



Por un Desarrollo
Agrario Integral y
Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMIA

MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

Trabajo de Graduación

Ocurrencia de Huanglongbing (*Candidatus
Liberibacter asiaticus*) y su vector [*Diaphorina citri*
Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)] en viveros de
cítricos de Masaya

AUTOR

Ing. Carlos Joel Melgara Maradiaga

ASESOR

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Managua, Nicaragua

Agosto, 2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Ocurrencia de Huanglongbing (*Candidatus
Liberibacter asiaticus*) y su vector [*Diaphorina citri*
Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)] en viveros de
cítricos de Masaya.

AUTOR

Ing. Carlos Joel Melgara Maradiaga

ASESOR

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Managua, Nicaragua

Agosto, 2018

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito parcial para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal

Miembros del Tribunal Examinador

Presidente

Secretario

Vocal

Lugar y Fecha: 08 de agosto de 2018

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MATERIALES Y METODOS	4
3.1. Ubicación del área de estudio	4
3.2. Detección del agente causal del Huanglongbing (HLB) en viveros de cítricos	4
3.2.1. Sitios de recolección de las muestras de tejido vegetal	4
3.2.2. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de material vegetal de cítricos	6
3.2.3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	6
3.3. Fluctuación poblacional del vector <i>Diaphorina citri</i> en viveros de naranja	7
3.4. Efecto de las aplicaciones de insecticidas sobre la fluctuación poblacional de <i>D. citri</i>	8
3.5. Variables evaluadas	8
3.6. Análisis de datos	8
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. Detección del agente causal del huanglongbing (HLB) en viveros de cítricos	12
4.2. Fluctuación poblacional del vector <i>Diaphorina citri</i> en viveros de cítricos	16
4.2.1. Relación entre variables climáticas y <i>Diaphorina citri</i>	20
4.2.2. Relación entre los estadios de <i>Diaphorina citri</i> y el número de brotes	22
4.3. Efecto de la aplicación de insecticidas sobre la fluctuación poblacional de <i>D. citri</i>	24
4.4. Patrón de dispersión de <i>Diaphorina citri</i>	27
V. CONCLUSIONES	29
VI. RECOMENDACIONES	30
VII. LITERATURA CONSULTADA	31
VIII. ANEXOS	35

DEDICATORIA

A Dios Por haberme permitido llegar a cumplir otro más de mis objetivos profesionales, y por cada una de las bendiciones de amor, fortaleza y sabiduría.

A mis padres, hermanos, mi novia y familiares por todo el apoyo incondicional, confianza, y la motivación que me han brindado durante todo este proceso de estudio de mi maestría.

A mi Abuelo Miguel Ángel Maradiaga Sevilla que aunque no está físicamente siempre vive en la memoria y en el corazón de nuestra familia.

A los productores de cítricos de Nicaragua quienes enfrentan la difícil tarea de lidiar con esta enfermedad y que esperan que a través de trabajos como este podamos brindar soluciones que ayuden de alguna manera a reducir los daños causados por esta enfermedad.

Ing. Carlos Joel Melgara Maradiaga

AGRADECIMIENTOS

Un sincero y especial agradecimiento a mi asesor el Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz por su apoyo, su paciencia, por compartirme su experiencia, conocimiento, dedicación, así como su disponibilidad para apoyar el desarrollo de esta investigación, la cual no hubiera sido posible sin su ayuda.

A la Universidad Nacional Agraria por las facilidades brindadas en su laboratorio de microbiología para desarrollar parte del trabajo de investigación

Al Lic. MSc. Isaías Sánchez Gómez por su importante ayuda y aporte de sus conocimientos en el desarrollo de la etapa de laboratorio de esta investigación.

Al Dr. Edgardo Jiménez Martínez y al Departamento de protección Agrícola y Forestal de la UNA por la beca brindada para estudiar esta maestría.

Al Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) organismo en el cual laboro, por concederme el tiempo para poder realizar mis estudios de maestría.

Al Ing. Agustín Chavarría fitosanitario OIRSA, por instruirme en los inicios de mi tesis y por compartirme sus conocimientos en materia de HLB.

Al Ing. Guillermo Barquero del Instituto Nicaragüense de Protección y Sanidad Agropecuaria por compartirme sus conocimientos en materia de HLB y su apoyo en la coordinación con los viveristas, la disposición de materiales de campo y la movilización en la zona de viveros de cítricos.

A los viveristas de Masatepe por todas las facilidades brindadas en sus viveros para el desarrollo de la etapa de campo de esta investigación.

Ing. Carlos Joel Melgara Maradiaga

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Porcentaje de detección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en hojas de naranja provenientes de plántulas de cuatro viveros.	12
2	Distribución numérica de brotes, huevos, ninfas y adultos de <i>Diaphorina citri</i> entre los cuatros viveros de cítricos incluidos en el estudio.	22
3	Parámetros de dispersión utilizados para estimar el patrón de dispersión de <i>D. citri</i> en un período de cuatro meses en cuatro viveros de cítricos del departamento de Masaya.	28

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Hojas de plántulas de naranja que muestran síntoma de coloración amarillo pálido, moteado difuso, engrosamiento y aclaración de nervaduras.	5
2	Detección positiva de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en el mes de marzo 2017. En el panel A, la única muestra positiva (carril 2) correspondió al vivero Campos azules 1 (1 de 4 muestras analizadas) y en panel B, las muestras positivas corresponden al vivero El Román (2 de 4 muestras analizadas, carriles 10 y 11) y al vivero Campos Azules 2 (1 de 4 muestras analizadas, carril 12). Las muestras 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15 y 16 resultaron negativas. C+ = control positivo y M = marcador molecular de 100 pb.	13
3	Detección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en el mes de mayo 2017. En el panel A, los casos positivos de HLB se registraron en el vivero El Diamante (carril 2), vivero Campos Azules 2 (carril 4), Campos Azules 1 (carriles 5 y 6). En el panel B, los casos positivos corresponden al vivero El Román (carriles 7 y 8), El Diamante (carril 9) y Campos Azules 1 (carril 13). C+ = control positivo, C- = control negativo y M = marcador molecular de 100 pb.	14
4	Fluctuación poblacional de <i>D. citri</i> durante cuatro meses de evaluación en viveros de cítricos	17
5	Fluctuación poblacional de adultos de <i>D. citri</i> en el vivero Campos Azules 1. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones	18
6	Fluctuación poblacional de adultos de <i>D. citri</i> en el vivero El Román. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones.	18
7	Fluctuación poblacional de adultos de <i>D. citri</i> en el vivero Campos Azules 2. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones	19
8	Fluctuación poblacional de adultos de <i>D. citri</i> en el vivero El Diamante. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones.	19

