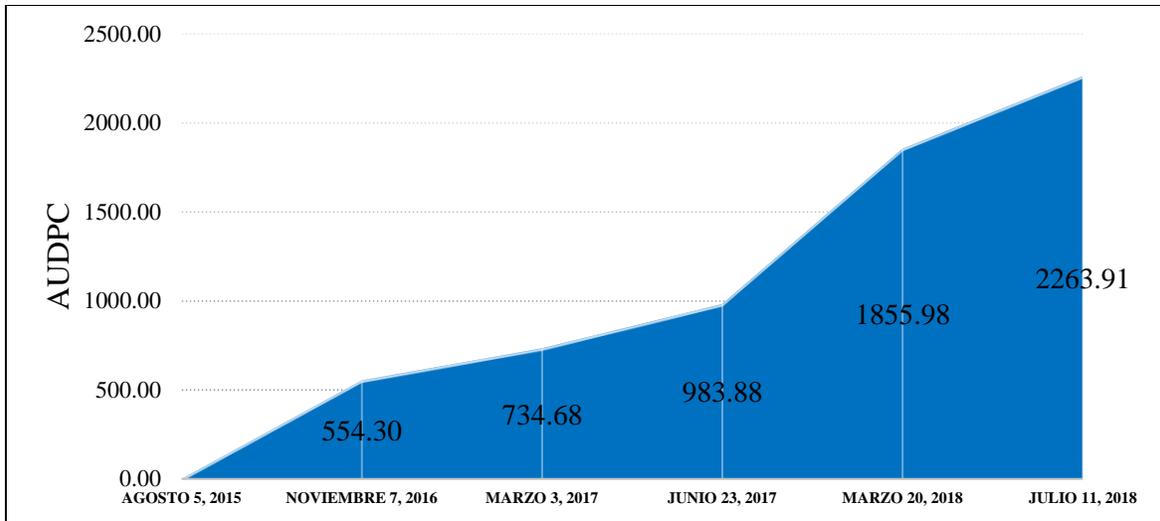


Figura 14. AUDPC de HLB general del experimento de *C. reticulata* en TARS, Isabela. La Curva inicia en la fecha de trasplante hasta la última evaluación a los 35 meses después del trasplante.

4.1.4.2. AUDPC por tratamiento

En todos los tratamientos hubo incremento de la enfermedad en el tiempo como se observa en la Figura 15, donde destaca el tratamiento 4.

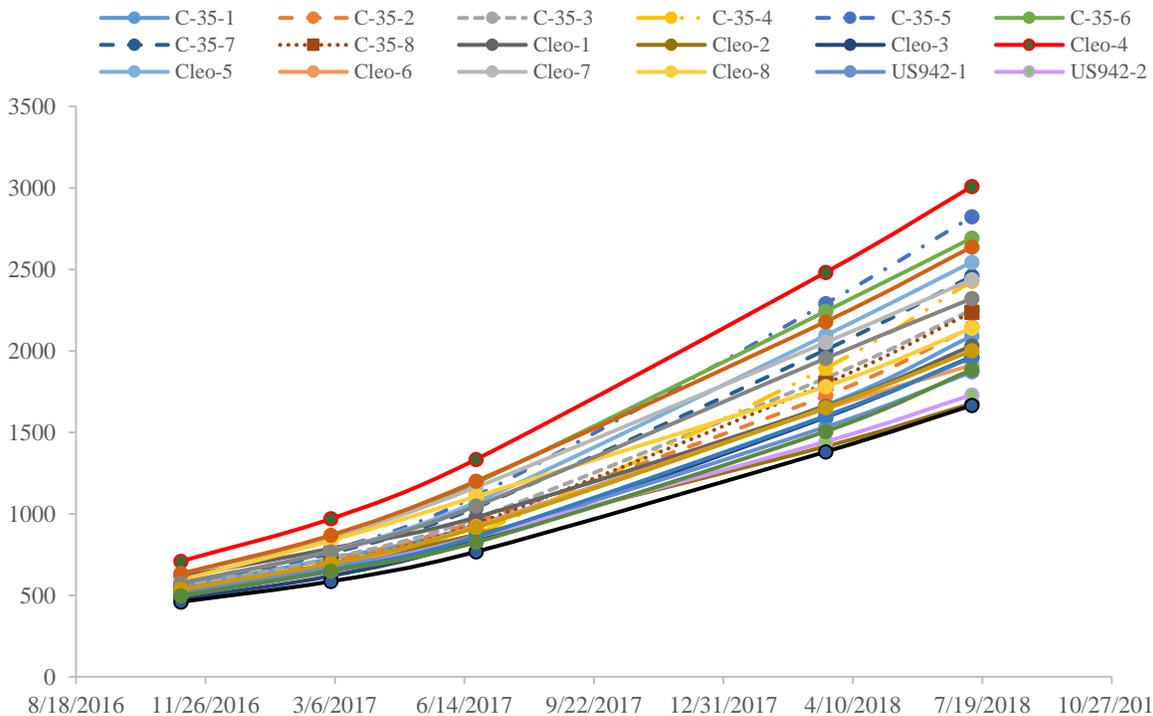


Figura 15. Curvas de incremento de valores AUDPC de HLB por tratamiento en el periodo de 20 meses de evaluaciones de severidad en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

En el análisis DBCA hubo diferencias estadísticas entre tratamientos (p -valor <0.05). En los 12 tratamientos con menor severidad (*US942-7*, *Cleo-2*, *US942-2*, *US942-1*, *US942-8*, *Cleo-6*, *US942-3*, *Cleo-3*, *US942-6*, *Cleo-1*, *C-35-1*, *Cleo-8*), los que corresponden a los genotipos 1, 2, 3, 6, 7, 8, no hubo diferencia estadística significativa entre sí (Cuadro 8). Los valores de acumulación de la enfermedad en el tiempo en estos tratamientos estuvieron entre 1,665.65 y 2,139.34. Once de estos tratamientos de menor severidad descritos, corresponden a los genotipos detallados, injertados en los patrones ‘US-942’ y ‘Cleopatra’, lo que señala que la acumulación de la enfermedad en estos dos patrones fue menor en seis de los ocho genotipos del experimento.

Cuadro 8. Valores AUDPC de HLB correspondientes a los 24 tratamientos y cuatro bloques de repeticiones del experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Genotipo | Patrón | Tratamientos | Bloques | | | | Promedio | |
|------------|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| | | | I | II | III | IV | | |
| Genotipo 1 | C-35 Citrange | C-35-1 | 1,809.17 | 2,381.83 | 2,613.17 | 1,559.67 | 2,090.96 | efghij |
| Genotipo 2 | | C-35-2 | 2,751.00 | 1,852.50 | 1,782.92 | 2,195.67 | 2,145.52 | defghij |
| Genotipo 3 | | C-35-3 | 2,421.33 | 2,006.00 | 1,668.33 | 2,913.00 | 2,252.17 | cdefghi |
| Genotipo 4 | | C-35-4 | 2,554.33 | 2,667.58 | 2,359.75 | 2,126.33 | 2,427.00 | bcdefg |
| Genotipo 5 | | C-35-5 | 2,790.00 | 2,591.33 | 2,391.83 | 3,517.33 | 2,822.63 | ab |
| Genotipo 6 | | C-35-6 | 3,420.00 | 2,708.08 | 2,827.00 | 1,814.33 | 2,692.35 | abc |
| Genotipo 7 | | C-35-7 | 2,955.17 | 1,942.33 | 2,788.50 | 2,146.67 | 2,458.17 | bcdef |
| Genotipo 8 | | C-35-8 | 2,916.33 | 2,021.67 | 2,133.33 | 1,878.67 | 2,237.50 | cdefghi |
| Genotipo 1 | Cleopatra | Cleo-1 | 2,640.33 | 1,975.17 | 1,886.33 | 1,623.17 | 2,031.25 | efghij |
| Genotipo 2 | | Cleo-2 | 2,103.00 | 1,420.50 | 1,471.67 | 1,712.83 | 1,677.00 | j |
| Genotipo 3 | | Cleo-3 | 1,987.00 | 1,656.67 | 2,494.67 | 1,719.17 | 1,964.38 | fghij |
| Genotipo 4 | | Cleo-4 | 3,324.00 | 2,955.00 | 2,661.67 | 3,095.33 | 3,009.00 | a |
| Genotipo 5 | | Cleo-5 | 3,122.00 | 2,133.83 | 2,592.46 | 2,330.25 | 2,544.64 | abcde |
| Genotipo 6 | | Cleo-6 | 1,765.67 | 2,229.50 | 1,649.17 | 2,005.83 | 1,912.54 | ghij |
| Genotipo 7 | | Cleo-7 | 2,122.00 | 2,822.33 | 2,197.00 | 2,610.00 | 2,437.83 | bcdefg |
| Genotipo 8 | | Cleo-8 | 2,215.67 | 1,706.33 | 2,375.67 | 2,259.67 | 2,139.33 | defghij |
| Genotipo 1 | US-942 | US942-1 | 2,146.83 | 1,974.67 | 1,634.00 | 1,732.00 | 1,871.88 | hij |
| Genotipo 2 | | US942-2 | 2,248.33 | 1,439.17 | 1,731.50 | 1,502.50 | 1,730.38 | ij |
| Genotipo 3 | | US942-3 | 1,733.83 | 2,591.83 | 1,803.00 | 1,706.00 | 1,958.67 | fghij |
| Genotipo 4 | | US942-4 | 3,147.33 | 2,161.58 | 2,317.50 | 2,927.50 | 2,638.48 | abcd |
| Genotipo 5 | | US942-5 | 3,212.00 | 2,139.83 | 1,885.67 | 2,047.33 | 2,321.21 | bcdefgh |
| Genotipo 6 | | US942-6 | 1,892.17 | 1,878.50 | 2,017.00 | 2,215.50 | 2,000.79 | fghij |
| Genotipo 7 | | US942-7 | 1,694.50 | 1,828.83 | 1,497.25 | 1,642.00 | 1,665.65 | j |
| Genotipo 8 | | US942-8 | 2,229.67 | 1,604.67 | 1,630.67 | 2,075.58 | 1,885.15 | hij |

Uno de los 12 tratamientos con menor severidad fue el *C-35-1* que corresponde al genotipo 1 injertado en el patrón ‘C-35 Citrange’, es decir que este genotipo tuvo baja severidad en los tres patrones evaluados. Mientras que el genotipo 2 injertado en los patrones ‘US-942’ y ‘Cleopatra’ presentó dos de los tres valores AUDPC más bajos del experimento (Figura 16). El genotipo 1 presentó baja severidad independientemente del patrón utilizado en el estudio.

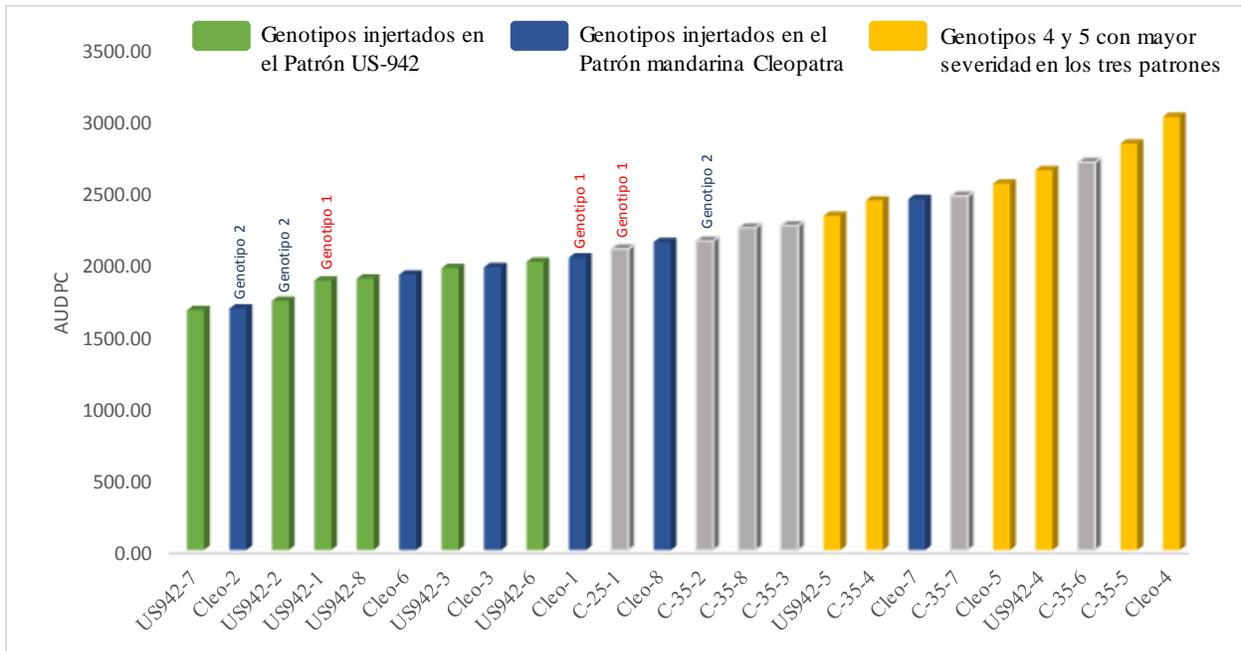


Figura 16. Valores promedio AUDPC de HLB por tratamiento en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela. Los tratamientos con los valores correspondientes están ordenados de forma ascendente de izquierda a derecha (ubicados a la izquierda los valores AUDPC más bajos).

En el análisis factorial no se encontró significancia estadística en la interacción genotipo x patrón en la variable AUDPC; sin embargo, se observó significancia en los factores genotipo y patrón (p -valor <0.05). El genotipo 2 con un valor de 1,850.97 fue el más bajo del experimento, aunque no se diferenció de los genotipos 1, 3 y 8. Por otro lado, el conjunto de genotipos 1, 3, 6, 7 y 8 no fueron diferentes entre sí, pero sí lo fueron de los genotipos 4 y 5 de más alto valor AUDPC. El patrón ‘US-942’ tuvo el valor AUDPC más bajo con 2,009.02.

