

# Diagnóstico y caracterización de la enfermedad huanglongbing de los cítricos para el establecimiento de su manejo en Cuba

## Autoría principal

Maritza Luis Pantoja<sup>1</sup>, Lester Hernández Rodríguez<sup>1</sup>, Cyrellys Collazo Cordero<sup>1</sup>, Inés Peña Bárzaga<sup>1</sup>, Victoria Zamora Rodríguez<sup>1</sup>, Daylé López Hernández<sup>2</sup>, Raixa Llauger Riverón<sup>1</sup>, Lochy Batista Le Riverend<sup>1</sup>.

## Otros autores

Caridad González Fernández<sup>1</sup>, Doris Hernández Espinosa<sup>1</sup>, Jorge Luis Rodríguez Tapia<sup>1</sup>, Juan Carlos Casín Fernández<sup>3</sup>.

## Colaboradores

Yamila Martínez Zubiaur<sup>4</sup>, Jazmin Núñez Luis<sup>1</sup>, Lumey Pérez Artiles<sup>1</sup>, Armelio Borroto<sup>2</sup>, Rolando Riaño<sup>5</sup>, José Piñeiro<sup>6</sup>, Diva do Carmo Teixeira<sup>7</sup>, Elaine Martins<sup>7</sup>, Elliot Kitajima<sup>8</sup>, Joseph Marie Bové<sup>9</sup>, Juliette Infante-Valdez Herrero<sup>1</sup>, Reinaldo Israel Cabrera<sup>1</sup>.

## Entidad ejecutora principal

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT)

## Entidades participantes

<sup>2</sup>Empresa Agroindustrial Ceballos, Ciego de Ávila

<sup>3</sup>Centro Nacional de Sanidad Vegetal.

<sup>4</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

<sup>5</sup>Empresa de Cítricos Victoria de Girón, Jagüey Grande, Matanzas

<sup>6</sup>Empresa Cítricos Ceiba, Artemisa

<sup>7</sup>Fundecitrus, Sao Paulo, Brasil.

<sup>8</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Sao Paulo, Brasil

<sup>9</sup>Institute National de la Recherche Agronomique, Francia.

## Autor para correspondencia

**Maritza Luis Pantoja.** IIFT, Ave 7ma, # 3005 e/ 30 y 32, Playa, La Habana, Cuba. Fax 24 67 94. bacteriologia@iift.cu.

## Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **MSc. Maritza Luis Pantoja** (20%): Diseño y coordinación general del trabajo. Realizó prospecciones, recolecta y procesamiento de muestras para la identificación de la bacteria. Evaluación y discusión de los resultados presentados en este trabajo. Autora principal de tres publicaciones y coautora de siete de las que avalan el presente trabajo. Divulgación de los principales resultados a nivel nacional e internacional. Tiene logros introducidos sobre el tema. Fue tutora de una tesis de grado del tema.
- ✓ **MSc. Lester Hernández Rodríguez** (12%): Trabajó en el análisis integral de todos los resultados. Coautor de una de las publicaciones que avalan el presente trabajo. Divulgación de los principales resultados a nivel nacional e internacional.
- ✓ **MSc. Cyrelis Collazo Cordero** (10%): Realizó prospecciones, recolecta y procesamiento de muestras para la identificación y caracterización molecular de la bacteria. Evaluación y discusión de los resultados presentados en este trabajo. Autora principal de dos publicaciones y coautora de cinco de las que avalan el presente trabajo. Divulgación de los

principales resultados a nivel nacional e internacional. Tiene logros introducidos sobre el tema. Fue autora de una tesis de maestría y tutora de una tesis de licenciatura del tema.