9	Relación entre <i>Diaphorina citri</i> y variables climáticas (temperatura, precipitación y humedad relativa)	21
10	Número promedio de los diferentes estadios de <i>Diaphorina citri</i> y de brotes en cada uno de los meses que se realizó el estudio.	23
11	Porcentaje de uso de insecticidas en cada uno de los viveros en estudio.	25
12	Relación entre el número de aplicaciones de insecticidas y el número total de adultos capturados por trampa en cada uno de los viveros en estudio.	26
13	Relación entre el número de aplicaciones de insecticidas y la densidad de adultos del vector del HLB, <i>Diaphorina citri</i> , en los viveros estudiados.	27

INDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1	Vista satelital de los lugares donde estaban establecidos que se incluyeron en la investigación: Campos Azules 1 (A), Campos Azules 2 (B), El Román (C) y El Diamante (D).	35
2	Captura de adultos de <i>Diaphorina citri</i> con trampas amarillas Semiotrap en viveros de cítricos.	36
3	Encuesta realizada a los propietarios y encargados de los viveros donde se realizó la investigación.	37
4	Análisis de varianza para el número promedio de adultos capturados de <i>D. citri</i> .	38
5	Fotografías de adultos (A), ninfas (B) y huevos (C y D) observados en laboratorio con ayuda de microscopio en brotes recolectados en campo.	39

RESUMEN

La producción de cítricos en Nicaragua es de gran importancia económica ya que genera 24.5 millones de dólares anuales. Sin embargo, las áreas citrícolas están seriamente amenazadas por la enfermedad conocida como huanglongbing de los cítricos (HLB), la cual es transmitida por el psílido *Diaphorina citri*. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo principal el de generar información relacionada con la ocurrencia del agente causal del huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) y el insecto vector *Diaphorina citri* en cuatro viveros de cítricos del departamento de Masaya. En un período de cuatro meses se realizó la detección del agente causal del HLB a través de la técnica de PCR, se determinó la fluctuación poblacional del vector, el efecto del uso de insecticidas sobre la fluctuación poblacional del insecto y su patrón de dispersión. En el estudio de fluctuación poblacional y patrón de dispersión se usaron trampas amarillas, las cuales se revisaron a intervalos de 8 días. Se detectó al agente causal del HLB en los cuatro viveros. Los tres estadios del psílido se presentaron durante el periodo de estudio. Los mayores picos poblacionales de los adultos se presentaron en marzo y abril, coincidiendo con altas temperaturas y bajas precipitaciones. En los insectos adultos se observó un arreglo espacial agregado en los meses de febrero, abril y mayo, así como un patrón de dispersión aleatorio en el mes de marzo. La variante *Candidatus Liberibacter asiaticus* es la que estuvo presente en los cuatro viveros, presentándose de manera variable. Las aplicaciones de insecticidas influenciaron de gran manera en la presencia de *Diaphorina citri* en cada uno de los viveros. Se requiere de más estudios que incluyan más sitios de muestreo, así como también más investigación relacionada al patrón de dispersión del insecto a fin de desarrollar programas más efectivos de manejo.

Palabras claves: Huanglongbing, *Diaphorina citri*, fluctuación poblacional, PCR.

ABSTRACT

The citrus production in Nicaragua is of great economic importance since it generates 24.5 million dollars per year. However, citrus areas are seriously threatened by the disease known as huanglongbing (HLB), which is transmitted by the psyllid *Diaphorina citri*. Therefore, the main objective of this research was to generate information related to the occurrence of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) and the insect vector *Diaphorina citri* in four citrus nurseries in the department of Masaya. In a four month period, the detection of the causative agent of HLB was carried out using the PCR technique, the population fluctuation of the vector, the effect of the use of insecticides on the population fluctuation of the insect and its dispersion pattern was determined. In the study of population fluctuation and dispersion pattern, yellow traps were used, which were reviewed at 8-day intervals. The causative agent of HLB was detected in the four nurseries. The three stages of the psyllid occurred during the study period. The highest population peaks of adults occurred in March and April, coinciding with high temperatures and low rainfall. In adult insects an aggregate spatial pattern was observed in February, April and May months, whereas a random dispersion pattern in March was observed. Only the variant *Candidatus Liberibacter asiaticus* was present in the four nurseries, appearing in a variable way. The applications of insecticides greatly influenced the presence of *Diaphorina citri* in each of the nurseries. More studies that include more sampling sites are required, as well as more research related to the insect dispersal pattern in order to develop more effective management programs is needed.

Keywords: Huanglongbing, *Diaphorina citri*, population dynamics, PCR.

I. INTRODUCCIÓN

Los cítricos se cultivan dentro de un amplio rango de aproximadamente $\pm 40^\circ$ de latitud del Ecuador. Desde el momento en que los cítricos fueron reconocidos por primera vez como una fruta comestible con cualidades nutricionales positivas, se han movido con el hombre, y también lo han hecho sus plagas y enfermedades (Gottwald, 2010).

La producción de cítricos en Nicaragua es de gran importancia económica ya que genera 24,5 millones de dólares anuales y está a cargo de 11077 productores, en una superficie aproximada de 21100 hectáreas según cifras oficiales, además esta industria genera 4000 empleos directos y 5000 indirectos. En Nicaragua el cultivo de naranjas ocupa el 80% (16,880 ha) de la producción total de cítricos, mientras que el 10% (2,110 ha) corresponde a las mandarinas, el 7% (1,477 ha) a limones y el 3% (633 ha) a otros productos (Lacayo, 2013).

El Huanglongbing (HLB) es probablemente la enfermedad más grave de los cítricos, en comparación es mucho más grave que la tristeza de los cítricos (CTV) y la clorosis variegada de los cítricos (CVC), y representa una peligrosa amenaza para las regiones que aún están libres de la enfermedad, como lo son la cuenca del Mediterráneo, Asia Occidental, Australia, Nueva Zelanda e Islas del Océano Pacífico (Bové y Ayres, 2007). En Nicaragua el HLB se detectó en febrero del 2010, en el municipio de Puerto Cabezas, Región Autónoma de la Costa Caribe Norte (RACCN) (Lacayo, 2013).