Cuadro 9. Valores AUDPC de HLB de los factores genotipo y patrón en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Genotipo | Valor AUDPC | |
|-----------------|--------------------|----|
| Genotipo 1 | 1,998.03 | bc |
| Genotipo 2 | 1,850.97 | c |
| Genotipo 3 | 2,058.40 | bc |
| Genotipo 4 | 2,691.49 | a |
| Genotipo 5 | 2,562.82 | a |
| Genotipo 6 | 2,201.90 | b |
| Genotipo 7 | 2,187.22 | b |
| Genotipo 8 | 2,087.33 | bc |
| Patrón | Valor AUDPC | |
| ‘C-35 Citrange’ | 2,390.79 | a |
| ‘Cleopatra’ | 2,214.50 | a |
| ‘US-942’ | 2,009.02 | b |

La respuesta variable de genotipos de *Citrus* a la infección por ‘*Ca. L. asiaticus*’ se establece en diversos estudios en condiciones de invernadero y campo (Folimonova et al., 2009).

4.2. Experimento de *Citrus ×sinensis* en colección de cítricos de la EEA Adjuntas

4.2.1. Detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en genotipos de *C. sinensis*

De las hojas colectadas de 13 genotipos de la colección de *C. ×sinensis* en la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas, luego de la extracción de ADN total, mediante PCR convencional se detectaron árboles con infección por ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Cuadro 10).

Cuadro 10. Detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ mediante PCR convencional en genotipos de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas.

| Genotipo | Detección ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ | Genotipo | Detección ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ |
|---------------|---------------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| ‘Frontón’ | - | ‘Rico 2-376’ | ND |
| ‘Helada’ | - | ‘Rico 3-80’ | - |
| ‘Lares 82’ | + | ‘Rico 4-45’ | - |
| ‘Padilla’ | - | ‘Rico 5-50’ | - |
| ‘Pietri 3-34’ | - | ‘Rico 7-56’ | - |
| ‘Rico 1-28’ | + | ‘Salustiana’ | + |
| ‘Rico 1-374’ | - | | |

ND= no determinado; - = no detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’; + = detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’

Con los iniciadores OI1, OI2c, se amplificaron fragmentos de 1,160 bp (Figura 17). Estos iniciadores han sido utilizados ampliamente para la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en otros estudios (Deng et al., 2008; Li et al., 2008) y son considerados eficientes para la detección de esta bacteria (Fujikawa et al., 2013). En esta evaluación ‘*Ca. L. asiaticus*’ fue amplificado en 13 genotipos. Sin embargo, en cinco genotipos no hubo amplificación, debido a que el PCR convencional es menos sensitivo a la detección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ cuando el título de la bacteria es bajo (Li et al., 2008; Li et al., 2009), como se ha demostrado en estudios realizados por Li et al., 2007, donde demuestran que la sensibilidad en la detección se incrementa de entre 100 y 1,000 veces.

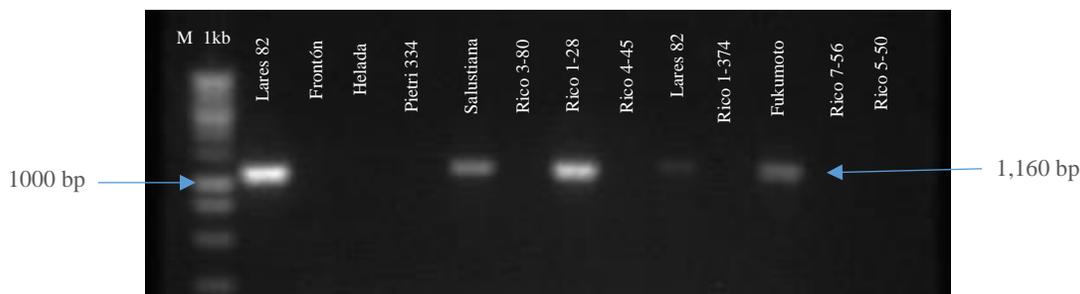


Figura 17. Amplificación de ADN genómico de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ correspondiente a muestras de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de Adjuntas. PCR realizado con el par de iniciadores OI1/OI2c, específico para la región 16S rDNA de ‘*Ca. L. asiaticus*’. Productos migrados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Presencia de bandas de 1,160 pares de bases. A la izquierda, marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

4.2.2. Evaluación de severidad de HLB en genotipos de *C. ×sinensis*

La severidad fue fluctuante en algunos árboles, y aumentó ligeramente o se mantuvo constante entre la primera y cuarta evaluación (Cuadro 11) (Figura 18). Las variaciones en los valores de severidad no sólo pueden ser explicadas por la influencia de condiciones ambientales y prácticas como fertilización que son realizadas en la colección de cítricos, sino por tipos de respuesta de genotipos de *Citrus* a la infección de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en algunos de los cuales se informa continuación de crecimiento y desarrollo de nuevos brotes a pesar de la infección por esta bacteria (Folimonova et al., 2009). La apariencia del árbol en cuanto mayor o menor apariencia saludable es influenciada por la estación del año tal como lo explica Slinski (2016).

Cuadro 11. Promedios de severidad de HLB en 13 genotipos de *C. xsinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas, en cuatro fechas de evaluación.

| Genotipos | Fecha de evaluaciones | | | |
|---------------|-----------------------|------------|-----------|------------|
| | Jul 28, 17 | Ago 30, 17 | Dic 4, 17 | Feb 23, 18 |
| ‘Rico 1-28’ | 4.00 | 4.20 | 3.60 | 4.40 |
| ‘Rico 1-374’ | 3.17 | 3.33 | 3.00 | 3.50 |
| ‘Rico 2-376’ | 3.50 | 3.50 | 4.00 | 3.75 |
| ‘Rico 3-80’ | 3.50 | 3.00 | 3.00 | 3.50 |
| ‘Rico 4-45’ | 4.00 | 3.67 | 4.00 | 4.33 |
| ‘Rico 5-50’ | 3.50 | 3.50 | 3.00 | 3.50 |
| ‘Rico 7-56’ | 3.50 | 4.50 | 3.00 | 3.67 |
| ‘Frontón’ | 3.75 | 4.00 | 4.00 | 5.25 |
| ‘Helada’ | 4.00 | 4.00 | 3.67 | 4.00 |
| ‘Lares 82’ | 3.33 | 3.50 | 3.17 | 3.67 |
| ‘Padilla’ | 3.50 | 3.75 | 3.50 | 4.00 |
| ‘Pietri 3-34’ | 3.00 | 3.20 | 3.20 | 4.20 |
| ‘Salustiana’ | 2.40 | 3.20 | 3.20 | 3.00 |

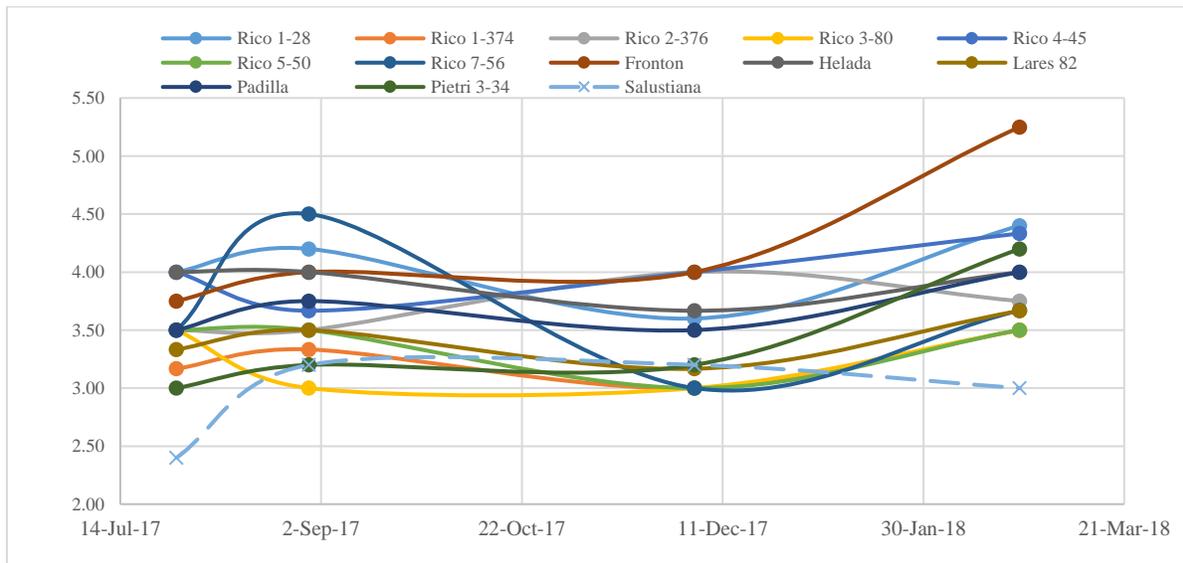


Figura 18. Fluctuación en el tiempo de la severidad de HLB en 13 genotipos de *C. xsinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas. Cuatro fechas de evaluación.

Se calculó el AUDPC de los 13 genotipos (Figura 19) y se encontraron los valores más bajos en los genotipos ‘Salustiana’, ‘Rico 3-80’, ‘Rico 1-374’ y ‘Rico 5-50’. Cabe mencionar

que estos valores se calcularon con base en el promedio de severidad registrado de 1 a 6 árboles por genotipo.

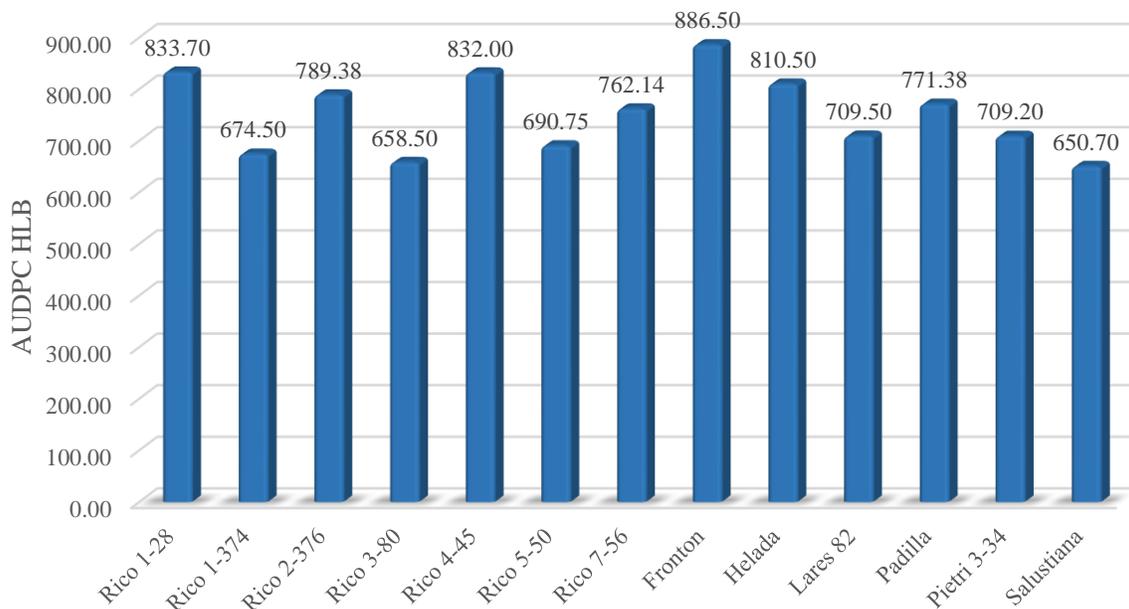


Figura 19. Valores AUDPC de HLB en los 13 genotipos de *C. x sinensis* evaluados en la colección de cítricos de la EEA Adjuntas. Cálculos realizados con valores de cuatro fechas de evaluación.

4.2.3. Obtención de clones para uso en PCRs cuantitativos

De los dos grupos de clones de ‘*Ca. L. asiaticus*’ obtenidos se realizó un PCR utilizando el par de iniciadores LJ900fr. para su uso como control positivo y la curva standard en el qPCR para identificar la presencia de ‘*Ca. L. asiaticus*’. Se obtuvieron nueve amplicones de 100 bp, de los que se utilizaron cinco en el clonaje (por la intensidad de las bandas). De los clones obtenidos (colonias desarrolladas en medio LB + kanamicina) se seleccionaron y conservaron individualmente 12 colonias. Se comprobó la presencia del inserto de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los clones mediante un PCR convencional con el par de iniciadores promotores T3/T7. Al visualizar el gel (Figura 20) se observó que el tamaño del inserto fue de 200 bp en 11 clones (clones 1 al 10 y clon 12); mientras que en el clon 11 fue de 300 bp, lo que indica que en el primer caso (200 bp) y en el segundo caso (300 bp), el número de repeticiones en tándem en los genes *hyvI/hyvII*, es de dos y tres, respectivamente. En 2011 Zhou y colaboradores, quienes identificaron estos dos genes en la región profago de más de 35 aislados de ‘*Ca. L. asiaticus*’ procedentes de todo el

mundo, encontraron que el número de repeticiones en tándem casi idénticas puede ser de hasta 12 en algunos aislados.



Figura 20. Verificación de presencia de inserto de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en 12 clones, mediante los iniciadores promotores T3/T7. El inserto corresponde a la secuencia parcial de una repetición en tándem de los genes profagos *hyvI/hyvII* de ‘*Ca. L. asiaticus*’ obtenido mediante PCR con el par de iniciadores LJ900fr. Gel de agarosa al 1.5 % con presencia de once bandas de 200 bp y una banda de 300 bp correspondientes al tamaño del inserto de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los 12 clones seleccionados

4.2.4. qPCR con muestras de *C. ×sinensis* para cuantificación del número de genomas por gramo de nervadura central

De los genotipos donde la evaluación de severidad de HLB fue igual o menor a tres (Escala 1-7), se analizaron mediante qPCR cuantitativo con la química de SYBR Green (Figura 21). Utilizando el set de iniciadores LJ900fr, desde cinco muestras por árbol (105 muestras) se generó curvas de amplificación para ‘*Ca. L. asiaticus*’ de todos los árboles. Se encontró variación en los valores del ciclo de cuantificación o *cycle threshold* (Ct) (Figura 22). En muestras de algunos árboles hay diferencias de hasta 10 ciclos en los valores Ct (Cuadro 12) y esto se explica por la variable e irregular distribución de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en las diferentes partes de los árboles (Ding et al., 2015) y en este caso, en las diferentes partes de la copa. Los valores de eficiencia estuvieron entre 99.06 y 111.54% (Figura 15) mientras que los valores R^2 estuvieron entre 0.980 y 0.998, a excepción de un experimento en el cual el R^2 fue de 0.84. Es importante anotar que los valores Ct para los genotipos ‘Rico 7-56’, ‘Lares 82’, ‘Padilla’, ‘Salustiana’ y ‘Rico 1-28’ tuvieron los valores más altos.