- ✓ **MSc. Ines Peña Bárzaga (10%):** Trabajó en las prospecciones, la descripción y determinación de síntomas de las plantas infectadas y la colecta de las muestras foliares. Coautora de seis de las publicaciones que avalan el presente trabajo. Divulgación de los principales resultados a nivel nacional e internacional. Tiene logros introducidos sobre el tema.
- ✓ **Ing. Victoria Zamora Rodríguez (8%):** Trabajó en las prospecciones y en el saneamiento de plantas infectadas con CLas a través de la técnica del microinjerto *in vitro* de ápices caulinares. Autora principal de una de las publicaciones que avalan el presente trabajo. Divulgación de los principales resultados a nivel nacional e internacional. Tiene un logro introducido sobre el tema.
- ✓ **MSc. Daylé López Hernández (8%):** Trabajó en las prospecciones, la descripción y determinación de síntomas de las plantas infectadas y la colecta de las muestras foliares. Coautora de cuatro de las publicaciones que avalan el presente trabajo. Divulgación de los principales resultados a nivel nacional e internacional. Tiene logros introducidos sobre el tema.
- ✓ **MSc. Raixa Llauger Riverón (6%):** Trabajó en la descripción y determinación de síntomas de las plantas infectadas y la colecta de las primeras muestras foliares. Trabajó en la secuenciación para la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Cuba. Autora de tres de las publicaciones que avalan el presente trabajo y coautora de cuatro publicaciones. Divulgación de los principales resultados a nivel nacional e internacional. Fue tutora de una de las maestrías discutidas.
- ✓ **Lochy Batista Le Riverend (6%):** Participó en las colectas iniciales de muestras. Colaboró en el análisis de la sintomatología característica de HLB en Cuba. Divulgó los resultados en varios talleres y eventos internacionales. Fue coautora de siete de las publicaciones que avalan la propuesta a premio.
- ✓ **Dra. Caridad González (5%):** Trabajó en las prospecciones, colectas de insectos vectores y procesamiento de datos en lo referente al vector *D. citri* presentado en este trabajo. Autora principal de cinco y coautora de cuatro publicaciones que avalan el presente trabajo. Divulgación de los resultados referentes al vector a nivel nacional e internacional. Tiene un logro introducido sobre el tema.
- ✓ **Ing. Doris Hernández (5%):** Trabajó en las prospecciones, colecta de insectos vectores y en los análisis de los resultados que se presentan en este trabajo. Es coautora de seis de las publicaciones que avalan este trabajo.
- ✓ **Tec. Jorge Luis Hernández Tapia (5%):** Trabajó en las prospecciones, colecta de insectos vectores y en los análisis de los resultados que se presentan en este trabajo. Es coautor de seis de las publicaciones que avalan este trabajo.
- ✓ **Ing. Juan Carlos Casin Fernández (5%):** Trabajó en las prospecciones y en las bases de datos generadas de todo el país, así como en la colecta de muestras foliares y elaboración de la estrategia de manejo. Coautor de cinco de las publicaciones que avalan el presente trabajo.

## Resumen

Huanglongbing (HLB) es la enfermedad más destructiva de los cítricos y está asociada a tres especies de *Candidatus Liberibacter* (L.) y dos fitoplasmas. La detección de HLB en Brasil y EUA a partir de 2004 y la presencia del insecto vector *Diaphorina citri* en Cuba desde 1999, motivaron el pesquiasaje de esta enfermedad en el país. En el año 2006 se observaron plantas con síntomas asociados a HLB en Cuba y se identificó la

presencia de *Ca. L. asiaticus* (CLas) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores rplA2/rplJ5 y OI1/OI2c/OA1. La secuenciación de tres fragmentos del ADNr de CLas aisladas en Cuba mostró un 100% de identidad nucleotídica con aislados de Brasil, Japón y EE.UU. Mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron microorganismos semejantes a *Ca. L.* en el floema de hojas sintomáticas. Se realizaron prospecciones que permitieron comprobar la presencia de plantas con síntomas asociados a HLB en todo el país, realizar su descripción en diferentes especies cítricas y determinar que la incidencia en las plantaciones varió entre 0,01% y 58,8%. La PCR dúplex (cebadores: GB1/GB3-rplA2/rplJ5) se optimizó para el diagnóstico simultáneo de las tres especies de *Ca. L.* y se determinó a CLas como única especie presente en Cuba.

La validación de la PCR anidada (cebadores: fD1/rP1-OI1/OI2c) para la detección de CLas mostró una sensibilidad diagnóstica elevada, que permitió su introducción en la certificación del material de propagación de cítricos. Se comprobó la utilidad de la tinción con yodo para el diagnóstico indirecto de HLB en prospecciones masivas. La técnica de saneamiento por microinjerto in vitro de ápices caulinares fue efectiva para la eliminación de CLas en plantas infectadas. Los estudios de la dinámica poblacional de *D. citri* y de los factores que influyen en la fluctuación de sus poblaciones en tres áreas cítricas, permitieron adecuar el monitoreo y control del vector. Se identificaron como enemigos naturales seis depredadores, un parasitoide y un hongo entomopatógeno, que controlan todos los estadios del vector. Se informó a *Triphasia trifolia* como hospedante de *D. citri*. A partir de los resultados de este trabajo y la experiencia internacional se estableció el manejo de la enfermedad HLB en Cuba basado en tres aspectos fundamentales: plantar las nuevas áreas de cítricos con material de propagación certificado producido en viveros protegidos, mantener el control de *D. citri* y reducir la fuente de inóculo mediante prospección y erradicación de las plantas con síntomas característicos de la enfermedad.

## **Comunicación Corta**

### **Introducción**

La enfermedad huanglongbing de los cítricos (HLB) es una de las principales limitantes de este cultivo distribuida ampliamente en todo el mundo (Bové, 2014; Iftikhar *et al.*, 2014).