El agente causal del HLB es una alfa-proteobacteria no cultivada (Bastianel *et al.*, 2005), Gram negativa restringida al floema de la planta, y que prácticamente todas las especies de cítricos son sensibles a esta enfermedad. La bacteria del HLB pertenece al género *Candidatus Liberibacter* del cual se conocen tres especies, “*Ca. L. asiaticus*” reportada por primera vez en los países asiáticos y presente también en Brasil y Estados Unidos (Florida), “*Ca. L. africanus*” presente en los países africanos, y “*Ca. L. americanus*” presente en Brasil (Bové, 2006). La transmisión natural ocurre a través los vectores *Trioza erytreae*, y *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (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).

En los cítricos, los síntomas se presentan en las hojas como manchas amarillentas con aspecto de moteado, así como el retraso del crecimiento de plantas en desarrollo, la producción de fruta deforme, pequeña y con pobre coloración, la que además puede desprenderse del árbol prematuramente (Bové, 2006). Los síntomas de HLB en hojas pueden confundirse con deficiencias nutricionales o incluso con el daño de plagas y otras enfermedades. No obstante, se presentan características únicas que los distingue (Bové, 2006). Al principio los árboles infectados desarrollan uno o más brotes con hojas amarillas, de ahí el nombre de la enfermedad del brote amarillo (Bové, 2006). Si otras ramas del árbol permanecen sanas o asintomáticas, los daños se manifiestan sectorizados.

El psílido asiático de los cítricos (PAC), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), es considerado la plaga más importante de los cítricos en el mundo (Halbert y Manjunath 2004). La alimentación tanto de ninfas como adultos causa distorsión de brotes jóvenes y alteraciones en el crecimiento de los árboles. En caso de una infestación severa, los psílicos pueden matar los nuevos brotes o causar la abscisión de hojas o brotes terminales (Halbert y Manjunath, 2004; Tsai *et al.*, 2002). Sin embargo, el mayor peligro de *Diaphorina citri* se relaciona con su capacidad para transmitir las bacterias *Candidatus Liberibacter var. asiaticus*, *africanus* y *americanus*, agentes causales de la enfermedad llamada “huanglongbing” (HLB) o enverdecimiento de los cítricos (Garnier & Bové 2000, Halbert & Manjunath 2004). El control químico del vector, junto con la producción de plantas certificadas bajo invernadero y la eliminación de árboles infectados, son las tácticas que están siendo empleadas para reducir la dispersión del HLB en los huertos de cítricos (Childers *et al.*, 2002; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Stansly y Qureshi, 2007).

En Nicaragua, cómo ya se ha expuesto anteriormente, los cítricos representan un rubro de gran importancia económica y teniendo en cuenta que la enfermedad Huanglongbing y su vector *D. citri* ya han sido reportados en varios sitios de Nicaragua afectando plantaciones establecidas, en el presente trabajo se plantea la necesidad de investigar sobre la presencia del HLB y la fluctuación poblacional del vector en viveros de cítricos del departamento de Masaya.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Generar información relacionada con la ocurrencia del agente causal del huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) y el insecto vector [*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)] en viveros de cítricos en el departamento de Masaya.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar la presencia del agente causal del Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de cítricos a nivel de vivero.
- Describir la fluctuación poblacional del vector *D. citri* en viveros de cítricos manejados por productores en el departamento de Masaya.
- Determinar la relación existente entre el uso y frecuencia de las aplicaciones de insecticidas realizadas bajo condiciones de vivero y la fluctuación poblacional de *D. citri*.
- Determinar el patrón de dispersión del vector *D. citri* en los viveros de cítricos.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del área de estudio

El estudio de fluctuación poblacional del vector *D. citri* se realizó en el Municipio de Masatepe el cual pertenece al departamento de Masaya. Las coordenadas de los sitios donde se colocaron las trampas se pueden observar en el Anexo 1. Los sitios seleccionados se encuentran a una altura promedio de 455.41 msnm y presentan un clima que se caracteriza por ser tropical de sabana, con temperaturas promedios de 27.5°C y con precipitaciones pluviales anuales que oscilan entre los 1200 y 1400 mm (AMUNIC, 2005). La detección del agente causal de la enfermedad Huanglongbing (HLB) se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA).

El estudio consistió en una investigación experimental cuantitativa basada en la determinación de la incidencia del agente causal del huanglongbing (HLB), la fluctuación poblacional del vector que transmite la enfermedad HLB, *Diaphorina citri*, y su relación con las prácticas de manejo que realizan los productores en los viveros de cítricos.

3.2. Detección del agente causal del Huanglongbing (HLB) en viveros de cítricos

Para determinar la incidencia de HLB, se seleccionaron cuatro viveros en el departamento de Masaya específicamente en el municipio de Masatepe, tomando en cuenta los viveros en los cuales se producía la mayor cantidad de plántulas. Los viveros seleccionados fueron: vivero Campos Azules 1 y vivero Campos Azules 2 ubicados en la zona conocida como Campos Azules y viveros el Diamante y El Román ubicados en Masatepe. Los cuatro viveros estaban ubicados en el municipio de Masatepe del departamento de Masaya.

3.2.1. Sitios de recolección de las muestras de tejido vegetal

Se recolectaron muestras de hojas en cada uno de los viveros de cítricos y se llevaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria. Se seleccionaron hojas que presentaban síntomas considerados típicos de la enfermedad tales como: hojas con coloración

amarillo pálido con áreas irregulares (asimétricas) de moteado difuso, con nervaduras engrosadas y aclaradas de aspecto corchoso (Colletta-Filho *et al.*, 2004; Figura 1). Estas hojas se utilizaron para extraerles su ADN (ácido desoxirribonucleico) responsable de contener toda la información genética de un individuo o ser vivo y posteriormente realizar la prueba de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Las plántulas tenían en promedio cuatro meses de edad en el momento que inició el estudio y ocho meses de edad al concluir éste. Se realizaron dieciséis recolectas de muestras en total por vivero (una muestra semanal \times 4 meses) teniendo en cuenta que el patógeno tiene un largo período de incubación y de latencia (Gottwald, 2010).