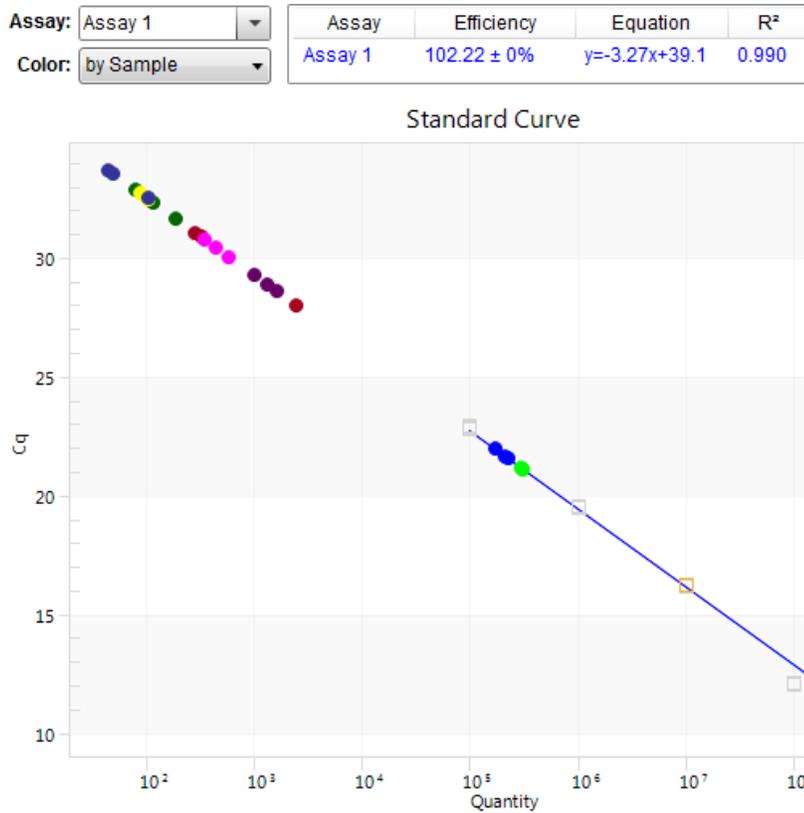


Figura 21. Curva estándar con diluciones seriadas \log_{10} del plásmido recombinante conteniendo dos repeticiones en tándem de los genes *hvpI/hvpII* de la región profago de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

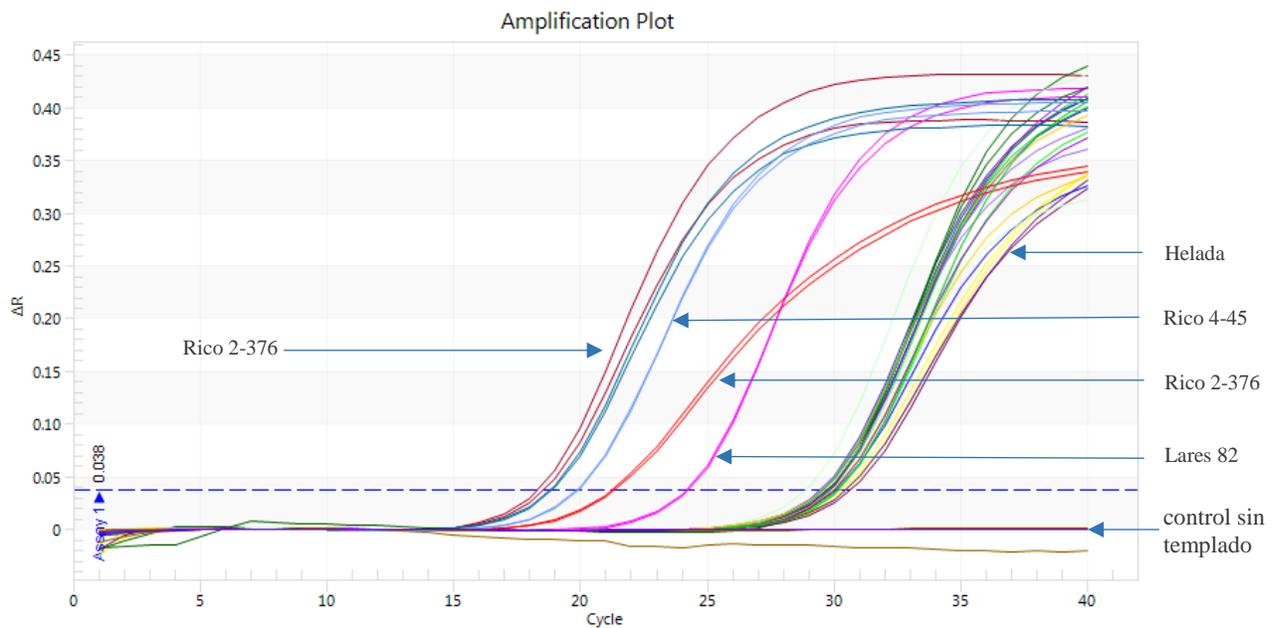


Figura 22. Curvas de amplificación en PCR cuantitativo correspondientes a muestras con presencia de ‘*Ca. L. asiaticus*’. ADNs de árboles de genotipos de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas.

Cuadro 12. Promedios del ciclo de cuantificación y desviación estándar obtenidos mediante PCR cuantitativo de cinco muestras de 21 árboles de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de Adjuntas. PCR cuantitativo con la química SYBR Green y el par de iniciadores LJ900fr.

| Árboles/genotipos | Valores Ct y desviación estándar de cinco muestras por árbol/genotipo | | | | | Promedio | |
|-------------------|---|------------|------------|------------|------------|----------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| Rico 1-28_A | 30.71±0.32 | 28.92±0.02 | 29.04±0.18 | 30.32±0.08 | 33.02±N/A | 30.40 | def |
| Rico 1-28_B | 29.06±0.02 | 19.66±0.06 | 29.43±0.29 | 28.70±0.09 | 21.63±0.25 | 25.70 | abc |
| Rico 1-374_A | 30.05±0.59 | 31.29±N/A | 33.25±0.65 | 31.25±0.14 | 30.22±0.06 | 31.21 | f |
| Rico 1-374_B | 29.30±0.02 | 29.04±0.08 | 21.43±0.06 | 29.30±0.31 | 29.98±1.71 | 27.81 | bcdef |
| Rico 1-374_C | 32.18±0.48 | 32.07±0.18 | 30.74±0.09 | 30.03±0.21 | 18.78±0.13 | 28.76 | cdef |
| Rico 2-376_A | 22.36±0.08 | 29.12±0.09 | 30.54±0.28 | 28.19±0.17 | 30.77±0.24 | 28.19 | bcdef |
| Rico 2-376_B | 20.26±0.05 | 23.54±0.07 | 19.24±0.17 | 29.53±0.02 | 30.24±0.09 | 24.56 | ab |
| Rico 3-80_A | 22.81±N/A | 30.51±0.04 | 30.41±0.35 | 31.01±1.76 | 29.84±0.74 | 28.92 | cdef |
| Rico 4-45_A | 32.28±0.62 | 31.08±N/A | 20.70±0.04 | 21.15±0.05 | 24.02±0.00 | 25.84 | abc |
| Rico 5-50_A | 29.26±0.13 | 28.68±0.18 | 28.61±0.22 | 18.63±0.04 | 28.83±0.06 | 26.80 | bcde |
| Rico 5-50_B | 29.04±0.01 | 28.51±0.01 | 28.78±0.33 | 30.24±0.09 | 30.17±0.05 | 29.35 | cdef |
| Rico 7-56_A | 32.56±0.13 | 28.98±0.14 | 32.09±0.35 | 30.88±0.33 | 29.34±1.76 | 30.77 | def |
| Frontón_A | 29.05±0.12 | 29.04±0.04 | 30.05±0.03 | 28.77±0.40 | 24.98±2.08 | 28.38 | bcdef |
| Helada_A | 31.42±0.14 | 28.78±0.00 | 30.66±0.17 | 28.55±0.10 | 23.72±0.09 | 28.63 | bcdef |
| Lares 82_A | 24.99±0.06 | 26.64±0.36 | 32.21±N/A | 27.64±0.83 | 21.73±0.20 | 26.64 | bcd |
| Lares 82_B | 30.07±0.10 | 28.13±1.54 | 28.63±0.14 | 30.85±0.18 | 29.19±0.53 | 29.37 | cdef |
| Lares 82_C | 20.13±0.02 | 28.32±0.17 | 23.12±0.12 | 19.03±0.13 | 20.06±0.07 | 22.13 | a |
| Lares 82_D | 29.41±0.40 | 32.90±0.27 | 31.14±0.11 | 31.00±0.15 | 29.96±0.02 | 30.88 | ef |
| Padilla_A | 31.98±0.72 | 30.50±0.39 | 28.91±0.34 | 30.68±0.44 | 30.42±0.07 | 30.50 | def |
| Pietri 3-34_A | 30.29±0.03 | 28.23±0.18 | 31.96±N/A | 28.85±0.02 | 28.08±0.44 | 29.48 | cdef |
| Salustiana_A | 31.04±0.29 | 28.69±0.10 | 31.90±0.28 | 31.81±0.03 | 32.51±0.23 | 31.19 | f |

La amplificación en todas las muestras determinó que no hubo inhibición del PCR y esto puede atribuirse a que el “kit” Qiagen utilizado permite obtener ADN de alta calidad de acuerdo a lo reportado por Li et al. (2007) quienes lo mencionan como el mejor “kit” comercial para purificación de ADN y determinación de presencia de patógenos en tejidos de cítricos.

4.2.5. PCR cuantitativo para determinación del título de ‘*Ca. L. asiaticus*’

4.2.5.1. Determinación del número de copias del gen 16S rDNA por muestra

Se realizó PCR con ocho muestras positivas de ‘*Ca. L. asiaticus*’ utilizando el par de iniciadores OI1/OI2c que amplifican un fragmento de 1,160 pares de bases del gen 16S rDNA de esta bacteria. Este amplicón se clonó en un plásmido vector y el plásmido recombinante se multiplicó en *E. coli*. Se seleccionaron 16 clones en los que se comprobó presencia del inserto

clonado (Figura 23) lo cual se realizó con los iniciadores T3/T7. El producto PCR realizado con el ADN plasmidial de tres clones se envió para secuenciamiento (Macrogen U.S.A, Maryland) y las secuencias recibidas se sometieron a Blast, las que tuvieron entre 99 y 100 % de similitud con secuencias de ‘*Ca. L. asiaticus*’ sometidas por otros investigadores. Luego, el ADN plasmidial del clon identificado como *pClas-2* se utilizó como control positivo en el PCR cuantitativo utilizando la química TaqMan para determinar el número de copias del fragmento del gen 16S rDNA de ‘*Ca. L. asiaticus*’ presentes en 25 nanogramos de ADN de cada muestra y posteriormente determinar el número de genomas por gramo de tejido de nervadura central de cada árbol.

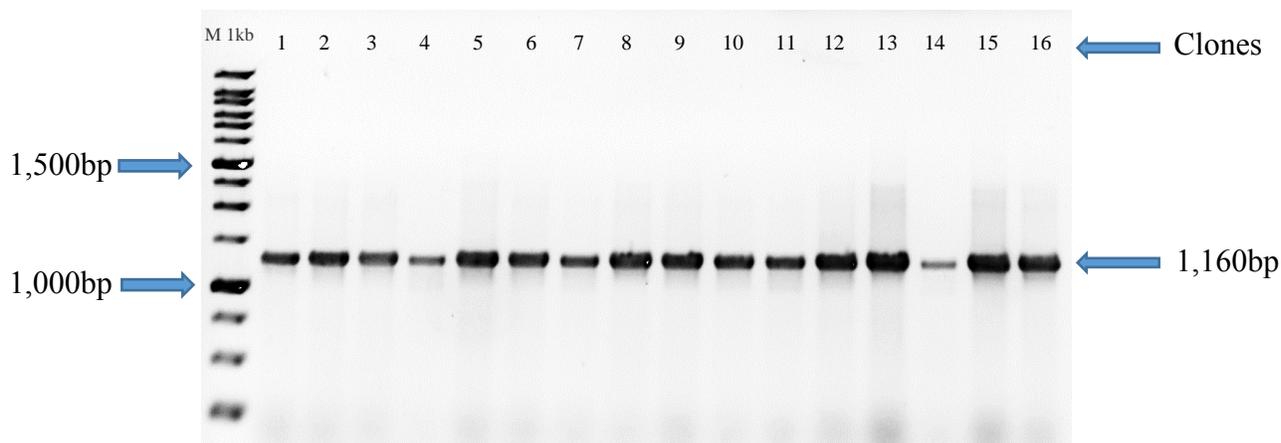


Figura 23. Verificación de presencia de inserto de 1,160 pares de bases del gen 16S rDNA de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en 16 clones obtenidos mediante ligación de este fragmento en un plásmido. Fragmento (amplicón) obtenido mediante el par de iniciadores OI1/OI2c. Verificación realizada mediante PCRc con el par de iniciadores promotores T3/T7.

Al igual que en el PCR cuantitativo con la química SYBR Green y el par de iniciadores LJ900fr, en este nuevo qPCR se obtuvo amplificación en todas las muestras (Figura 24). Este qPCR desarrollado por Li y colaboradores está reportado ser cien veces más sensible que el PCR convencional. Los valores Ct estuvieron entre 20.25 y 30.06 ciclos, siendo el genotipo ‘Rico 7-56’ el del valor más alto con 27.42 ciclos y por lo tanto el de menor título (Cuadro 13). El promedio de la desviación estándar de los valores Ct fueron en promedio menores de 0.19 ciclos.