La etiología de HLB se asoció a tres especies de  $\alpha$ -Proteobacterias del género *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (L.): *Ca. L. asiaticus* (CLas), *Ca. L. americanus* (CLam) y *Ca.*

*L. africanus* (CLaf) (Jagoueix *et al.*, 1994, Garnier *et al.*, 2000, Teixeira *et al.*, 2005a).

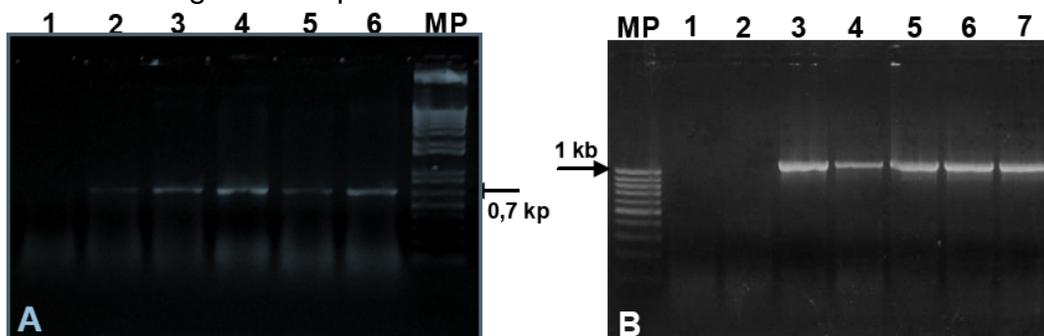
Además, se caracterizaron dos fitoplasmas en China y Brasil. (Teixeira *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2009). La transmisión natural ocurre a través los vectores *Trioza erytreae* Del Guercio, y *Diaphorina citri* Kuw (Hemiptera: *Liviidae*). (Yamamoto *et al.*, 2006). Las bacterias también se transmiten a través de injerto (Lopes *et al.*, 2009), mientras que la transmisión por semillas no se ha demostrado (Hartung *et al.*, 2010).

La producción de cítricos en Cuba disminuyó desde un millón hasta solo 122 700 toneladas en el período de 1980 al 2013. Entre las causas de esta reducción se encuentra la enfermedad HLB, la cual se informó en el año 2007 (Martínez *et al.*, 2009; Luis *et al.*, 2008, 2009). A partir de la detección de síntomas de HLB en el país, se

desarrollaron varios proyectos de investigación cuyos resultados conformaron la propuesta a Premio Academia de Ciencias de Cuba 2014: “*Diagnóstico y caracterización de la enfermedad huanglongbing de los cítricos para el establecimiento de su manejo en Cuba*”. Los resultados obtenidos se socializaron a partir de la obtención de cuatro Premios Ramales del Ministerio de la Agricultura, publicaciones nacionales e internacionales, una tesis de licenciatura, cuatro de maestría y presentaciones en eventos, nacionales e internacionales. Los objetivos que abarcaron este trabajo fueron: (i) identificar morfológica y molecularmente el agente causal del HLB en Cuba, (ii) determinar las peculiaridades de los síntomas asociados a HLB, (iii) optimizar métodos de diagnóstico de HLB, (iv) determinar el comportamiento de *D. citri* en las condiciones de Cuba, (v) comprobar la efectividad de la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares para el saneamiento de plantas infectadas con CLas en Cuba, (vi) proponer un programa primario de manejo de HLB en Cuba.

#### 4.2 Resultados y discusión

La detección de *Ca. L.* se realizó con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando tres combinaciones de cebadores diferentes: rplA2/rplJ5; OI1/OA1/OI2c y GB1/GB3 (Hocquellet *et al.*, 1999a; Jagoueix *et al.*, 1994, Teixeira *et al.*, 2005). Los productos de la PCR con el uso de los cebadores rplA2/rplJ5 mostraron una talla aproximada de 703 pb (Figura 1 A), mientras que en la PCR con los iniciadores OI1/OA1/OI2c se obtuvieron bandas con peso aproximado de 1160 pb (Figura 1 B). Los pesos de los fragmentos amplificados mediante ambas metodologías coinciden con los esperados para la especie CLas (Hocquellet *et al.*, 1999a; Jagoueix *et al.*, 1996). Además, los productos de la digestión con la enzima *Xba* I de los amplicones OI1/OA1/OI2c mostraron el patrón característico de CLas (640 pb y 520 pb) (resultados no mostrados) (Jagoueix *et al.*, 1996). En la PCR con los GB1/GB3 no se amplificó producto alguno (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos en los tres ensayos de PCR sugirieron la presencia de CLas en las muestras analizadas.