En cada mes por vivero, se tomaron 20 plántulas, de las cuales se tomaron las hojas con síntomas de HLB, es decir, por cada vivero se examinaron 80 plántulas en total y de ellas se tomaron las muestras para el análisis de detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* a través de la PCR.



Figura 1. Hojas de plántulas de naranja que muestran síntoma de coloración amarillo pálido, moteado difuso, engrosamiento y aclaración de nervaduras.

3.2.2. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de material vegetal de cítricos

Para la extracción de ADN a partir de tejido foliar se siguió el procedimiento de Hung *et al.*, (1999). Este procedimiento se describe a continuación con una leve modificación, la cual consistió en el no uso del reactivo Sarkosyl.

a) Extracción de ADN de hojas de cítricos

Para realizar el procedimiento de extracción de ADN de las hojas, en un recipiente de porcelana se depositó aproximadamente 0.5 g de venas centrales y pecíolos; se agregaron 3 ml de buffer de extracción de ADN y se procedió a moler los tejidos con un mortero. La suspensión resultante se incubó a 65°C por una hora; se centrifugó a 12000 g (13000 rpm) por 10 min; se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo; se agregaron 100 µl NaCl 5M, 300 µL de CTAB al 2% y 2 µL de ARN-asa y se mezcló uniformemente. Posteriormente se incubó a 65°C por 10 min. Se adicionaron 600 µl de CI (cloroformo:alcohol isoamílico = 24:1) y se mezcló mediante inversión. Se centrifugó a 11000 g (12000 rpm) por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. Se agregó 600 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una relación de 25:24:1 y se mezcló mediante inversión. Se centrifugó a 12000 g (13000 rpm) por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL y se agregó 300 µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión suave. Se incubó a -20°C por 30 min, para luego centrifugar a 13000 g (14000 rpm) por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 200 µl de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm y se descartó cuidadosamente el etanol y el precipitado se dejó secar hasta que se evaporaron los residuos de etanol. El precipitado se resuspendió en 50 µl de buffer TE. El ADN resuspendido se almacenó a 4°C.

3.2.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez finalizada la extracción de ADN de las hojas se continuó con el procedimiento de PCR convencional y electroforesis. Se utilizaron el par de iniciadores desarrollados por Hocquellet *et al.*, (1999), los cuales consisten de las siguientes secuencias: el iniciador de sentido rplA2 (TATAAAGGTTGACCTTTGGAGTTT) y el iniciador antisentido rplJ5 (ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA). Este par de iniciadores permiten distinguir las

variantes asiáticas y africanas, ya que amplifican un fragmento de 703 pb para *Candidatus Liberibacter asiaticus* y de 669 pb para *Candidatus Liberibacter africanus*. Este par de iniciadores no amplifican las secuencias de la región 16S del ADN ribosomal de la bacteria, sino que están basados en genes proteicos (Operón β) (Fujikawa e Iwanami, 2012). Este se realizó dando seguimiento a la siguiente metodología. El protocolo de amplificación que se utilizó fue el descrito por Li *et al.*, (2007) con leves modificaciones, las cuales se citan a continuación. Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 45 segundos, anillamiento a 53°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 7 minutos. El producto PCR fue visualizado en agar al 1%, al cual se le agregó 4 μ L del reactivo GelRed para la tinción de los fragmentos de ADN.

3.3.Fluctuación poblacional del vector *Diaphorina citri* en viveros de naranja

Para determinar la fluctuación poblacional del insecto vector, se procedió a colocar la cantidad de diez trampas Delta Semiotrap color amarillo, en cada uno de los viveros en los cuales se realizó la investigación (Anexo 2). Una vez colocadas las trampas, se procedió a revisarlas a intervalos de 8 días durante un período de 4 meses, para un total de 16 fechas de muestreo y de esta manera se determinó la fluctuación poblacional del vector.

También se recolectaron brotes de las plántulas, los cuales fueron llevados al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria donde fueron examinados con la ayuda de un estereoscopio Fisher Scientific ® para realizar el conteo de huevos, ninfas y en algunos casos hasta de insectos adultos de *D. citri* que se encontraban en los brotes. Estos datos fueron usados para relacionar la presencia de estados inmaduros con la captura de insectos adultos durante el período de la investigación de la fluctuación poblacional.

3.4. Relación entre el uso y frecuencia de aplicaciones de insecticidas y la fluctuación poblacional de *D. citri*

Para determinar el efecto que tienen las prácticas de manejo sobre la fluctuación poblacional de *D. citri* y la incidencia de HLB, se realizó una encuesta a los cuatro productores de viveros de cítricos (Anexo 3).

Esta encuesta contenía información sobre cada una de las actividades que realizan los productores de los viveros en estudio y la posible influencia que podían tener cada una de las prácticas realizadas sobre la presencia de *D. citri* y el HLB.

3.5. Variables evaluadas

- Porcentaje de detección del HLB mediante PCR en muestras de hojas por vivero
- Número de adultos de *D. citri* capturados por trampa.
- Número de brotes totales por planta.
- Número de huevos, ninfas y adultos de *D. citri* por brote nuevo.
- Patrón de dispersión de los adultos de *D. citri*.

3.6. Análisis de datos

En el caso de la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en tejido vegetal mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se realizó una descripción porcentual de los casos positivos por vivero.

Para el análisis de los datos de fluctuación poblacional se realizó un análisis gráfico descriptivo de la dinámica de los estadios de huevo, ninfas y adultos. En el caso específico de los adultos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) tomando como repetición las fechas de muestreo y haciendo uso del software para análisis estadístico Info Stat (2008). Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). El patrón de dispersión mensual del insecto adulto se determinó a través del Índice de dispersión (relación varianza:media), la distribución de frecuencias de Poisson y la distribución de frecuencias

binomial negativa. Esto se hizo a fin conocer si el patrón de dispersión del insecto era aleatorio o agregado durante el período del estudio.

a) Índice de dispersión

Este índice se calculó para los conteos realizados por mes y por vivero, lo cual dio como resultado una cuadrícula la que fue procesada con la ayuda de las fórmulas suministradas en una hoja de Excel. La fórmula para el cálculo de este índice es (Costa *et al.*, 2010):

$$D = \frac{s^2}{\bar{x}} \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde, s^2 es la varianza de la muestra y \bar{x} es la media de la muestra de los conteos de insectos adultos de *D. citri*. Una prueba estadística de Ji-cuadrado se calculó como $(N - 1)D$, donde N es el número conteos (4 semanas \times 4 meses), para probar si D es significativamente diferente de 1, lo cual indicaría un desviación de la aleatoriedad. Se comparó este valor de Ji-cuadrado con la distribución Ji-cuadrado tabulado con $N - 1$ grados de libertad (gl). Si la probabilidad resultante era $P < 0.05$, entonces el patrón de los insectos adultos no es aleatorio.