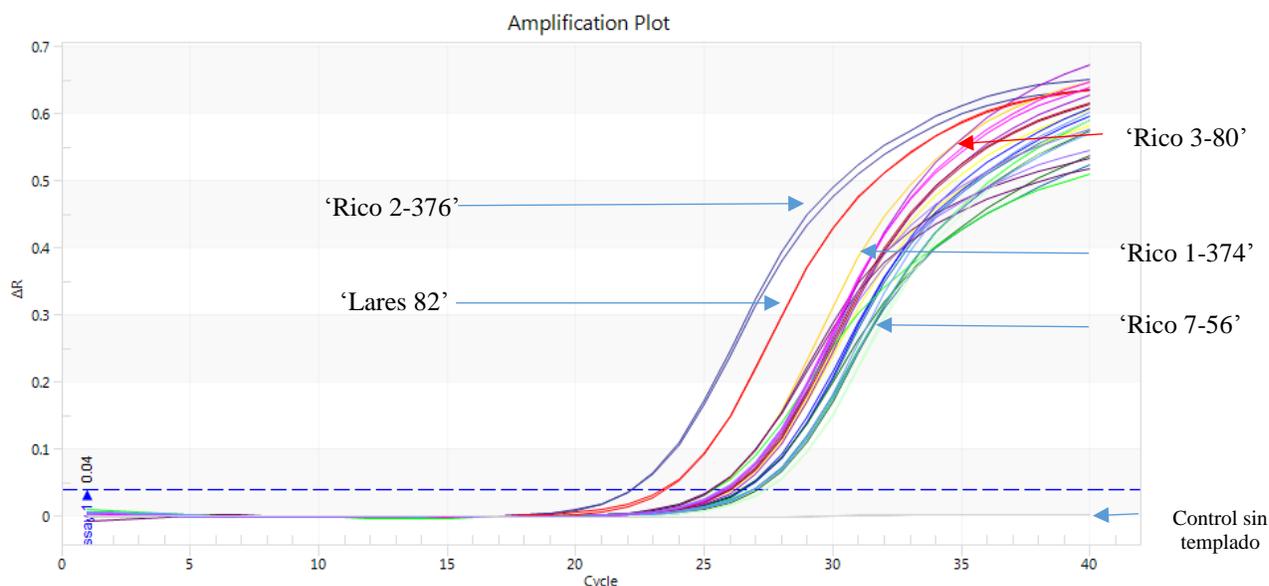


Figura 24. Curvas de amplificación de ADNs de genotipos de *C. x sinensis* mediante qPCR con la química TaqMan y el juego de iniciadores HLBaspr.

Cuadro 13. Valores Ct y desviación estándar de cinco muestras de 21 genotipos/árboles de *C. x sinensis*, obtenidos mediante PCR cuantitativo con la química TaqMan y el juego de iniciadores HLBaspr.

| Árboles/genotipos | Valores Ct y desviación estándar de cinco muestras por árbol | | | | | Promedio |
|-------------------|--|------------|------------|------------|------------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Rico 1-28_A | 23.11±0.01 | 27.96±0.10 | 22.97±0.04 | 27.29±0.10 | 26.25±0.01 | 25.52 |
| Rico 1-28_B | 25.10±0.14 | 25.64±0.21 | 26.49±0.03 | 27.79±0.29 | 23.18±0.38 | 25.64 |
| Rico_1-374_A | 26.12±0.02 | 26.26±0.01 | 24.00±0.81 | 26.74±0.27 | 24.22±1.10 | 25.47 |
| Rico 1-374_B | 24.28±0.32 | 25.75±0.85 | 22.91±0.03 | 26.29±1.29 | 23.77±0.00 | 24.60 |
| Rico 1-374_C | 22.75±0.03 | 26.69±0.08 | 30.06±0.44 | 27.00±0.07 | 28.69±0.08 | 27.04 |
| Rico 2-376_A | 22.39±0.03 | 26.15±0.02 | 28.21±0.07 | 26.22±0.06 | 27.98±0.05 | 26.19 |
| Rico 2-376_B | 22.19±0.04 | 22.63±0.21 | 22.03±0.06 | 28.53±0.71 | 23.17±0.03 | 23.71 |
| Rico 3-80 | 24.85±0.12 | 27.10±0.04 | 26.12±0.14 | 24.18±0.05 | 26.54±0.18 | 25.76 |
| Rico 4-45 | 22.92±0.09 | 24.04±0.03 | 25.29±0.14 | 24.82±0.05 | 25.79±0.12 | 24.57 |
| Rico_5-50_A | 26.02±0.11 | 24.20±0.04 | 26.07±0.02 | 21.28±0.22 | 26.04±0.27 | 24.72 |
| Rico 5-50_B | 25.08±0.28 | 25.36±0.36 | 26.41±0.09 | 27.81±0.10 | 28.31±0.12 | 26.59 |
| Rico 7-56 | 26.11±0.10 | 28.55±0.08 | 27.94±0.24 | 27.12±0.02 | 27.39±0.06 | 27.42 |
| Frontón | 23.19±0.15 | 27.19±0.11 | 24.08±0.08 | 27.00±0.01 | 27.70±0.09 | 25.83 |
| Helada | 25.30±0.06 | 23.69±0.46 | 26.99±0.49 | 26.32±0.06 | 25.05±0.17 | 25.47 |
| Lares 82_A | 25.76±0.02 | 22.56±0.01 | 27.36±0.06 | 22.68±0.08 | 24.47±0.01 | 24.57 |
| Lares 82_B | 26.51±0.05 | 22.85±0.29 | 25.64±0.23 | 29.97±0.09 | 27.75±0.21 | 26.54 |
| Lares_82_C | 24.89±0.01 | 23.21±0.07 | 26.08±0.01 | 20.25±0.18 | 24.15±0.01 | 23.72 |
| Lares 82_D | 26.43±0.09 | 23.44±0.11 | 26.15±1.07 | 26.18±0.99 | 23.99±0.18 | 25.24 |
| Padilla | 23.23±0.39 | 25.90±0.27 | 25.71±0.03 | 26.17±0.09 | 26.02±0.05 | 25.41 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| Pietri 3-34 | 29.60±0.97 | 23.58±0.42 | 28.61±0.23 | 29.20±0.02 | 27.29±0.11 | 27.66 |
| Salustiana | 25.84±0.06 | 23.14±0.00 | 26.80±0.46 | 24.76±0.18 | 26.17±0.11 | 25.34 |

No se encontró diferencia estadística significativa entre los valores Ct de los 21 árboles (p-valor>0.05). Sin embargo, los valores más altos, que indican menor título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ los tuvieron los árboles ‘Pietri 3-34’, ‘Rico 7-56’ y ‘Rico 1-374’C con 27.66, 27.42 y 27.04 ciclos. Los valores Ct altos indican menor concentración de la bacteria, lo cual está relacionado a la severidad baja que se registró en los árboles evaluados, como los describe Stover et al. (2011).

Posteriormente, el número de copias del gen 16S rADN (Cuadro 14) se obtuvo mediante la determinación de la concentración *log* de ‘*Ca. L. asiaticus*’ para lo cual los valores Ct fueron sometidos a la fórmula *Grand Universal equation* $Y=13.82-0.2866X$, propuesta por Li et al. (2008), en donde Y= concentración *log* y X= el valor Ct obtenido en el experimento de PCR cuantitativo.

Cuadro 14. Número de copias del gen 16S rDNA de ‘*Ca. L. asiaticus*’ presente por gramo de nervadura central foliar de genotipos/árboles de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas.

| Genotipos | Número de copias del gen 16S rDNA por gramo de tejido | | | | | Promedio |
|---------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| ‘Rico 1-28’ | 1.26E+09 | 4.54E+08 | 2.35E+09 | 1.29E+08 | 1.51E+09 | 1.14E+09 |
| ‘Rico 1-374’ | 2.99E+09 | 3.36E+08 | 2.23E+09 | 2.56E+08 | 1.03E+09 | 1.37E+09 |
| ‘Rico 2-376’ | 4.92E+09 | 2.22E+09 | 3.12E+09 | 1.76E+08 | 1.94E+09 | 2.48E+09 |
| ‘Rico 3-80’ | 1.50E+09 | 3.90E+08 | 2.67E+08 | 1.76E+09 | 6.75E+08 | 9.17E+08 |
| ‘Rico 4-45’ | 5.38E+09 | 1.33E+09 | 9.43E+08 | 1.62E+09 | 6.40E+08 | 1.98E+09 |
| ‘Rico 5-50’ | 5.83E+08 | 4.69E+08 | 1.49E+08 | 2.35E+09 | 1.04E+08 | 7.31E+08 |
| ‘Rico 7-56’ | 3.43E+08 | 9.47E+07 | 7.40E+07 | 1.61E+08 | 1.14E+08 | 1.57E+08 |
| ‘Fronton’ | 1.29E+09 | 1.13E+08 | 4.99E+08 | 1.01E+08 | 1.89E+08 | 4.38E+08 |
| ‘Helada’ | 4.89E+08 | 9.20E+08 | 1.39E+08 | 1.90E+08 | 5.49E+08 | 4.57E+08 |
| ‘Lares 82’ | 4.64E+08 | 2.05E+09 | 3.02E+08 | 2.64E+09 | 8.18E+08 | 1.26E+09 |
| ‘Padilla’ | 2.29E+09 | 5.69E+08 | 4.74E+08 | 7.68E+08 | 1.50E+09 | 1.12E+09 |
| ‘Pietri 3-34’ | 3.25E+07 | 2.15E+09 | 4.83E+07 | 7.87E+07 | 1.30E+08 | 4.87E+08 |
| ‘Salustiana’ | 3.36E+08 | 6.22E+09 | 3.09E+08 | 1.43E+09 | 4.56E+08 | 1.75E+09 |

4.2.5.2. Determinación del número de genomas por gramo de nervadura central fresca

A partir del número de copias del gen 16S rADN de ‘*Ca. L. asiaticus*’ se calculó el

número de genomas por gramo de nervadura central fresca de los genotipos analizados (Cuadro 15). Los valores originales del número de genomas no tenían normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se transformaron a *log10* previo análisis estadístico.

Cuadro 15. Número de genomas de ‘*Ca. L. asiaticus*’ por gramo de nervadura central foliar de genotipos de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas.

| Genotipos <i>C. ×sinensis</i> | Número de genomas de ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ por gramo de nervadura central fresca | | | | | Promedio* | |
|----------------------------------|---|----------|----------|----------|----------|-----------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| ‘Rico 1-28’ | 4.21E+08 | 1.51E+08 | 7.84E+08 | 4.31E+07 | 5.02E+08 | 3.80E+08 | abc |
| ‘Rico 1-374’ | 9.97E+08 | 1.12E+08 | 7.45E+08 | 8.54E+07 | 3.44E+08 | 4.57E+08 | abc |
| ‘Rico 2-376’ | 1.64E+09 | 7.40E+08 | 1.04E+09 | 5.86E+07 | 6.47E+08 | 8.25E+08 | a |
| ‘Rico 3-80’ | 4.98E+08 | 1.30E+08 | 8.91E+07 | 5.86E+08 | 2.25E+08 | 3.06E+08 | abc |
| ‘Rico 4-45’ | 1.79E+09 | 4.42E+08 | 3.14E+08 | 5.40E+08 | 2.13E+08 | 6.61E+08 | ab |
| ‘Rico 5-50’ | 1.94E+08 | 1.56E+08 | 4.97E+07 | 7.83E+08 | 3.47E+07 | 2.44E+08 | bcd |
| ‘Rico 7-56’ | 1.14E+08 | 3.16E+07 | 2.47E+07 | 5.36E+07 | 3.80E+07 | 5.25E+07 | d |
| ‘Frontón’ | 4.29E+08 | 3.76E+07 | 1.66E+08 | 3.37E+07 | 6.29E+07 | 1.46E+08 | cd |
| ‘Helada’ | 1.63E+08 | 3.07E+08 | 4.62E+07 | 6.32E+07 | 1.83E+08 | 1.52E+08 | cd |
| ‘Lares 82’ | 1.55E+08 | 6.84E+08 | 1.01E+08 | 8.81E+08 | 2.73E+08 | 4.19E+08 | abc |
| ‘Padilla’ | 7.64E+08 | 1.90E+08 | 1.58E+08 | 2.56E+08 | 4.99E+08 | 3.73E+08 | abc |
| ‘Pietri 3-34’ | 1.08E+07 | 7.16E+08 | 1.61E+07 | 2.62E+07 | 4.33E+07 | 1.62E+08 | d |
| ‘Salustiana’ | 1.12E+08 | 2.07E+09 | 1.03E+08 | 4.78E+08 | 1.52E+08 | 5.83E+08 | abc |

Coletta-Filho (2010); Stover (2014) mencionan que los síntomas de HLB empiezan a hacerse visibles en los árboles cuando el título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ es de entre 10^4 y 10^5 genomas por gramo de tejido, lo que se relaciona con el título de los árboles en que se cuantificó la bacteria, en los que la severidad de HLB estuvo entre 2 y 3 según la escala y el título promedio por árbol fue superior a 10^7 genomas por gramo de tejido.