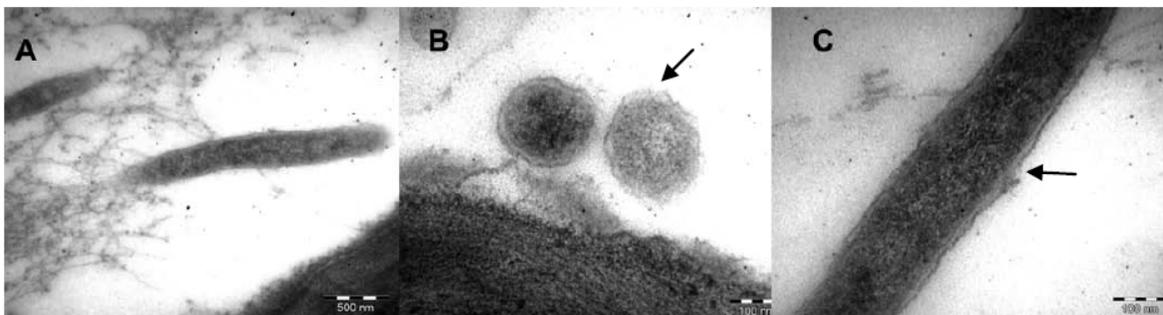


**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la PCR a partir de muestras de ADN de cítricos colectadas en La Habana con los cebadores rplA2/rplJ5 (A) y OI1/OA1/OI2c (B). Carriles (A) 1: ADN de una planta asintomática; 2-5: ADN de plantas de cítricos con síntomas de moteado; 6: ADN de hojas infectadas con CLas de Brasil. Carriles (B): 1- agua, 2- ADN de planta asintomática, 3- ADN de CLas de Brasil, 4- ADN de CLas de Brasil, 5, 6 y 7- muestras de ADN de plantas de cítricos sintomáticas provenientes de La Habana. MP marcador de peso molecular (A): 1 kb ladder (Promega) y (B): 100 pb (Promega).

El diagnóstico mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizó en muestras de hojas de árboles de cítricos de pummelo, naranjo agrio y naranjo dulce, de

la provincia de La Habana. Estas plantas mostraron síntomas de moteado asimétrico difuso y nervadura con textura corchosa, y resultaron positivas por PCR para la detección de CLas. Los cortes se examinaron bajo un microscopio electrónico Zeiss EM 900 (Alemania). En las secciones de los vasos cribosos del floema se observaron microorganismos baciliformes de aproximadamente 150 nm de ancho y entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 2 A y B). La morfología de los microorganismos fue elongada con extremos romos, o circular, en dependencia de su posición respecto al corte de los vasos conductores. La pared celular bacteriana se observó como una capa electrónica rodeando a la célula (Figura 2 C). Estas características morfológicas coincidieron con las descritas por otros autores para bacterias del género *Ca. L. spp.* (Garnier, *et al.*, 1977, 1984; Tanaka *et al.*, 2007).

La evidencia definitiva de la presencia de CLas en Cuba se obtuvo mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR. Los amplicones *rplA2/rplJ5*, OI1/OA1/OI2C y OI2/23S1 se purificaron con el juego de reactivos PCR Wizard PCR preps DNA purification system, y se clonaron en el vector pGEM-T easy, siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Promega Corporation, Madison, EE.UU.). La secuenciación se realizó mediante el servicio de la "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Esalq - Departamento de Ciências Biológicas - Universidade São Paulo". Las secuencias de los tres fragmentos secuenciados de los aislados cubanos analizados se publicaron en GenBank con números de acceso: FJ394022 (*rplA2/rplJ5*), FJ544941 (OI1/OA1/OI2C) y FJ544942 (OI2/23S1) (Anexo 1). Estos fragmentos compartieron un 100% de homología con las secuencias correspondientes de CLas de Brasil (DQ471904), Japón (AY342001) y EE.UU. (FJ263697).



**Figura 2.** Microfotografías tomadas a través de microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de hojas de *Citrus grandis* con síntomas de moteado asimétrico. Microorganismos con morfología elongada (A) y circular (B), presentes en los vasos cribosos del floema. Corte longitudinal (C). La pared celular se señala con flechas (B y C).

El análisis en conjunto de las siguientes evidencias: (i) amplificación de fragmentos esperados en la detección de CLas en los ensayos de PCR con el uso de los cebadores específicos, (ii) evidencias positivas de la presencia de bacterias del género *Ca. L.* mediante MET e (iii) identidad nucleotídica de un 100% con los aislados de CLas de Brasil, Japón y EUA; permitió informar la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* asociado a síntomas de HLB en Cuba (Martínez *et al.*, 2009; Luis *et al.*, 2008, 2009).

Con el objetivo de caracterizar los síntomas asociados a HLB y la distribución de las plantas infectadas en Cuba, se inspeccionaron plantaciones de las empresas de cítricos del país. Se incluyeron además, jardines y patios de áreas urbanas y

plantaciones del sector privado. Se observó la sintomatología asociada a HLB en todos los cultivares comerciales analizados tanto en plantaciones jóvenes como adultas. Los síntomas foliares observados coincidieron con los descritos por otros investigadores (Bové, 2008), y se comprobó la presencia de la especie CLas asociada a HLB con la aplicación de la PCR a muestras de cada planta prospectada.