b) Distribución de Poisson (patrón aleatorio)

Bajo la hipótesis nula de que los insectos adultos de *D. citri* estaban en arreglo aleatorio, la frecuencia esperada (proporción) de un determinado conteo de adultos se calculó a través de la fórmula (Sokal y Rohlf, 2012):

$$P(x) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde, “ x ” es el número de adultos por conteo y λ es un parámetro que puede ser calculado por la media de la muestra, \bar{x} . La bondad de ajuste de la distribución de Poisson a los datos de frecuencia observados se realizó con una prueba de Ji-cuadrado. Se usaron las frecuencias observadas y esperadas de los diferentes conteos para calcular un estadístico de prueba Ji-cuadrado con la ecuación:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O - E)^2}{E} \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde O es el número observado de individuos en cada una de las clases (conteos), E es el número esperado de individuos en cada una de las clases, y n es el número de conteos de clases. Para calcular la probabilidad de observar un valor igual o mayor que el χ^2 si la hipótesis nula es verdadera (es decir, los adultos están en un arreglo aleatorio) con $n - 2$ grados de libertad, se usó la función estadística DISTR.CHICUAD.CD ($\chi^2, n - 2$) de Excel. Si la probabilidad resultante, P , era mayor o igual a 0.05, se podía concluir que la distribución de Poisson suministra un buen ajuste a los datos de frecuencia observados y por lo tanto el arreglo espacial de los adultos en el vivero es aleatorio.

c) Distribución binomial negativa (patrón agregado)

El número esperado (proporción) de individuos en un conteo dado por período de tiempo evaluado se calculó a través de la fórmula (Sokal y Rohlf, 2012):

$$P(x) = \binom{x+k-1}{k-1} p^k (1-p)^x = \frac{(x+k-1)!}{(k-1)! x!} p^k (1-p)^x \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde “ x ” es el número de adultos encontrados en un cada uno de los conteos, p y k son parámetros. El parámetro “ k ” tiene un rango de cero a infinito positivo y puede ser interpretado como un parámetro de agregación. Conforme “ k ” disminuye, el grado de agregación se incrementa, y conforme “ k ” se incrementa, el grado de agregación disminuye. A medida que “ k ” se acerca al infinito, la binomial negativa se reduce a la distribución de Poisson. El parámetro “ p ” se puede estimar mediante \bar{x}/s^2 . El parámetro “ k ” puede ser calculado de forma más sencilla usando el estimador de momento que se calcula con la fórmula:

$$\hat{k} = \frac{\bar{x}}{\left(\frac{s^2}{\bar{x}} - 1\right)} \quad (\text{Ecuación 5})$$

La prueba estadística de Ji-cuadrado se calculó con la ecuación 3 como se hizo en el caso de la distribución de Poisson. Para calcular la probabilidad de observar un valor igual o mayor que el Ji-cuadrado si la hipótesis nula es verdadera (es decir, los adultos están en arreglo aleatorio) con $n - 3$ grados de libertad, donde “ n ” es el número de clases (conteos), se usó la función estadística DISTR.CHICUAD.CD (χ^2 , $n - 3$) de Excel. Si $P \geq 0.05$, entonces el arreglo espacial de los adultos en el vivero era agregado. En caso contrario, si $P < 0.05$, esto indicaría que el arreglo espacial de los adultos no era agregado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Detección del agente causal del huanglongbing (HLB) en viveros de cítricos

En los cuatro viveros se detectó la presencia de HLB a través de la prueba de PCR. El porcentaje de detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* fue variable en los cuatro viveros durante los cuatro meses que se recolectaron muestras (Cuadro 1). En los viveros donde se detectaron más casos de HLB fueron en Campos Azules 1 y en el vivero El Román (4 casos positivos de 16 muestras analizadas mediante PCR), el porcentaje de detección en estos viveros fue de 25%, mientras que en los viveros Campos Azules 2 y El Diamante el porcentaje fue de 12.5%, ya que de 16 muestras analizadas en los cuatro meses se detectaron solamente dos casos positivos de HLB (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en hojas de naranja provenientes de plántulas de cuatro viveros.

Vivero	NMAPM	Detección mediante PCR				Total (%)
		Febrero	Marzo	Abril	Mayo	
Diamante	4	0/4	0/4	0/4	2/4	12.5
Campos Azules-1	4	0/4	1/4	0/4	3/4	25
Campos Azules-2	4	0/4	1/4	0/4	1/4	12.5
Román	4	0/4	2/4	0/4	2/4	25

NMAPM = Número de muestras analizadas por mes

Aunque el estudio abarcó un período de cuatro meses (Febrero-Mayo 2017), solamente en dos meses (marzo y mayo) se detectó la presencia del agente causal del HLB en las muestras analizadas a través de PCR (Figuras 2 y 3). En el mes de marzo, la enfermedad fue detectada inicialmente en muestras tomadas de los viveros Campos Azules 1, El Román y Campos Azules 2. Los marcadores *rplA2* (iniciador de sentido) y el *rplJ5* (iniciador de antisentido) amplificaron un fragmento de 703 pares de bases (pb), confirmando que la variante *Candidatus Liberibacter asiaticus* es la que estuvo presente en los cuatro viveros donde se realizó el estudio (Figuras 2 y 3). De esta manera, se descarta la posibilidad de que la variante *Candidatus Liberibacter africanus* no está presente en la zona de estudio.

La región intergénica entre los genes *rplA* y *rplJ* es 34 pb más grande en *Candidatus Liberibacter asiaticus* que en *Ca. Liberibacter africanus*. Con el iniciador de sentido *f-rplA2*, seleccionado en el gen *rplA*, y el iniciador de antisentido *r-rplJ5* del gen *rplJ*, se amplifica un fragmento de ADN de 703 pb en *Ca. Liberibacter asiaticus*, mientras que para *Ca. Liberibacter africanus* se obtiene un fragmento de ADN de 669 pb (Arredondo Valdés *et al.*, 2016; Bové, 2006).