El número de genomas fue variable entre genotipos (Figura 25). Los genotipos ‘Rico 7-56’, ‘Frontón’, ‘Helada’, ‘Pietri 3-34’ y ‘Rico 5-50’ tuvieron el menor número de genomas por gramo de tejido con 5.25×10^7 , 1.46×10^8 , 1.52×10^8 , 1.62×10^8 y 2.44×10^8 , respectivamente, los cuales a su vez no fueron diferentes estadísticamente entre sí. El genotipo ‘Rico 7-56’ se diferenció estadísticamente a los ocho genotipos restantes: ‘Rico 3-80’, ‘Padilla’, ‘Rico 1-28’, ‘Lares 82’, ‘Rico 1-374’, ‘Salustiana’, ‘Rico 4-45’ y ‘Rico 2-376’ con valores de entre 3.06×10^8 y 8.25×10^8 genomas por gramo de tejido; lo cual señala que 8 genotipos no se diferenciaron

entre sí estadísticamente, resultados que coinciden con lo señalado por Folimonova et al. (2009), quien reporta que genotipos sintomáticos de HLB pueden contener concentraciones similares de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

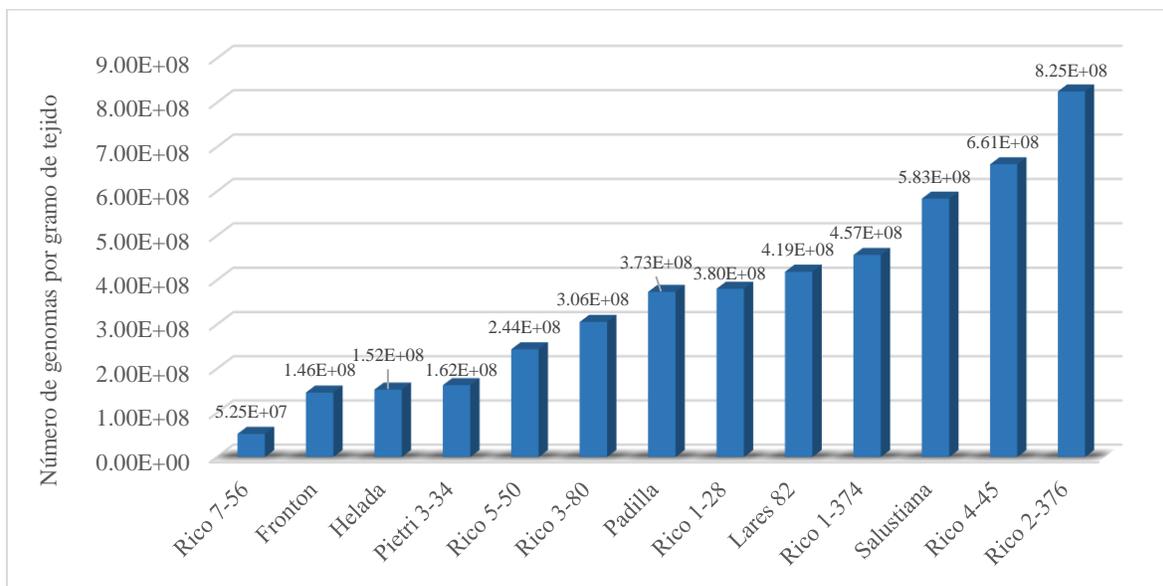


Figura 25. Número de genomas de ‘*Ca. L. asiaticus*’ por gramo de nervadura central foliar. genotipos/árboles de *C. x sinensis* ordenados de menor a mayor concentración de la bacteria.

Zhou y colaboradores mencionan que los síntomas de la enfermedad varían dependiendo del título de la bacteria en las plantas infectadas. En el presente estudio, de entre los 51 árboles en evaluación de severidad de HLB, se seleccionaron los que mostraron severidad igual o inferior a 3 según la escala, resultando en 21 árboles, de los cuales ninguno tuvo valor de severidad menor a 2.

El equivalente del número de genomas por gramo de nervadura central de los genotipos ‘Rico 7-56’, ‘Frontón’, ‘Helada’ y ‘Pietri 3-34’ en comparación con otros genotipos informados en la literatura indican una baja concentración de la ‘*Ca. L. asiaticus*’. En 2009 Li y colaboradores, informaron la distribución cuantitativa de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en diferentes partes de plantas de tipos de cítricos donde mencionan concentraciones de 6.89×10^8 a 1.78×10^{11} . Estos resultados sugieren que los genotipos de *C. x sinensis* de la EEA Adjuntas son promisorios y se debe continuar con su investigación para incorporarlos en la producción de cítricos en la isla. Se requerirá evaluaciones sucesivas del título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ para corroborar esta información en diferentes estaciones del año, etapas fenológicas del cultivo y localidades agroecológicas.

4.3. Evaluación de severidad de HLB en genotipos de *Citrus* spp. y *Poncirus trifoliata*

4.3.1. Severidad de HLB en *Citrus ×latifolia* injertada en cinco patrones

La evaluación de severidad de HLB se realizó en un huerto de ocho años. Se encontró severidad alta en todos los árboles de *C. ×latifolia* en los cinco patrones (Cuadro 16). No se encontró diferencia estadística significativa entre tratamientos (p -valor >0.05). Pero cabe mencionar que el menor promedio se registró en *C. ×latifolia* injertada en los patrones ‘Carrizo Citrange’ y ‘HRS-812’ con valores de 5.75 y 6.00 de la escala utilizada (Figura 26). Albrecht, y Bowman (2012) reportaron a ‘Carrizo Citrange’ como tolerante y a ‘HRS-812’ como moderadamente tolerante a HLB; mientras que mandarina ‘Cleopatra’ es considerada una variedad susceptible.

Cuadro 16. Severidad de HLB en *C. ×latifolia* injertada en cinco patrones de cítricos, en la EEA Isabela

| Patrones | Severidad por bloques | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----|-----|-----|
| | I | II | III | IV |
| ‘Carrizo Citrange’ | 5.5 | 5.0 | 7.0 | 5.5 |
| ‘HRS-812’ | 7.0 | 4.5 | 7.0 | 5.5 |
| Mandarina ‘Cleopatra’ | 6.5 | 6.5 | 6.0 | 7.0 |
| Limón rugoso | 6.0 | 6.0 | 7.0 | 5.5 |
| ‘Swingle Citrumelo’ | 6.0 | 6.5 | 6.5 | 6.0 |

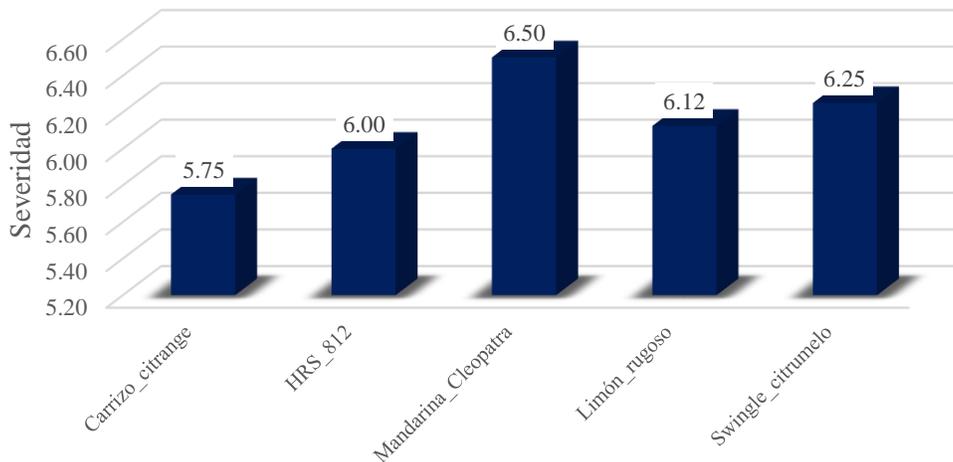


Figura 26. Promedio de severidad de HLB en árboles de *C. ×latifolia* injertada en cinco patrones en la EEA Isabela.

4.3.2. Severidad de HLB en genotipos de *Citrus* spp. y *P. trifoliata*

Junto al experimento de *C. ×latifolia* se encontraban varios árboles de *Citrus* spp. y *Poncirus trifoliata* que se consideraron evaluar. En el análisis de la evaluación de HLB en seis genotipos (Cuadro 17), se determinó diferencia estadística significativa entre tratamientos (p-valor <0.05). El menor promedio de severidad se registró en los genotipos *Poncirus trifoliata* L. Raf. y ‘HRS-812’ (*C. reticulata* Blanco × *P. trifoliata* L. Raf.), ambos con promedios de 3.00, fueron diferentes estadísticamente a los demás genotipos evaluados (Figura 27). Siguió en menor severidad el genotipo ‘HRS-802’ [*C. grandis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata*] que con un valor de 4.75 no fue diferente estadísticamente al genotipo ‘Carrizo Citrange’ [*C. ×sinensis* (L.) Osbeck ‘Washington’ × *P. trifoliata*] que tuvo en promedio una calificación de 5.25 en la escala. Los genotipos de mayor severidad fueron Smooth Flat Seville (*C. ×aurantium* L.) y HRS-897 (*C. reticulata* Blanco × *P. trifoliata*) con valores de 6.00 y 7.00, respectivamente.

Cuadro 17. Severidad de HLB en genotipos de *Citrus* spp. y *P. trifoliata* en la EEA Isabela.

| Genotipos | Severidad | | | |
|----------------------------|-----------|----|-----|----|
| | I | II | III | IV |
| ‘HRS-812’ | 3 | 3 | 3 | 3 |
| ‘HRS-897’ | 7 | 7 | 7 | 7 |
| ‘Carrizo Citrange’ | 6 | 6 | 4 | 5 |
| ‘Smooth Flat Seville’ | 6 | 7 | 7 | 4 |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 3 | 3 | 3 | 3 |
| ‘HRS-802’ | 4 | 4 | 5 | 6 |

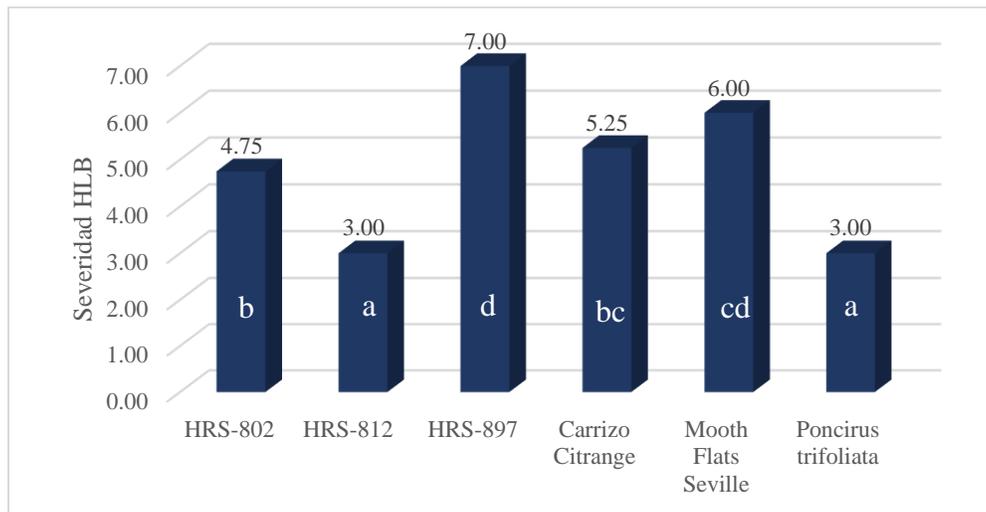


Figura 27. Promedio de severidad de HLB en genotipos de *Citrus* spp. y *P. trifoliata* en la EEA Isabela.

Aunque Albrecht y Bowman (2011) reportaron al patrón ‘HRS-897’ como tolerante, en esta evaluación resultó el de mayor severidad de HLB. Los patrones ‘HRS-802’ y ‘HRS-812’ se han señalado como moderadamente tolerantes (Albrecht y Bowman, 2012). *Poncirus trifoliata* es considerado tolerante a HLB (Ramadugu et al., 2016) así como los híbridos obtenidos del cruce con este genotipo (Rawat et al., 2017).

4.3.3. Título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en tres genotipos híbridos de *Citrus* × *P. trifoliata*

Con base en el número de copias de repeticiones en tándem de los genes *hyvI/hyvII* generadas en cada muestra al realizar el PCR cuantitativo con los iniciadores LJ900fr, se pudo estimar el título relativo de ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los genotipos de *C. ×latifolia*, utilizando como criterio el valor Ct. El valor Ct promedio más bajo se determinó en el genotipo ‘Swingle Citrumelo’ con 17.74, seguido por ‘HRS-897’ con 19.42 y ‘HRS-812’ con 21.26 ciclos, lo que indica a este último genotipo como el de menor título de ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Figura 28). Estas concentraciones de ‘de la bacteria se consideran altas y están relacionadas a la alta severidad de síntomas que presentan los árboles y a su que han estado infectadas por aproximadamente ocho años.

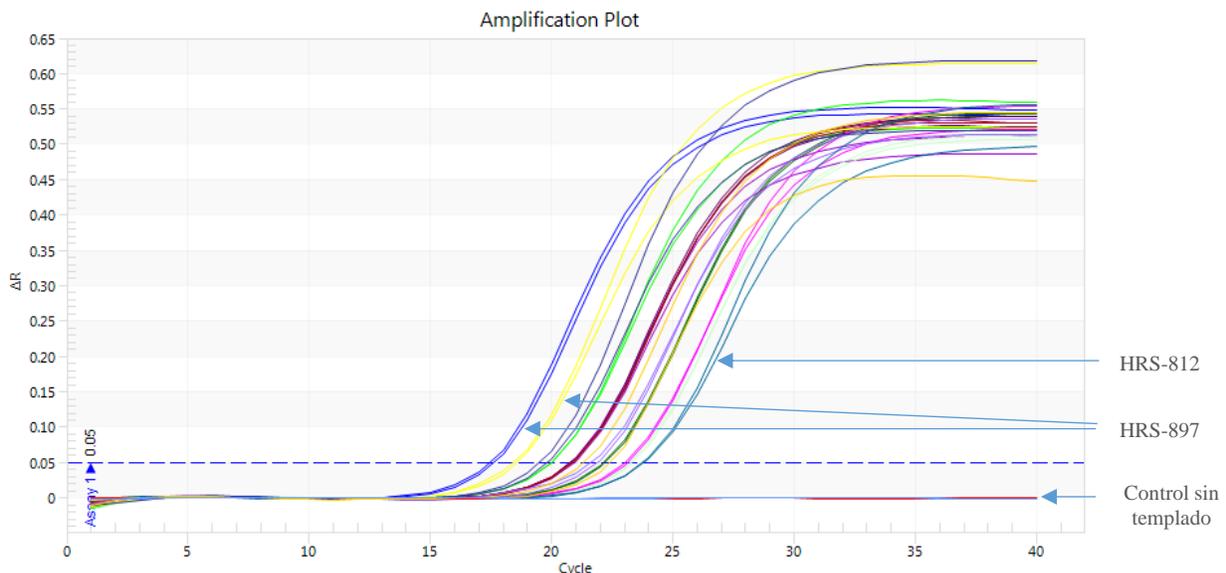


Figura 28. Curvas de amplificación en muestras con presencia de ‘*Ca. L. asiaticus*’. ADNs de árboles de híbridos de *Citrus* × *P. trifoliata* de experimento de la EEA Isabela.