Los síntomas más característicos fueron los brotes cloróticos y el moteado asimétrico difuso del limbo que se encontraron en todas las áreas inspeccionadas. Las hojas afectadas mostraron una textura coriácea y la nervadura engrosada o corchosa. También se observaron frutos deformados y de pequeño tamaño, cuyos síntomas han sido descritos previamente como característicos de HLB (da Graça, 1991). Teniendo en cuenta la descripción cualitativa de los síntomas foliares en las especies cítricas analizadas, se clasificaron en seis grupos y se elaboró un laminario explicativo de las peculiaridades del moteado asimétrico en los diferentes grupos (Anexo 2). Se encontraron valores de incidencia de la enfermedad que variaron desde 0,01 hasta 58,8%.

Para la inclusión de metodologías de diagnóstico de *Ca. L.* en las prospecciones realizadas se optimizaron la PCR dúplex y PCR anidada. La PCR dúplex permite la detección diferencial y simultánea de las tres especies de *Ca. L.* asociadas a la enfermedad HLB con el uso de los cebadores rplA2/rplJ5 (Hocquellet *et al.*, 1999a) y GB1/GB3 (Teixeira *et al.*, 2008b). Esto permitió hacer un pesquisaje en todo el país con el objetivo de corroborar si CLas era la única especie circulante en Cuba. Por otro lado, la PCR anidada al combinar dos reacciones de amplificación implica un aumento de la sensibilidad analítica del método lo que permite el pesquisaje en regiones donde la prevalencia de la enfermedad es baja (Teixeira *et al.*, 2008b; Wen *et al.*, 2009).

Para la optimización de las dos metodologías de PCR se variaron las condiciones de reacción paso a paso, hasta determinar las concentraciones y variables adecuadas. Las condiciones finales de reacción de la PCR dúplex optimizada fueron: 40 µL de reacción conteniendo tampón de PCR a 1X, 150 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada uno de los cebadores: rplA2, rplJ5, GB1 y GB3, 1U de Taq DNA polimerasa, 1 µL de extracto de ADN. El programa final de reacción fue: 94°C por 3 min, 38 ciclos de 94°C por 30 seg, 62°C por 45 seg y 72°C por un min, seguido de de 5 min a 72 °C. La metodología mostró un límite de detección que varió de 10<sup>1</sup> y 10<sup>-2</sup> ng/µL, en dependencia de la cantidad de bacterias presentes en el tejido infectado. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores utilizando la PCR convencional (Teixeira *et al.*, 2008b, Deng *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2006). El análisis de 1423 muestras representativas de todo el país colectadas durante el periodo 2006-2012, mediante la PCR dúplex permitió afirmar, que la especie de *Ca. L.* circulante en Cuba es CLas.

Las condiciones finales optimizadas de la PCR anidada incluyeron: para la primera reacción, 25 µL de reacción conteniendo tampón de PCR a 1X, 150 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada uno de los cebadores: fd1/rp1, 1 U de Taq DNA polimerasa y 1 µL de extracto de ADN. Para la segunda reacción de PCR, 25 µL de reacción conteniendo tampón de PCR a 1X, 150 µM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada uno de los cebadores: OI1/OI2c, 1 U de Taq DNA polimerasa y 1 µL de una dilución 1/5 del producto de amplificación de la primera reacción. El programa final

para la primera reacción fue: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 90 seg, y una extensión final de 7 min, a 72 °C. El programa final para la segunda reacción fue: 38 ciclos de 94°C por 40 seg, 62°C por 40 seg y 72°C por 50 seg. Los parámetros de desempeño de la PCR anidada se evaluaron con el análisis de una población de 182 controles: 106 positivos y 76 negativos (Tabla 1). Se calcularon los parámetros de desempeño según las fórmulas de Jacobson (1996), Altman y Bland (1994 a y b), Deeks y Altman (2004). Los intervalos de confianza para los parámetros estimados fueron calculados usando la aproximación del error estándar para las proporciones de las distribuciones binomiales (Gardner y Altman, 1989). Los resultados mostraron una alta eficacia de la PCR anidada para la detección de la bacteria a partir de muestras con el síntoma típico de moteado asimétrico difuso. La alta especificidad (97,6%±0,0114) y sensibilidad (75,4%±0,0319) diagnóstica del método, así como la precisión (84,61%±0,0319) y los valores de tasas de falsos positivos y negativos (2,6%±0,0119 y 24,5%±0,0319, respectivamente), están en correspondencia con lo obtenido en trabajos anteriores (Teixeira *et al.*, 2008a).

**Tabla 1.** Resultados de la evaluación de la población de controles infectados y no infectados a través de la PCR anidada.