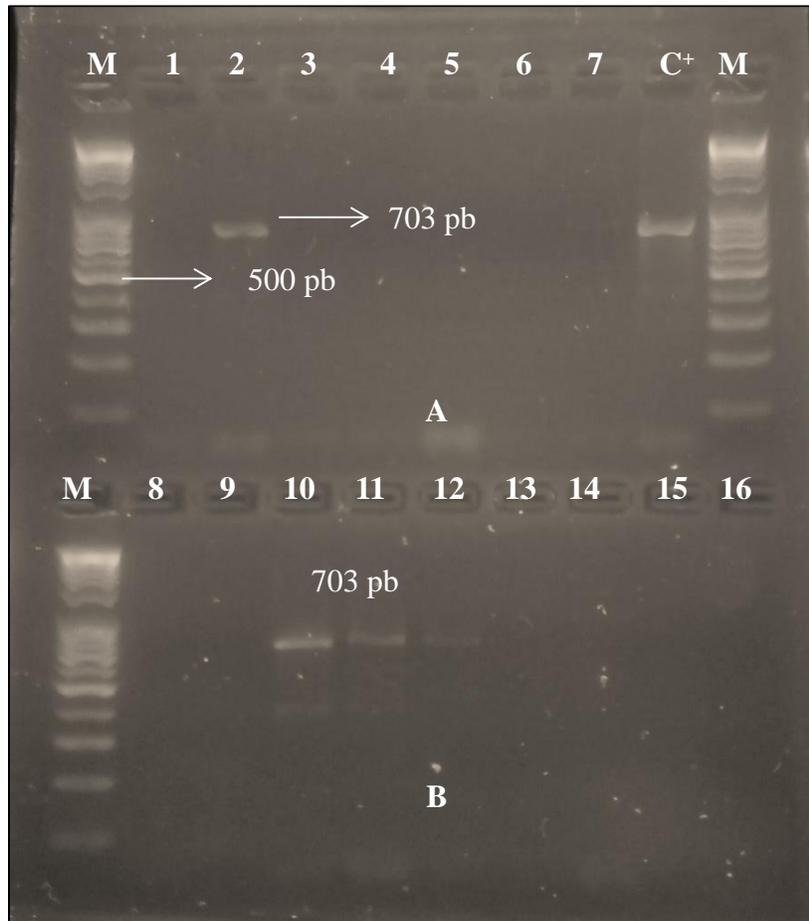


Figura 2. Detección positiva de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el mes de marzo 2017. En el panel A, la única muestra positiva (carril 2) correspondió al vivero Campos azules 1 (1 de 4 muestras analizadas) y en panel B, las muestras positivas corresponden al vivero El Román (2 de 4 muestras analizadas, carriles 10 y 11) y al vivero Campos Azules 2 (1 de 4 muestras analizadas, carril 12). Las muestras 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15 y 16 resultarán negativas. C⁺ = control positivo y M = marcador molecular de 100 pb.

En el mes de mayo, el HLB fue detectado en todas las muestras analizadas de los cuatro viveros (Figura 3). En el vivero Campos Azules 1 fue donde más casos positivos se registraron (en tres de cuatro muestras).

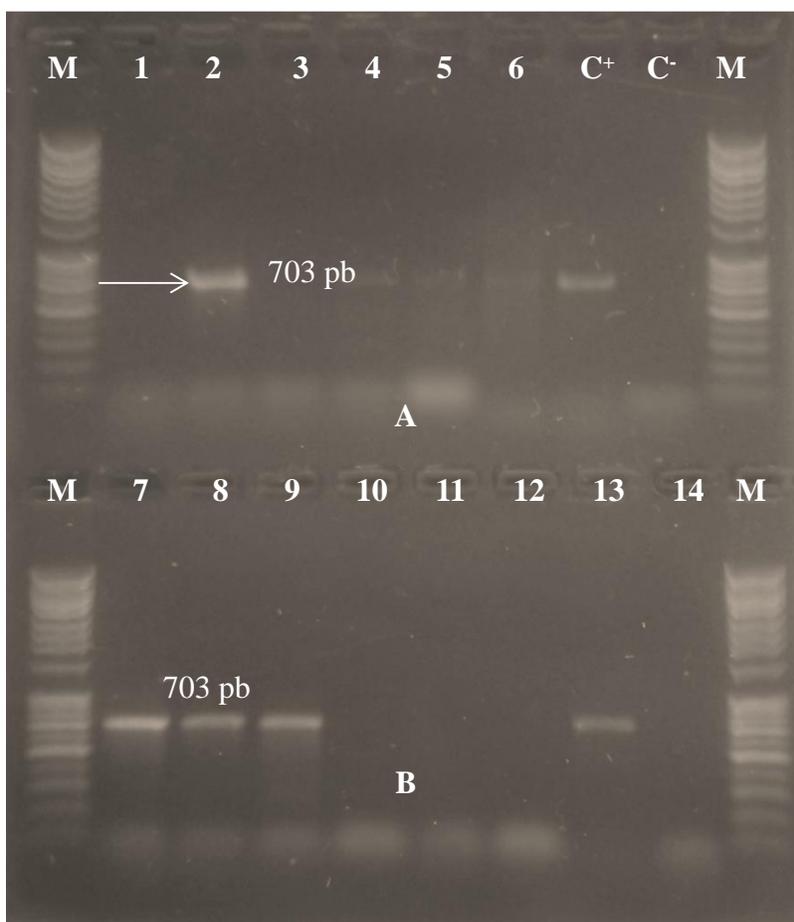


Figura 3. Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el mes de mayo 2017. En el panel A, los casos positivos de HLB se registraron en el vivero El Diamante (carril 2), vivero Campos Azules 2 (carril 4), Campos Azules 1 (carriles 5 y 6). En el panel B, los casos positivos corresponden al vivero El Román (carriles 7 y 8), El Diamante (carril 9) y Campos Azules 1 (carril 13). C⁺ = control positivo, C⁻ = control negativo y M = marcador molecular de 100 pb.

En general se puede afirmar que la detección del agente causal del HLB en los viveros fue un tanto errática durante el período de estudio, este resultado se puede atribuir al hecho de que la bacteria provoca una infección sistémica difusa en los tejidos de la planta afectada. La naturaleza discontinua de la infección sistémica inducida por *Ca. Liberibacter asiaticus* podría indicar que la concentración bacteriana en algunas partes de la planta está por debajo

del umbral de detección a través de PCR, sin embargo, esas partes aparentemente negativas a la PCR pueden estar infectadas, y aunque son visualmente asintomáticas, el floema en todo el árbol o plántula tiene suficiente carga bacteriana como para que el vector, *D. citri*, pueda adquirir y transmitir al patógeno (Ding *et al.*, 2015; Gottwald, 2010).