4.4. Información suplementaria de los genotipos de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la Estación Experimental Agrícola Adjuntas

4.4.1. Características físicas y grados Brix de frutos

Debido a que no se disponía de registros con información oficial de las características fenotípicas de los genotipos de *C. ×sinensis* de Puerto Rico, se evaluaron cinco frutos de cada uno de los 13 genotipos considerados en este estudio (Cuadro 18). En todos los genotipos los grados Brix fueron superiores a 11, valor mínimo establecido por el USDA para calificar al jugo de *C. ×sinensis* grado A, de alta calidad para la industria (USDA, 2014). El valor más alto de 13.41 se registró en el genotipo ‘Pietri-334’. El mayor peso se registró en ‘Frontón’ con 427.50 gramos, así como también registró el mayor diámetro y longitud. Este genotipo mostró, además, el menor espesor del pericarpio con 1.0 mm y a su vez el mayor espesor del endocarpio con 6.0 mm. El número de segmentos de los genotipos estuvo entre 9.40 y 12.0. El menor número de segmentos correspondió a ‘Rico-2 376’ y ‘Padilla’. En seis genotipos no se encontró presencia de semillas. Los genotipos ‘Rico 3-80’ y ‘Helada’ mostraron el mayor número de semillas con 15.20 y 19.40 respectivamente.

Cuadro 18. Parámetros de características físicas y grados Brix de frutos de 13 genotipos de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas. Los datos representan promedios de cinco frutos.

| Genotipos | Peso (g) | Diámetro (pulgada) | Longitud (pulgada) | Espesor del pericarpio* | Espesor del endocarpio* | Número de segmentos | Número de semillas | Grados Brix** |
|---------------|----------|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------|
| ‘Rico 1-28’ | 192.10 | 3.02 | 3.06 | 1.80 | 4.00 | 11.40 | 0.60 | 13.21 |
| ‘Rico 1-374’ | 181.04 | 2.85 | 2.69 | 1.50 | 4.40 | 11.80 | 0.00 | 11.33 |
| ‘Rico 2-376’ | 173.32 | 2.65 | 2.70 | 1.98 | 3.40 | 9.40 | 0.00 | 12.25 |
| ‘Rico 3-80’ | 178.16 | 2.77 | 2.73 | 1.64 | 3.20 | 10.40 | 15.20 | 11.85 |
| ‘Rico 4-45’ | 145.90 | 2.60 | 2.58 | 1.30 | 4.60 | 10.40 | 7.20 | 11.09 |
| ‘Rico 5-50’ | 203.02 | 2.94 | 2.81 | 1.66 | 3.30 | 10.60 | 0.80 | 11.39 |
| ‘Rico 7-56’ | 120.58 | 2.44 | 2.43 | 2.00 | 3.50 | 10.00 | 0.00 | 11.56 |
| ‘Fronton’ | 427.50 | 3.59 | 3.66 | 1.00 | 6.00 | 12.00 | 1.00 | 11.25 |
| ‘Helada’ | 138.86 | 2.53 | 2.26 | 1.30 | 3.30 | 11.00 | 19.40 | 12.55 |
| ‘Lares 82’ | 203.04 | 3.02 | 2.85 | 1.70 | 3.90 | 11.40 | 0.00 | 11.95 |
| ‘Padilla’ | 158.44 | 2.63 | 2.70 | 1.54 | 3.40 | 9.80 | 0.00 | 12.83 |
| ‘Pietri 3-34’ | 167.56 | 2.52 | 2.86 | 1.30 | 4.00 | 11.00 | 0.00 | 13.41 |
| ‘Salustiana’ | 172.54 | 2.70 | 2.79 | 1.60 | 3.90 | 11.20 | 1.00 | 12.27 |

* Valores expresados en milímetros ** Gramos de azúcar/100 mL de solución

5. CONCLUSIONES

En el experimento de *C. reticulata* (mandarina) los patrones ‘US-942’ y ‘Cleopatra’ confirieron efecto de menor severidad HLB en los genotipos injertados. Sin embargo, el patrón ‘US-942’ se destacó por la menor acumulación de la enfermedad en el tiempo (AUDPC). Los genotipos injertados 1, 2, 3, 6, 7, 8 tuvieron menor severidad y acumulación de la enfermedad con respecto a los genotipos 4 y 5 de mayor severidad.

Bajo las condiciones de la EEA Adjuntas, los 13 genotipos de *C. ×sinensis* (naranja) mostraron severidad de HLB entre media y baja que permite a los árboles mantener su vida productiva. No obstante, todos los árboles evaluados están infectados con ‘*Ca. L. asiaticus*’, los niveles del título de la bacteria fueron relativamente bajos. Considerando la edad del huerto (13 años aproximadamente), los resultados de este estudio demuestran la importancia y el potencial de los genotipos ‘Rico’ y las otras seis selecciones de *C. ×sinensis* de la colección frente al HLB, los cuales deben ser conservados y estudiados como fuentes de tolerancia a HLB.

Luego de aproximadamente nueve años de infección por ‘*Ca. L. asiaticus*’ en los árboles del experimento de *C. ×latifolia* injertada en cinco patrones diferentes, los árboles se volvieron improductivos. No obstante, cuatro de los patrones son considerados tolerantes a HLB, todos mostraron alta severidad de la enfermedad transcurrido este tiempo.

6. RECOMENDACIONES

- Evaluar el híbrido 'US-942' como patrón de genotipos de cítricos para determinar las combinaciones patrón/genotipo con menor severidad de HLB en campo.
- Evaluaciones de combinaciones patrón/genotipo a mediano y largo plazo, permitirían determinar la respuesta de genotipos en el patrón 'US-942' en cuanto a mantenimiento de productividad y calidad de fruta en el tiempo y a niveles aceptables comercialmente. Así como, determinar la longevidad de los árboles bajo condiciones de infección por HLB.
- Evaluar los genotipos 'Rico' en el patrón 'US-942' y otros patrones tolerantes a HLB informados por otros investigadores, para determinar niveles de tolerancia a la infección por '*Ca. L. asiaticus*'. Estas evaluaciones pueden ser desarrolladas bajo condiciones de prácticas agronómicas ideales para el cultivo y en distintas localidades agroecológicas y así poder registrar la expresión del potencial de estos genotipos.

7. LITERATURA CONSULTADA

- Albrecht, U., y Bowman, K. D. (2011). Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience*, 46(1), 16-22.
- Albrecht, U., y Bowman, K.D. (2012). Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Scientia Horticulturae*, 147: 71-80.
- Albrecht, U., McCollum, G., y Bowman, K.D. (2012). Influence de rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) trees. *Scientia Horticulturae*, 138: 210-220.
- American Phytopathological Society (APS). (sf). Calculating the area under the disease progress curve to quantify disease progress. Recuperado de:
<http://www.apsnet.org/EDCENTER/ADVANCED/TOPICS/ECOLOGYANDEPIDEMIOLOGYINR/DISEASEPROGRESS/Pages/AUDPC.aspx>
- Ammar, E., Ramos, J.E., Hall, D.G., Dawson, W.O., y Shatters, Jr., R.G. (2016). Acquisition, Replication and Inoculation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ following Various Acquisition Periods on Huanglongbing-Infected *Citrus* by Nymphs and Adults of the Asian Citrus Psyllid. *PLoS ONE*, 11(7): e0159594.
- Ammar, E., Shatters, R.G. Jr, Lynch, C. y Hall, D.G. (2001). Detection and relative titer of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus Huanglongbing disease. *Annals of the Entomological Society of America*, 104: 526–533.
- Aritua, V., Achor, D., Gmitter, F.G., Albrigo, G. y Wang, N. (2013). Transcriptional and Microscopic Analyses of *Citrus* Stem and Root Responses to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Infection. *PLoS ONE*, 8(9): e73742.
- Aubert, B. (1987). *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits*, 42(3), 149-162.
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Busato, L. A., y Stuchi, E. S. (2006). Damages caused by huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. In *Proc. of the Huanglongbing-Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil* (p. 39).
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H. y Stuchi, E.S. (2009). Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 565.

- Boava, L.P., Sagawa, C.H.D., Cristofani-Yaly, M., y Machado, M.A. (2015). Incidence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’-infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. *Phytopathology*, 105: 518-524.
- Borgoni, P.C., Vendramim, J.D., Lorencao, A.L. y Machado, M.A. (2014). Resistance of *Citrus* and related genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Neotropical Entomology*, 43(5), 465-469.
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of *Citrus*. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37.
- Bowman, K. D., y McCollum, G. (2015). Five new citrus rootstocks with improved tolerance to huanglongbing. *HortScience*, 50(11), 1731-1734.
- Bowman, K.D. Faulkner, L. y Kesinger, M. (2016a). New *Citrus* Rootstocks Released by USDA 2001–2010: Field Performance and Nursery Characteristics. *HortScience*, 51(10):1208.
- Bowman, K. D., McCollum, G., y Albrecht, U. (2016b). Performance of ‘Valencia’ orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by huanglongbing. *Scientia horticultrae*, 201, 355-361.
- Brlansky, R.H., Dewdney, M.M., Rogers, M.E. y Chung, K.R. (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. p. 123-125.
- Cellier, G., Moreau, A., Cassam, N., Hostachy, B., Ryckewaert, P., Aurela, L., Picard, R., Lombion, K. y Rioualec, A.L. (2014). First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with huanglongbing on *Citrus latifolia* in Martinique and Guadeloupe, French West Indies. *Plant Disease*, 98(5), 683-684.
- Coletta-Filho, H. D., Carlos, E. F., Alves, K. C. S., Pereira, M. A. R., Boscariol-Camargo, R. L., De Souza, A. A., y Machado, M. A. (2010). In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 126(1), 53-60.
- Coletta-Filho, H.D., Daugherty, M.P., Ferreira, C, y Lopes, J.R. (2014). Temporal progression of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. *Phytopathology*, 104(4), 416-21.
- Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu, J., Jr., Machado, M.A., do Amaral, A.M. y Muller, G.W. (2004). First report of the causal agent of huanglongbing (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’) in Brazil. *Plant Disease*, 88: 1382.

- Cornejo, J.F. y Chica, E.J. (2014). First record of *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*) in Ecuador infesting urban citrus and orange jasmine trees. *Journal of Insect Science*, 1(14), 298.
- Da Graça, J.V. (2005). Huanglongbing: Biology and overview. *Proceedings of the International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop*. Recuperado de: http://freshfromflorida.s3.amazonaws.com/2nd_International_Canker_Huanglongbing_Research_Workshop_2005.pdf
- Davis, R. I., Gunua, T. G., Kame, M. F., Tenakanai, D., y Ruabete, T. K. (2005). Spread of citrus huanglongbing (greening disease) following incursion into Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology*, 34(4), 517-524.
- Deng, X., Chen, J., Shan, Z., Zhou, G., Li, H., y Civerolo, E. L. (2008). Identification of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from foshou (*Citrus medica*) in China. *Plant Pathology*, 57(2), 365-365.
- Ding, F., Duan, Y., Paul, C., Brlansky, R.H. y Hartung, J.S. (2015). Localization and distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Citrus* and Periwinkle by direct tissue blot immune assay with an anti-OmpA Polyclonal Antibody. *PLoS ONE*, 10:5, e0123939.
- Ding, F., Duan, Y., Yuan, Q., Shao, J. y Hartung, J. (2016). Serological detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Citrus*, and identification by GeLC-MS/MS of a chaperone protein responding to cellular pathogens. *Nature*, Scientific Reports 6, artículo número: 29272. Recuperado de: <http://www.nature.com/articles/srep29272>
- Ding, F., Jin, S., Hong, N., Zhong, Y. y Cao, Q. (2008). Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating ‘*Candidatus Liberobacter asiaticus*’, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips. *Plant Cell Reports*, 27(2): 241–250.
- Duan, Y.P., Zhou, L.J., Hall, D.G., Li, W.B., y Doddapaneni, H. (2009). Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22: 1011–1020.
- Dutt, M., Barthe, G., Irey, M., y Grosser, J. (2015). Transgenic citrus expressing an Arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against huanglongbing (HLB; citrus greening). *PLoS ONE*, 11:1-17.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2016). ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ detected in *Diaphorina citri* in Colombia. Reporting Service no. 03 – 2016. Artículo número: 2016/062. Recuperado de: <https://gd.eppo.int/reporting/article-5464>
- Estévez de Jensen, C., Vitoreli, A., y Román, F. (2010). Citrus greening in commercial orchards in Puerto Rico. *Phytopathology*, APS Annual meeting, 100: S34.

- Folimonova, S. Y., y Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100(9), 949-958.
- Folimonova, S.Y., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Gowda, S. y Dawson, W.O. (2009). Examination of the responses of different genotypes of *Citrus* to huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology*, 99(12): 1346-1354.
- Fujikawa, T., Miyata, S.I., y Iwanami, T. (2013). Convenient Detection of the Citrus Greening (Huanglongbing) Bacterium ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ by Direct PCR from the Midrib Extract. *PLoS ONE*, 8(2): e57011. Recuperado de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057011>
- Ghanim, M., Fatta-Hosseini, S., Levy, A., y Cilia, M. (2016). Morphological abnormalities and cell death in the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) midgut associated with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Nature*, Scientific Reports 6: 33418.
- Goldmann, A. (2017). Predators of Asian Citrus psyllid (*Diaphorina citri*) in Southern California. (Doctoral dissertation), University of California, Riverside, CA.
- Gottwald, T., da Graca, J. y Bassanezi, R. (2007). Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, Doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Gottwald, T. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 119-39.
- Gottwald, T., Graham, J., Ireby, M., McCollum, T., y Wood, B. (2012). Inconsequential effect of nutritional treatments on Huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection*, 36: 73–82.
- Grafton-Cardwell, E.E., Stelinski, L.L. y Stansly, P.A. (2013). Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58.1-630.
- Halbert, S.E. y Manjunath, K.L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: *Psyllidae*) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87: 330–353.
- Halbert, S. E., y Núñez, C.A. (2004). Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: *Psyllidae*) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist*, 87(3), 401-402.
- Halbert, S.E. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. *Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop 2005*, p. 50.