Resultados PCR anidada	Estado sanitario		Total
	Infectados	No infectados	
Positivos	80	2	82
Negativos	26	74	100
<b>Total</b>	106	76	182

Los parámetros obtenidos en la evaluación de la PCR anidada permitieron implementar este método en los protocolos de diagnóstico del Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Cítricos, y hasta el momento se certificó un total de 2178 plantas. Es por esto que se recomendó la aplicación de la PCR anidada para el pesquijaje de rutina, principalmente en muestras de vivero donde la prevalencia suele ser muy baja, y el uso de la PCR dúplex periódicamente para detectar la entrada de nuevas especies de *Ca. L.* al país. Además de estas metodologías de diagnóstico se evaluó la tinción con yodo propuesta por Onuki *et al.*, (2002). Se determinó la coincidencia de este método con la PCR convencional (Hocquellet *et al.*, 1999), en el análisis simultáneo por ambas técnicas de 758 muestras. Se obtuvo un 96% de correspondencia entre las dos metodologías y un 100% para el síntoma de moteado asimétrico, semejante al porcentaje obtenido por Onuki *et al.*, (2002). La alta coincidencia entre ambas técnicas permitió recomendar la tinción con yodo para el diagnóstico masivo en campos de fomento.

Para garantizar la producción de material certificado de cítricos y rescatar especies cítricas promisorias, se optimizó la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares (MIV), para la eliminación de CLas en plantas que presentan la enfermedad. Se escogieron como fuente de ápices plantas de cinco cultivares cítricos. Todas las plantas seleccionadas mostraron síntomas característicos de HLB y se comprobó la presencia de CLas con la PCR dúplex. Para el saneamiento se utilizó la técnica de MIV con las modificaciones establecidas en Cuba por González *et al.*, (1990) y Zamora *et al.*, (2006) y se ensayaron tres tamaños de ápice. Se realizaron 78 microinjertos de los cinco cultivares, tomando en cuenta los tres tamaños de ápices ensayados. Se obtuvieron 31 plantas saneadas y se conservaron en aislador por espacio de cuatro años, durante los cuales no se observaron síntomas de HLB. La eliminación de CLas

fue comprobada además por PCR anidada. Estas evidencias indicaron que la metodología de MIV fue exitosa en la eliminación de CLas a partir de los tejidos de los cultivares utilizados en el estudio.

Como parte de las investigaciones se estudió el comportamiento del vector *D. citri* en las localidades de Ceiba del Agua, Artemisa, Jagüey Grande, Matanzas y Ceballos, Ciego Ávila. Se evidenció la preferencia del insecto a distribuirse en el haz de la hoja de los brotes susceptibles, independiente del punto cardinal. Se realizaron inventarios de los enemigos naturales en cada una de las localidades en las que se encontraron seis depredadores, un parasitoide y un hongo entomopatógeno, los cuales controlaron todos los estadios de desarrollo de *D. citri*. Entre ellos se destacó *Tamarixia radiata* con un parasitismo que varió entre 30,72% y 97,26%. Se informó a *Triphasia trifolia* como hospedante de *D. citri*.

El trabajo desarrollado, en conjunción con el análisis de la información disponible de otros países, aportó los elementos para definir el programa primario de manejo de HLB en Cuba. La información que se generó contribuyó a perfeccionar la producción de material de propagación certificado de cítricos, base del programa de manejo con: (i) la detección y caracterización de un patógeno altamente destructivo para el cultivo, (ii) la implementación de metodologías para su diagnóstico, (iii) la determinación de los síntomas característicos asociados a la enfermedad en áreas de Cuba, (iv) el manejo del vector con el conocimiento de la dinámica poblacional, y (v) la optimización de un método para el saneamiento de plantas infectadas con CLas.

## Referencias

- [1] Martínez, Y., Llauger, R., Batista, L., Luis, M., Iglesia, A., Collazo, C., Peña, I., Casín, J.C., Cueto, J.R., Tablada, L.M. 2008. First report of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' associated with Huanglongbing in Cuba. *Plant Pathol.* 58: 389.
- [2] Llauger, R., Luis M., Collazo C., González C., Peña I., López D., Batista L. y Cueto J. 2008. Huanglongbing (ex greening) y su vector en la citricultura cubana. *LARANJA, Cordeirópolis* 29 (1-2): p.17-22.
- [3] Luis, M., Collazo, C., Llauger, R., Blanco, E., Peña I., López, D., González, C., Casín, J.C., Batista, L., Kitajima, E., Tanaka, F.A.O., Salaroli, R.B., Teixeira, D.C., Martins, E.C., Bové, J.M. 2009. Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *J. Plant Pathol.* 91 (3): 709-712.
- [4] Zamora V., Luis M., Peña I., Ferriol X. y Hernández L. 2014. Uso de la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares para la eliminación de 'Candidatus Liberibacter asiaticus' en cultivares de cítricos en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. En prensa, aceptado por la revista.
- [5] Luis, M., Collazo, C., Llauger, R., Peña, I., López, D., Blanco, E., Casín, J.C., Batista, L., Tanaka F.A.O., Salaroli, R. B., Martins, E., Teixeira, D., Kitajima, E., Ayres J., Bové, J. M., Perez, J.L. and Cueto, J.R. 2008. Huanglongbing in Cuban citriculture. Comunicación corta en Memorias del Congreso Internacional de citricultura. China, pp 50.