La concentración de la carga bacteriana en las muestras fue muy variable y eso se pudo observar claramente en la intensidad de las bandas reveladas a través de la PCR. Por ejemplo, en la Figura 2B, en la muestra 12 se observa una banda tenue. Esto mismo ocurrió con las muestras 4, 5 y 6 de la Figura 3A. Sin embargo, en otras muestras, como es el caso de las muestras 7, 8 y 9 de la Figura 3B, la intensidad de las bandas es más acentuada, lo cual indica que la concentración bacteriana en esas muestras fue mayor. Es muy probable que en las otras muestras pudiera estar presente la bacteria, pero a concentraciones que escaparon a la detección mediante la PCR. Otro aspecto importante a considerar también es el largo período de incubación y de latencia que tiene la bacteria, especialmente en árboles que sobrepasan los cinco años. El período de incubación es el tiempo entre la infección y el comienzo de la expresión de los síntomas, mientras que el período de latencia es el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y el comienzo del proceso infeccioso (en este momento el vector puede adquirir la bacteria y transmitirla a plantas sanas).

Por un lado, se ha estimado que en plantaciones de cítricos con árboles de 7-10 años de edad, el período de incubación es de 1 a 2.5 años. Sin embargo, en plantaciones más jóvenes, el período de incubación se ha calculado que es de 6 a 12 meses (Gottwald, 2010). Por otro lado, existen reportes los cuales indican que el período de latencia es de aproximadamente 15 días (Lee *et al.*, 2015).

En el presente estudio, el agente causal del HLB fue detectado en plántulas injertadas de 6 y 8 meses de edad (muestras positivas a la PCR de los meses de marzo y mayo; Figuras 2 y 3). La temprana detección de la enfermedad en las plántulas injertadas plantea dos alternativas en este estudio: i) las yemas, con las cuales se realizó el injerto estaban contaminadas con la bacteria y provenían de sitios donde la enfermedad está presente, pero todavía no está reportada oficialmente; ii) las plántulas fueron infectadas por insectos adultos de *D. citri* que portaban la bacteria.

La primera alternativa puede tener más aceptación, ya que se ha comprobado que mediante injertación los períodos de incubación y de latencia son más cortos. Por ejemplo, Ahmad *et al.*, (2010) reportan que observaron síntomas de HLB a las 12-16 semanas después de haber injertado yemas infectadas con *Ca. Liberibacter asiaticus* en plántulas de mandarina de 3 meses de edad. Además, algunas investigaciones en las cuales se ha hecho uso de la PCR para estudiar la capacidad de transmisión de *Ca. Liberibacter asiaticus* a través del psílido asiático de los cítricos (PAC) y a través de injerto han demostrado que el PAC tuvo porcentajes de inoculación menos exitosos en las plantas huéspedes que la inoculación a través de injerto (Hung *et al.*, 2004; Ukuda-Hosokawa *et al.*, 2015).

4.2. Fluctuación poblacional del vector *Diaphorina citri* en viveros de cítricos

La fluctuación poblacional general de *D. citri* durante el periodo de evaluación fue muy variable. El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre semanas de evaluación ($P < 0.0001$; $\alpha = 0.05$; Anexo 4). Se registraron tres fechas en las cuales la captura de adultos fue mayor en comparación con el resto de semanas. El pico poblacional más alto se observó en la octava fecha de evaluación (23 de marzo 2017) con un promedio de 29 adultos capturados, en la novena fecha de evaluación (30 de marzo 2017) hubo un promedio de captura de 20 individuos y en la onceava fecha (20 de abril 2017) se registró una captura promedio de 17 adultos por trampa (Figura 4).