- Hoffman, M.T., Doud, M.S., Williams, L., Zhang, M., y Ding, F. (2013). Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*, 103: 15–22.
- Hall, D.G., Hentz, M.G., Meyer, J.S., Kriss, A.B., Gottwald, T.R. y Boucias, D.G. (2012). Observations in the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*) in a managed citrus grove. *Journal of the International Organization for Biological Control*, Doi: 10.1007/s10526-012-9448-0.
- Hartung, J. S., Paul, C., Achor, D. y Brlansky, R. H. (2010). Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’. *Phytopathology*, 100:756-762.
- Hilf, M.E., y Lewis, R.S. (2016). Transmission and propagation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ by grafting with individual citrus leaves. *Phytopathology*, 106(5), 452-458.
- Hilf, M.E., Sims, K. R., Folimonova, S. Y. y Achor, D. S. (2013). Visualization of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ cells in the vascular bundle of citrus seed coats with fluorescence *in situ* hybridization and transmission electron microscopy. *Phytopathology*, 103:545-554.
- Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J. M. y Garnier, M. (1999). Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of a ribosomal protein gene of the β operon. *Molecular and Cellular Probes*, 13:373-379.
- Hodges, A.W., y Spreen, T.H. (2012). Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07-2010/11. Food and Resources Economic Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 6 p.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2007). *Diaphorina citri* Kuwayama. Recuperado de: <http://www.ica.gov.co/getdoc/77e880b7-40d6-4144-a398e7dd3a855237/DIAPHORINA.aspx>
- Jagoueix, S., Bové, J.M. y Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3): 379-386.
- Johnson, E., Bright, D.B. y Graham, J.H. (2012). Early root infection and damage in citrus huanglongbing disease development. *Oral Technical Session: Liberibacter Biology*, University of Florida, Lake Alfred, Florida, U.S.A.
- Jhonson, E.G., Wu, J., Bright, D.B. y Graham, J.H. (2014). Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but no phloem plugging with roots loss on huanglongbing affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology*, 63(2), 290-298.

- Lee, J., Halbert S., Dawson W., Robertson C. Keesling J. y Singer, B. (2015). Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. *Plant Biology*, 112(24): 7605-7610.
- Li, W., Hartung, J. y Levy, L. (2006). 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., Hartung, J. S., y Levy, L. (2007). Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “*Candidatus Liberibacter* species” associated with citrus huanglongbing. *Plant Disease*, 91(1), 51-58.
- Li, W., Levy, L. y Hartung, J. (2009). Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology*, 99: 139-144.
- Li, W., Li, D., Twieg, E., Hartung, J.S. y Levy, L. (2008). Optimized quantification of un-culturable ‘*Candidatus Liberibacter* spp. In host plants using real-time PCR. *Plant Disease*, 92:854-861.
- Lin, K.H. (1956). Observations on yellow shoots of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2: 1-42.
- Lu, L., Cheng, B., Yao, J., Peng, A., Du, D., Fan, G., Hu, X., Zhang, L. y Chen, G. (2013). A new diagnostic system for detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection in *Citrus*. *Plant Disease*, 97: 1295-1300.
- Lu, H., Zhang, C., Albrecht, U., Schimizu, R., Wang, G., y Bowman, K.D. (2013). Overexpression of a citrus NDR1 ortholog increases disease resistance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-10.
- Manjunath, K.L., Halbert, S.E., Ramadugu, C., Webb, S. y 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.
- Manjunath, K.L., Ramadugu, C., Majil, V.M., Williams, S., Irely, M. y Lee, R.F. (2010). First report of the citrus huanglongbing associated bacterium ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from sweet orange, Mexican lime, and Asian citrus psyllid in Belize. *Plant Disease*, 94(6): 781.1.
- Martínez, Y., Llauger, R., Batista, L., Luis, M., Iglesia, A., Collazo, C., Peña, I., Casín, J.C., Cueto, J., y Tablada, L.M. (2009). First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with huanglongbing in Cuba. *Plant Pathology*, 58(2), 389.
- Matos, L., Hilf, M.E. y Camejo, J. (2009). First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with Citrus huanglongbing in the Dominican Republic. *Plant Disease*, 93(6), 668.

- Matos, L.A., Hilf, M.E., Chen, J. y Folomonova, S.Y. (2013). Validation of ‘Variable Number of Tandem Repeat’-Based Approach for Examination of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Diversity and Its Applications for the Analysis of the Pathogen Populations in the Areas of Recent Introduction. *PLoS ONE*, 8(11): e78994.
- McCollum, G., Hilf, M., Irey, M., Luo, W. y Gottwald, T. (2016). Susceptibility of sixteen *Citrus* genotypes to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Plant Disease*, 100: 1080-1086.
- Michaud, J. P. (2002). Biological control of Asian Citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: preliminary report. *Entomological News*, 113(3): 216-222.
- Michaud, J. P. (2004). Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological control*, 29(2), 260-269.
- Mirmajlessi, S.M., Loit, E., Mand, M. y Mansouripour, S.M. (2015). Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis – a Review. *Plant Protection Science*, 51(4): 177–190.
- Molina-Bravo, R., Stephens-Cárdenas, S.A., Hilje-Rodríguez, I., Blanco-Vargas, M., Villalobos-Navarro, D., Gatjens-Boniche, O., Moreira-Carmona, L. y Villalobos-Muller, W. (2015). Citrus Huanglongbing Associated with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Present in the Northern Region of Costa Rica but Has Not Been Detected in Other Citrus-Growing Areas. *Plant Disease*, 99(12), 1855.
- Morgan, J. K., Zhou, L., Li, W., Shatters, R. G., Keremane, M., y Duan, Y. P. (2012). Improved real-time PCR detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes*, 26(2), 90-98.
- National Research Council of the National Academies. (2010). Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening, Washington, D.C: National Academies Press, 4 p.
- Neupane, D., Moss, C. y van Bruggen, A.H.C. (2016). Estimating Citrus production loss due to Citrus huanglongbing in Florida. Department of Plant Pathology and Emerging Pathogen Institute, University of Florida. *Southern Agricultural Economics Association*, Annual Meeting, San Antonio, Texas, February, 6-9, 2016.
- North American Plant Protection Organization’s (NAPPO). (2010a). Phytosanitary alert system: detection of huanglongbing (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’) in the municipality of Tecoman, Colima, Mexico. Recuperado de: <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=427>
- North American Plant Protection Organization’s (NAPPO). (2010b). Phytosanitary alert system: confirmation of Citrus greening (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’) in the Virgin Islands. Recuperado de:

<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=430>

- Pelz-Stelinski, K.S., Brlansky, R.H., Ebert, T.A. y Rogers, M.E. (2010). Transmission parameters for 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Entomological Society of America*, 103(5): 1531-1541.
- Pluke, R.W., Qureshi, J.A., y Stansly, P.A. (2008). Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist*, 91(1), 36-43.
- Qureshi, J.A., Kostyk, B.C. y Stansly, P.A. (2011). Effectiveness of selective insecticides to control Asian citrus psyllid and citrus leafminer during leaf flushing. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 124: 85-89.
- Qureshi, J.A., Kostyk, B.C. y Stansly, P.A. (2014). Insecticidal suppression of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of Huanglongbing pathogens. *PLoS ONE*, 9 (12), e112331.
- Qureshi, J. A., y Stansly, P. A. (2010). *Tamarixia radiata* Waterston [Hymenoptera: Eulophidae], an ectoparasitoid of *Diaphorina citri* Kuwayama [Hemiptera: Psyllidae]. Disponible en: <https://biocontrol.entomology.cornell.edu/parasitoids/Tamarixia.php>
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., y Lee, R. F. (2016). Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. *Plant Disease*, 100(9), 1858-1869.
- Rawat, N., Kumar, B., Albrecht, U., Du, D., Huang, M., Yu, Q., ... y Deng, Z. (2017). Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticulture research*, 4, 17064.
- Richardson, M. y Hall, D. (2013). Resistance of *Poncirus* and *Citrus* × *Poncirus* germplasm to the Asian citrus psyllid. *Crop Science*, 53: 183-188.
- Roberts, P. D., Rouse, R. E., Teems, S. S., Sytsma, R. E., y Shobert, Z. (2014). The effect of nutritional spray programs applied to mitigate symptoms of Huanglongbing on fruit drop caused by HLB and citrus canker on 'Hamlin' orange trees. 3rd International Research Conference on Huanglongbing - IRCHLB III. *Journal of Citrus Pathology*, 1. p. 204.
- Roose, M.L. (2014). Rootstocks. En Ferguson, L. y Grafton-Cardwell, E. (editores), *Citrus Production Manual* (p. 95-105). Richmond, California: The Regents of University of California.
- Rouse, B., Roberts, P., Ireby, M. I. K. E., Boyd, M. A. U. R. Y., y Willis, T. (2010). Monitoring trees infected with Huanglongbing in a commercial grove receiving nutritional/SAR foliar sprays

in southwest Florida. In *Proceedings of The Florida State Horticultural Society*, 123, p. 118-120.

- Sauer, A. V., Zanutto, C. A., Nocchi, P. T. R., Machado, M. A., Bock, C. H., y Nunes, W. M. (2015). Seasonal variation in populations of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus trees in Paraná state, Brazil. *Plant Disease*, 99(8), 1125-1132.
- Singerman, A. y Useche, P. (2015). Impact of citrus greening on *Citrus* operations in Florida. University of Florida. Recuperado de: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FE/FE98300.pdf>
- Slinski, S. (2016). Evaluation of HLB symptoms. *Citrus Industry*, 12 p.
- Stover, E. D., y McCollum, G. (2011). Incidence and severity of huanglongbing and *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer among field-infected citrus cultivars. *HortScience*, 46(10), 1344-1348.
- Stover, E., McCollum, G., Ramos, J. y Shatters, R.G., Jr. (2014). Growth, health and *Liberibacter asiaticus* titer in diverse *Citrus* scion on mandarin versus trifoliolate hybrid rootstock in a field planting with severe huanglongbing. *Proceedings of The Florida State Horticultural Society*, 127: 53-59.
- Teixeira, D.C., Danet, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., Junior, W.C.J., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., y Bové, J.M. (2005). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and cellular probes*, 19(3), 173-179. Doi: [10.1016/j.mcp.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.11.002)
- Tsai, C.H., Hung, T.H. y Su, H.J. (2013). An integrated management of Citrus Huanglongbing in Taiwan. *Proceedings of the 2013 International Symposium on Insect Vector and Insect-Borne Diseases*, 193-210.
- Tyler, H.L., Roesch, L.F.W., Gowda, S., Dawson, W.O. y Triplett, E.W. (2009). Confirmation of the sequence of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in huanglongbing-infected *Citrus* phloem using a metagenomic approach. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22(12), 1624-1634.
- Ukuda-Hosokawa, R., Sadoyama, Y., Kishaba, M., Kuriwada, T., Anbutsu, H. y Fukatsu, T. (2015). Infection Density Dynamics of the Citrus Greening Bacterium 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in Field Populations of the Psyllid *Diaphorina citri* and Its Relevance to the Efficiency of Pathogen Transmission to *Citrus* Plants. *Applied Environmental Microbiology*, 81(11): 3728–3736.
- United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine program (PPQ), Center for Plant Health Science and Technology (CPHST). (2009). Work Instructions Plant sample extraction for use in

Citrus Greening or HLB (Huanglongbing) Molecular diagnosis Assays. *National Plant Germplasm and Quarantine Laboratory*, 7 p.

United States Department of Agriculture – Agriculture Research Station (USDA-ARS). (2010). Notice to fruit growers and nurserymen relative to the naming and release of the US-942 Citrus rootstock. 9 p.

United States Department of Agriculture – Agriculture Research Station (USDA-ARS). (2011). Identifying trees infected with citrus greening. News Article. United States Department of Agriculture - Agricultural Research service, USA: USDA-ARS. Recuperado de: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug11/trees0811.htm>

United States Department of Agriculture – Agricultural Marketing Service. (2014). *Commodity Specification*. Bottled Fruit Juices. 26 p.

United States Department of Agriculture/Foreign Agricultural Service (USDA/FAS). (2015). *Citrus: World markets and Trade*. Recuperado de: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/citruswm/2010s/2015/citruswm-01-22-2015.pdf>

United States Department of Agriculture (USDA). (2016). *Citrus: World markets and trade*. Foreign Agricultural Service, 9 p. Recuperado de: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>

Yang, Ch., Powell C., Duan Y., Shatters R. y Zhang M. (2015). Antimicrobial nanoemulsion formulation with improved penetration of foliar spray through citrus leaf cuticles to control Citrus Huanglongbing. *PLoS ONE*, 10(7): e0133826. Recuperado de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133826>

Yang, C., Zhong, Y., Powell, C. A., Doud, M. S., Duan, Y., Huang, Y., y Zhang, M. (2018). Antimicrobial Compounds Effective against *Candidatus Liberibacter asiaticus* Discovered via Graft-based Assay in *Citrus*. *Scientific reports*, 8(1), 17288.

Zhang, M., Guo, Y., Powell, C.A., Doud, M.S., Yang, C. y Duan, Y. (2014). Effective Antibiotics against ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in HLB-Affected *Citrus* Plants Identified via the Graft-Based Evaluation. *PLoS ONE*, 9(11): e111032.

Zhang, M., Powell, C.A., Guo, Y., Benyon, L. y Duan, Y. (2013). Characterization of the microbial community structure in ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’-infected citrus plants treated with antibiotics in the field. *BMC Microbiology*, 13:112.

Zhou, L., Powell, C. A., Hoffman, M. T., Li, W., Fan, G., Liu, B., ... y Duan, Y. (2011). Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, revealed by hyper variable prophage genes with intragenic tandem repeats. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-05111.