- [6] González C., Gómez M., Fernández M., Hernández D., Tapia J. L. R. and Batista L. 2010. *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae), behavior and natural enemies in Cuban citriculture. Proceedings. 17th Conference IOCV, p. 203- 205.
- [7] Collazo, C., Núñez, J., Luis, M. y Llauger, R. 2011. Optimización de una reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la enfermedad “huanglongbing” de los cítricos. Citrifrut. Vol. 28 (2): 19-3.
- [8] Luis M. 2014. Aplicación de la tinción con yodo para el diagnóstico indirecto de la enfermedad huanglongbing de los cítricos. Citrifrut vol. 31 (1):2014.

### **La novedad e impacto científico de los resultados**

En este trabajo se realizó por primera vez en Cuba la identificación y caracterización de *Candidatus Liberibacter asiaticus* como la única especie de la bacteria asociada a huanglongbing de los cítricos, mediante técnicas moleculares y microscópicas. Se optimizaron por primera vez dos metodologías basadas en la PCR para el diagnóstico molecular de los agentes causales de HLB: la PCR dúplex para el diagnóstico diferencial y simultáneo de las tres especies de *Ca. Liberibacter* y la PCR anidada para el diagnóstico de la especie *Candidatus Liberibacter asiaticus* en regiones con baja prevalencia de la enfermedad. Además se validó a través del cálculo de parámetros analíticos y de desempeño, la eficacia de la PCR anidada para ser usada en el diagnóstico molecular de la bacteria como parte de los protocolos de diagnóstico del Sistema de Producción de Material certificado de Cítricos de Cuba. Se describieron por primera vez, las peculiaridades de la expresión de síntomas de HLB en 20 cultivares cítricos de importancia en nuestro país, con lo que se confeccionó un laminario, para facilitar el rastreo que se lleva a cabo en las empresas citricolas. Se realizaron estudios de caracterización morfológica del vector, de su comportamiento y de los factores que influyen en la fluctuación de sus poblaciones, así como el inventario de sus enemigos naturales en las condiciones de Cuba. Se informó por primera vez en el mundo a *Triphasia trifolia* como hospedante de *D. citri*. Se optimizó la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares para el saneamiento de plantas infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Se aplicó esta metodología por primera vez en Cuba para el saneamiento de HLB que permitió el rescate de cultivares de valioso interés comercial. Considerando todos estos resultados se implementó la estrategia de manejo de la enfermedad en Cuba.

### **Impacto social**

El trabajo tuvo un impacto social directo en la formación de recursos humanos por medio de acciones de capacitación y divulgación de conocimientos relacionados con HLB, enfermedad emergente en Cuba. Estas acciones se socializaron mediante la coordinación y ejecución de cursos, talleres y servicios científicos técnicos en las empresas citricolas. De esta forma se fomentó y potenció el conocimiento científico-técnico de la enfermedad y su vector, lo cual repercutirá en un mejor manejo del cultivo, para lograr la sostenibilidad de este renglón económico importante para nuestro país. La citricultura permite la subsistencia de alrededor de 145 mil personas vinculadas a esta agroindustria y ha propiciado el desarrollo de una infraestructura en la cual habitan los trabajadores asociados a este cultivo. La definición de los conocimientos básicos para la implementación de la estrategia de manejo de la enfermedad HLB en Cuba contribuirá a la supervivencia de la citricultura y a la conservación de estas fuentes de empleo.