APÉNDICES

Apéndice 1. Descripción de patrones utilizados en el experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Características | Genotipos | | |
|--|--|---|---|
| | ‘C-35 citrange’ | Mandarina ‘Cleopatra’ | ‘US-942’ |
| Nombre científico | Híbrido: <i>Citrus</i> × <i>sinensis</i> (L.) Osbeck ‘Ruby blood’ × <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf. | <i>Citrus</i> <i>reticulata</i> Blanco | Híbrido: <i>Citrus</i> <i>reticulata</i> Blanco × <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf. |
| Origen | U.S.A. | India | U.S.A. |
| Año de liberación | 1987 | Aprox. 1880s Reintroducción: 1961 | 2010 |
| Tamaño del árbol | Intermedio ^A | Grande ^A | Compacto |
| Producción por árbol | Intermedio a alto ^A | Bajo a intermedio ^A | Buena ^{BC} |
| Calidad de fruta | Buena ^A | Intermedio ^A | Buena ^{BC} |
| <i>Citrus tristeza virus</i> | Tolerante ^A | Tolerante ^A | Tolerante Resistente ^C |
| Reacción a <i>Phytophthora</i> | Tolerante ^A | Susceptible ^A | Tolerante Resistente ^C |
| Reacción a nemátodos | Tolerante ^A | Susceptible ^A | |
| Respuesta a salinidad | Pobre ^A | Buena ^A | |
| Desarrollo en suelos con drenaje pobre | Intermedio ^A | Pobre ^A | |
| Tolerancia a heladas | Intermedio ^A | Intermedio ^A | |

Fuente: A: Roose (2014); B: Bowman et al. (2016a); C: USDA (2010).

Apéndice 2. Información disponible sobre características de frutos de genotipos de *C. ×sinensis* de la colección de cítricos de la EEA Adjuntas.

| Genotipo | Origen | Número Semillas | Época cosecha | Forma de fruto | Tamaño de fruto | Color | Peso (oz) | Textura | Grados Brix* |
|------------------|-----------------|-------------------|---------------|---------------------|--------------------|------------------|--------------|--------------------|--------------|
| Padilla | Selección de PR | 0 | Nov-Dic | Esférico | Pequeño | Anaranjado | | Lisa | ND |
| Helada | Florida | 15-20 | Dic-Feb | Esférico Globoso | Mediano/ Grande | Anaranjado | 9.1-10 | Lisa | 11.4 |
| Pietri 334 | | 0 (en general) | Dic-Feb | Globoso | Mediano/ Grande | Anaranjado claro | 10.5 - 11 | Lisa | 10.5 |
| Frontón | Puerto Rico | 2-4 | Feb-Mar | Globoso Alargado | Grande | Anaranjado claro | 15.1 | Rugosa | 11.9 |
| 'Lares seedless' | Puerto Rico | 0 | Ene-Feb | Esférico | Mediano/ Grande | Anaranjado | 7.3-7.5 | Rugosa | 12.4 |
| 'Rico 1-28' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Rico 1-374' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Rico 3-80' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Rico 4-45' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Rico 5-50' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Rico 7-56' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Rico 2-376' | Puerto Rico | - | ND | Esférico | ND | ND | ND | ND | ND |
| 'Salustiana' | España | 0 | Dic-Feb | Esférico Subgloboso | Mediano Grande | Anaranjado | - | Ligeramente rugosa | |

* Gramos de azúcar por 100 mL de jugo.

Los genotipos Rico fueron seleccionados por el Sr. horticulturista Rico Ballester entre la década de 1960 y 1970 (comunicación personal Sr. González).

Apéndice 3. Árboles de genotipos de *C. ×sinensis* evaluados en la colección de cítricos de la EEA Adjuntas.

| # árbol | Genotipo | # árbol | Genotipo | # árbol | Genotipo | # árbol | Genotipo |
|---------|--------------|---------|---------------|---------|--------------|---------|---------------|
| 1 | 'Rico 3-80' | 14 | 'Rico 5-50' | 27 | 'Padilla' | 40 | 'Rico 1-28' |
| 2 | 'Padilla' | 15 | 'Salustiana' | 28 | 'Helada' | 41 | 'Rico 4-45' |
| 3 | 'Rico 5-50' | 16 | 'Pietri 3-34' | 29 | 'Salustiana' | 42 | 'Frontón' |
| 4 | 'Padilla' | 17 | 'Pietri 3-34' | 30 | 'Rico 2-376' | 43 | 'Lares 82' |
| 5 | 'Rico 4-45' | 18 | 'Salustiana' | 31 | 'Rico 2-376' | 44 | 'Pietri 3-34' |
| 6 | 'Lares 82' | 19 | 'Rico 3-80' | 32 | 'Salustiana' | 45 | 'Pietri 3-34' |
| 7 | 'Helada' | 20 | 'Padilla' | 33 | 'Helada' | 46 | 'Lares 82' |
| 8 | 'Rico 1-374' | 21 | 'Rico 2-376' | 34 | 'Frontón' | 47 | 'Frontón' |
| 9 | 'Rico 1-374' | 22 | 'Rico 2-756' | 35 | 'Rico 1-28' | 48 | 'Rico 4-45' |
| 10 | 'Rico 1-374' | 23 | 'Rico 1-374' | 36 | 'Lares 82' | 49 | 'Rico 1-28' |
| 11 | 'Rico 1-28' | 24 | 'Rico 1-374' | 37 | 'Lares 82' | 50 | 'Pietri 3-34' |
| 12 | 'Lares 82' | 25 | 'Rico 1-374' | 38 | 'Rico 1-28' | 51 | 'Salustiana' |
| 13 | 'Rico 7-56' | 26 | 'Rico 2-376' | 39 | 'Frontón' | | |

Apéndice 4. Determinación de parcelas con árboles infectados por ‘*Ca. L. asiaticus*’ en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela a los 14 meses del trasplante.

| Tratamientos | Bloques de repeticiones | | | |
|--------------|-------------------------|----------|----------|----------|
| | I | II | III | IV |
| C-35-1 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| C-35-2 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| C-35-3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-35-4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-35-5 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-35-6 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-35-7 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-35-8 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Cleopatra-1 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Cleopatra-2 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Cleopatra-3 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| Cleopatra-4 | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| Cleopatra-5 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| Cleopatra-6 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| Cleopatra-7 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Cleopatra-8 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-1 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-2 | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-4 | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-5 | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-6 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-7 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| US-942-8 | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |

APÉNDICE 5. Efecto principal genotipo en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Genotipos | Geno 1 | Geno 2 | Geno 3 | Geno 4 | Geno 5 | Geno 6 | Geno 7 | Geno 8 | Promedio |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| Efec. Genotipo 1 | | 0.4 | 0.2 | -1.1 | -0.1 | 0.4 | 0.2 | 0.0 | -0.01 |
| Efec. Genotipo 2 | -0.4 | | -0.2 | -1.5 | -0.6 | 0.0 | -0.2 | -0.4 | -0.48 |
| Efec. Genotipo 3 | -0.2 | 0.2 | | -1.3 | -0.3 | 0.2 | 0.0 | -0.2 | -0.20 |
| Efec. Genotipo 4 | 1.1 | 1.5 | 1.3 | | 1.0 | 1.5 | 1.3 | 1.1 | 1.24 |
| Efec. Genotipo 5 | 0.1 | 0.6 | 0.3 | -1.0 | | 0.5 | 0.4 | 0.1 | 0.15 |
| Efec. Genotipo 6 | -0.4 | 0.0 | -0.2 | -1.5 | -0.5 | | -0.2 | -0.4 | -0.43 |
| Efec. Genotipo 7 | -0.2 | 0.2 | 0.0 | -1.3 | -0.4 | 0.2 | | -0.2 | -0.25 |
| Efec. Genotipo 8 | 0.0 | 0.4 | 0.2 | -1.1 | -0.1 | 0.4 | 0.2 | | -0.01 |

APÉNDICE 6. Efecto principal patrón en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Patrones | US-942 | Cleopatra | C-35 Citrange |
|-----------------|--------|-----------|---------------|
| Efec. US-942 | | -0.29 | -0.97 |
| Efec. Cleopatra | 0.29 | | -0.68 |
| Efec. C-35 | 0.97 | 0.68 | |

APÉNDICE 7. Efectos simples genotipos en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento de *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Genotipos | C-35 Citrange | | | | | | | |
|-----------------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Geno 1 | Geno 2 | Geno 3 | Geno 4 | Geno 5 | Geno 6 | Geno 7 | Geno 8 |
| Efectos simple Geno 1 | | 0.21 | 0.42 | -0.58 | -0.37 | 0.13 | 0.04 | 0.33 |
| Efectos simple Geno 2 | -0.21 | | 0.21 | -0.79 | -0.58 | -0.08 | -0.17 | 0.13 |
| Efectos simple Geno 3 | -0.42 | -0.21 | | -1.00 | -0.79 | -0.29 | -0.38 | -0.08 |
| Efectos simple Geno 4 | 0.58 | 0.79 | 1.00 | | 0.21 | 0.71 | 0.63 | 0.92 |
| Efectos simple Geno 5 | 0.37 | 0.58 | 0.79 | -0.21 | | 0.50 | 0.42 | 0.71 |
| Efectos simple Geno 6 | -0.13 | 0.08 | 0.29 | -0.71 | -0.50 | | -0.08 | 0.21 |
| Efectos simple Geno 7 | -0.04 | 0.17 | 0.38 | -0.63 | -0.42 | 0.08 | | 0.29 |
| Efectos simple Geno 8 | -0.33 | -0.13 | 0.08 | -0.92 | -0.71 | -0.21 | -0.29 | |

| Genotipos | Cleopatra | | | | | | | |
|-----------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Geno 1 | Geno 2 | Geno 3 | Geno 4 | Geno 5 | Geno 6 | Geno 7 | Geno 8 |
| Efectos simple Geno 1 | | 1.04 | 0.04 | -1.29 | -0.15 | 1.13 | 0.13 | 0.04 |
| Efectos simple Geno 2 | -1.04 | | -1.00 | -2.33 | -1.20 | 0.08 | -0.92 | -1.00 |
| Efectos simple Geno 3 | -0.04 | 1.00 | | -1.33 | -0.20 | 1.08 | 0.08 | 0.00 |
| Efectos simple Geno 4 | 1.29 | 2.33 | 1.33 | | 1.14 | 2.42 | 1.42 | 1.33 |
| Efectos simple Geno 5 | 0.15 | 1.20 | 0.20 | -1.14 | | 1.28 | 0.28 | 0.20 |
| Efectos simple Geno 6 | -1.13 | -0.08 | -1.08 | -2.42 | -1.28 | | -1.00 | -1.08 |
| Efectos simple Geno 7 | -0.13 | 0.92 | -0.08 | -1.42 | -0.28 | 1.00 | | -0.08 |
| Efectos simple Geno 8 | -0.04 | 1.00 | 0.00 | -1.33 | -0.20 | 1.08 | 0.08 | |

| Genotipos | US-942 | | | | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Geno 1 | Geno 2 | Geno 3 | Geno 4 | Geno 5 | Geno 6 | Geno 7 | Geno 8 |
| Efectos simple Geno 1 | | -0.04 | 0.04 | -1.42 | 0.08 | -0.17 | 0.46 | -0.38 |
| Efectos simple Geno 2 | 0.04 | | 0.08 | -1.38 | 0.13 | -0.13 | 0.50 | -0.33 |
| Efectos simple Geno 3 | -0.04 | -0.08 | | -1.46 | 0.04 | -0.21 | 0.42 | -0.42 |
| Efectos simple Geno 4 | 1.42 | 1.38 | 1.46 | | 1.50 | 1.25 | 1.88 | 1.04 |
| Efectos simple Geno 5 | -0.08 | -0.13 | -0.04 | -1.50 | | -0.25 | 0.38 | -0.46 |
| Efectos simple Geno 6 | 0.17 | 0.13 | 0.21 | -1.25 | 0.25 | | 0.63 | -0.21 |
| Efectos simple Geno 7 | -0.46 | -0.50 | -0.42 | -1.88 | -0.38 | -0.63 | | -0.83 |
| Efectos simple Geno 8 | 0.38 | 0.33 | 0.42 | -1.04 | 0.46 | 0.21 | 0.83 | |

APÉNDICE 8. Efectos simples patrones en la quinta evaluación de severidad de HLB a los 35 meses del trasplante en experimento *C. reticulata* en el USDA/TARS, Isabela.

| Genotipo 1 | | | | Genotipo 5 | | | |
|----------------------|------|-----------|--------|----------------------|------|-----------|--------|
| | C-35 | Cleopatra | US-942 | | C-35 | Cleopatra | US-942 |
| Efecto simple C-35 | | 0.6 | 1.2 | Efecto simple C-35 | | 0.8 | 1.6 |
| Efecto Cleopatra | -0.6 | | 0.6 | Efecto Cleopatra | -0.8 | | 0.8 |
| Efecto simple US-942 | -1.2 | -0.6 | | Efecto simple US-942 | -1.6 | -0.8 | |
| Genotipo 2 | | | | Genotipo 6 | | | |
| | C-35 | Cleopatra | US-942 | | C-35 | Cleopatra | US-942 |
| Efecto simple C-35 | | 1.4 | 0.9 | Efecto simple C-35 | | 1.6 | 0.9 |
| Efecto Cleopatra | -1.4 | | -0.5 | Efecto Cleopatra | -1.6 | | -0.7 |
| Efecto simple US-942 | -0.9 | 0.5 | | Efecto simple US-942 | -0.9 | 0.7 | |
| Genotipo 3 | | | | Genotipo 7 | | | |
| | C-35 | Cleopatra | US-942 | | C-35 | Cleopatra | US-942 |
| Efecto simple C-35 | | 0.2 | 0.8 | Efecto simple C-35 | | 0.7 | 1.6 |
| Efecto Cleopatra | -0.2 | | 0.6 | Efecto Cleopatra | -0.7 | | 0.9 |
| Efecto simple US-942 | -0.8 | -0.6 | | Efecto simple US-942 | -1.6 | -0.9 | |
| Genotipo 4 | | | | Genotipo 8 | | | |
| | C-35 | Cleopatra | US-942 | | C-35 | Cleopatra | US-942 |
| Efecto simple C-35 | | -0.1 | 0.3 | Efecto simple C-35 | | 0.3 | 0.5 |
| Efecto Cleopatra | 0.1 | | 0.5 | Efecto Cleopatra | -0.3 | | 0.2 |
| Efecto simple US-942 | -0.3 | -0.5 | | Efecto simple US-942 | -0.5 | -0.2 | |