## Publicaciones

- ✓ Martínez, Y., Llauger, R., Batista, L., Luis, M., Iglesia, A., Collazo, C., Peña, I., Casín, J.C., Cueto, J.R. and Tablada, L.M. 2009. First report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with Huanglongbing in Cuba. Plant Pathol. 58: 389. Citado por 2 publicaciones. Factor de Impacto 2.969.
- ✓ Luis, M., Collazo, C., Llauger, R., Blanco, E., Peña, I., López, D., González, C., Casín, J.C., Batista, L., Kitajima, E., Tanaka, F.A.O., Salaroli, R.B., Teixeira, D.C., Martins, E.C. and Bové, J.M. 2009. Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. J. Plant Pathol. 91 (3): 709-712. Citado por 2 publicaciones. Factor de Impacto 0.974.
- ✓ Zamora-Rodríguez, V., Luís-Pantoja, M., Peña-Bárcaga, I., Ferriol-Marchena, X. y Hernández-Rodríguez, L. 2014. Uso de la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares para la eliminación de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' en cultivares de cítricos en Cuba. Revista de Protección Vegetal. Factor de Impacto 0,0870 (Aceptada para publicar).
- ✓ Luis, M., Collazo, C., Llauger, R., Peña, I., López, D., Blanco, E., Casín, J.C., Batista, L., Tanaka, F.A.O., Salaroli, R.B., Martins, E., Teixeira, D., Kitajima, E., Ayres, J., Bové, J.M., Pérez, J.L. and Cueto, J.R. 2008. Huanglongbing in Cuban citriculture. Proceedings of the International Society of Citriculture. 11<sup>th</sup> International Citrus Congress. Wuhan, China. Volume II: 997-999.
- ✓ González, C., Gómez, M., Pérez, L., Hernández, D., Rodríguez, J.L., Fernández, M., Vera, A. and Rodríguez, O. 2008. *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae), incidence and control in Cuban citriculture. Proceedings of the International Society of Citriculture. 11<sup>th</sup> International Citrus Congress. Wuhan, China. Volume II: 1236-1239.
- ✓ Llauger, R., Luís, M., Collazo, C., González, C., Peña, I., López, D., Batista, L. y Cueto, J. 2008. Huanglongbing (ex greening) y su vector en la citricultura cubana. LARANJA (actualmente Citrus Research & Technology) 29 (1-2):17-22.
- ✓ Llauger, R., Luis, M., Collazo, C., Peña, I., González, C., Batista, L., Teixeira, D., Martins, E., Perdomo, A., Casin, J.C., Pérez, J.L., Cueto, J.R. and Bové, J.M. 2008. Current situation of citrus huanglongbing in Cuba. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Orlando, Florida. 2008, 2.1 pp 99-102. IRCHLB Proceedings Dec. 2008: [www.plantmanagementnetwork.org](http://www.plantmanagementnetwork.org)
- ✓ González, C., Gómez, M., Fernández, M., Hernández, D., Rodríguez, J.L. y Batista, L. 2010. Behavior and natural enemies of *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) in Cuban citriculture. Proceedings of 17<sup>th</sup> Conference International Organization Citrus Virologist. pp 203- 205.
- ✓ González, C., Hernández, D. y Rodríguez, J.L., 2000. Primer informe de *Tamarixia radiata* Waterston como biorregulador de *Diaphorina citri* Kuw. en cítricos de Cuba. Citrifrut 18 (1, 2 y 3): 38-40.
- ✓ Cabrera, R.I., González, C., Hernández, D. y Rodríguez, J.L., 2004. Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos de Cuba. Levante Agrícola 144: 74-76, 1er trimestre.
- ✓ González, C., Rodríguez, J.L. y Hernández, D. 2007. *Triphasia trifolia* (Burm.) (Dicotiledonea; Rutaceae), nuevo hospedero de *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera; Psyllidae) en Cuba. Citrifrut 24 (2): 50-53.
- ✓ Collazo, C., Luis, M., Llauger, R. 2009. Técnicas empleadas para el diagnóstico del Huanglongbing de los cítricos. Citrifrut 25 (2): 24-31.
- ✓ González, C., Gómez, M., Hernández, D. y Rodríguez, J.L. 2010. Entomófagos asociados a las plagas cítricas, *Lepidosaphes gloverii* Pack (Hemiptera: Diaspididae), *Phyllocnistis citrella* Stt. (Lepidoptera: Gracillariidae) y *Diaphorina citri* (Kuw.) (Hemiptera: Psyllidae) en naranjo Valencia. Centro Agrícola, 37(4):59-65.

- ✓ Llauger, R., Luis, M., Collazo, C., Peña, I., González, C., Batista, L., Pérez, L., Borroto, A., Pérez, D., López, D., Alonso, E., Acosta, I., Casín, J.C., Torres, L.A., Hernández, D. y Rodríguez, J.L. 2010. Huanglongbing y su vector en Cuba. *Epidemiología y manejo. Citrifrut* 27 (2): 3-8.
- ✓ Collazo, C., Núñez, J., Luis, M. y Llauger, R. 2011. Optimización de una reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la enfermedad "huanglongbing" de los cítricos. *Citrifrut* 28(2): 19-30.
- ✓ Pérez, L., González, C., Hernández, D., Rodríguez, J.L. y Fernández, M. 2011. Ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) en *Citrus aurantifolia* L. y *Murraya paniculata* (L.) Jack en condiciones de laboratorio. *Citrifrut* 28 (2): 12-18.
- ✓ Luis, M. 2014. Aplicación de la tinción con yodo para el diagnóstico indirecto de la enfermedad huanglongbing de los cítricos. *Citrifrut* 31(1): 43-47.