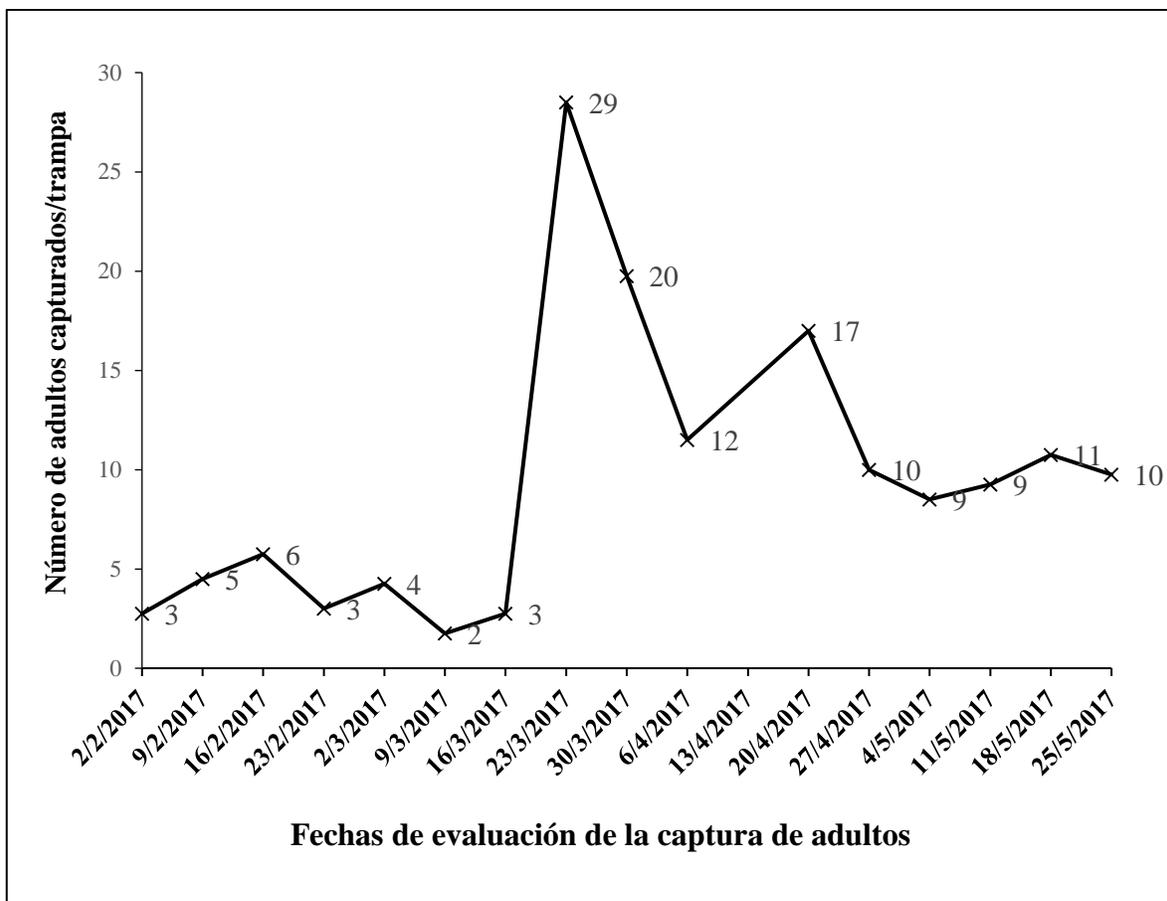


Figura 4. Fluctuación poblacional de *D. citri* durante cuatro meses de evaluación en viveros de cítricos.

La fluctuación poblacional por vivero también fue muy variable a través del tiempo. En general el mayor número promedio de capturas de *D. citri* se registró en los viveros Campos Azules 1 y El Román. Los picos poblacionales más altos se observaron en el mes de abril con 17 y 26 insectos adultos capturados en el vivero Campos Azules 1 y El Román respectivamente (Figuras 5 y 6).

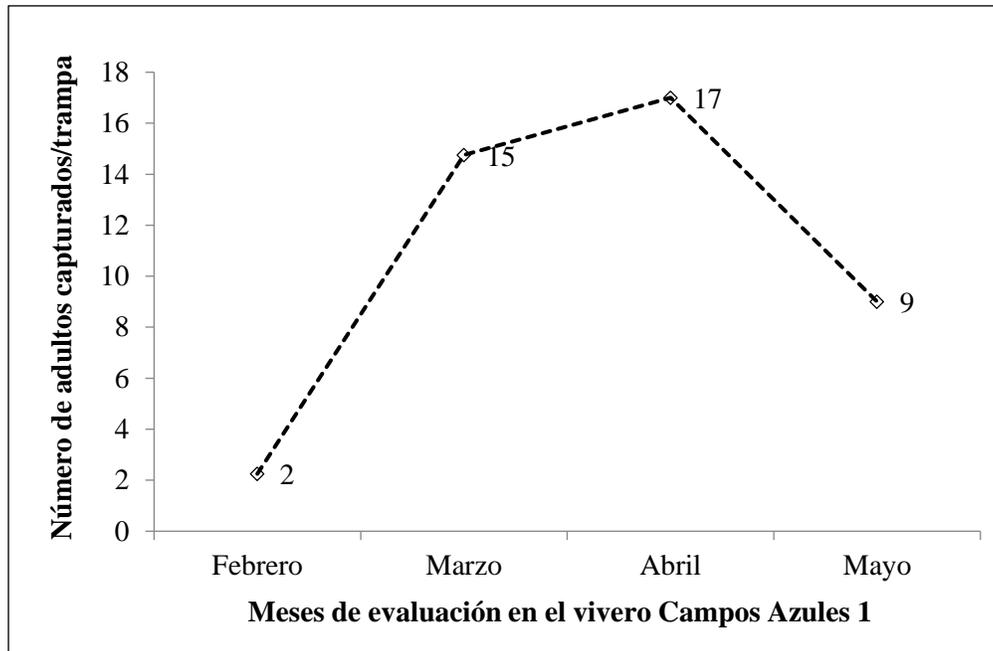


Figura 5. Fluctuación poblacional de adultos de *D. citri* en el vivero Campos Azules 1. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones.

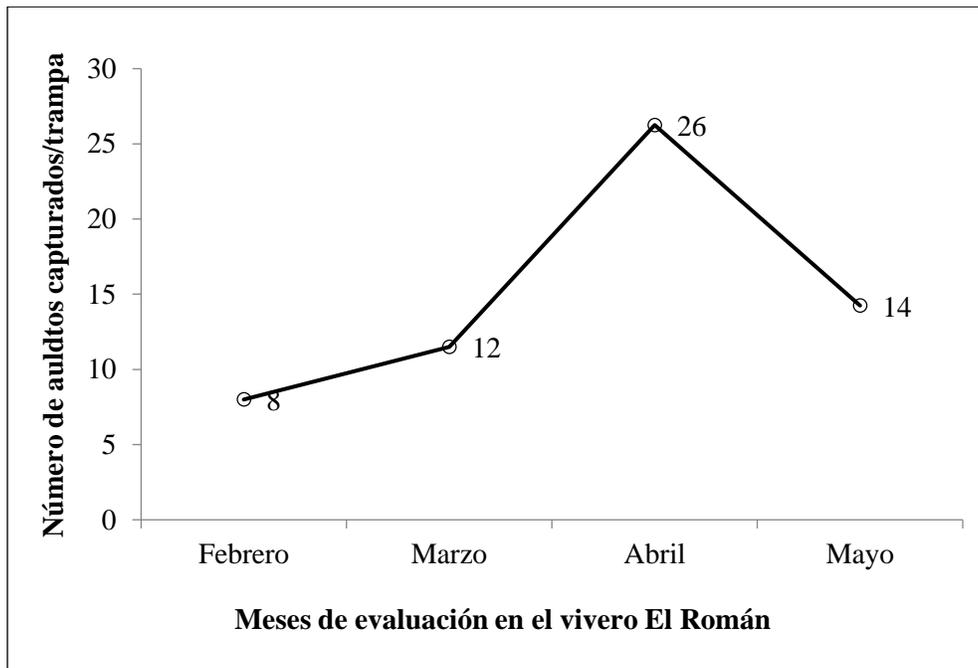


Figura 6. Fluctuación poblacional de adultos de *D. citri* en el vivero El Román. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones.

En los viveros Campos Azules 2 y El Diamante el valor promedio de captura de *D. citri* fue más bajo en comparación con los otros dos viveros. Los picos poblacionales más altos se

observaron en el mes de abril con 10 y 7 insectos adultos capturados en vivero Campos Azules 2 y El Diamante respectivamente (Figura 7 y 8).

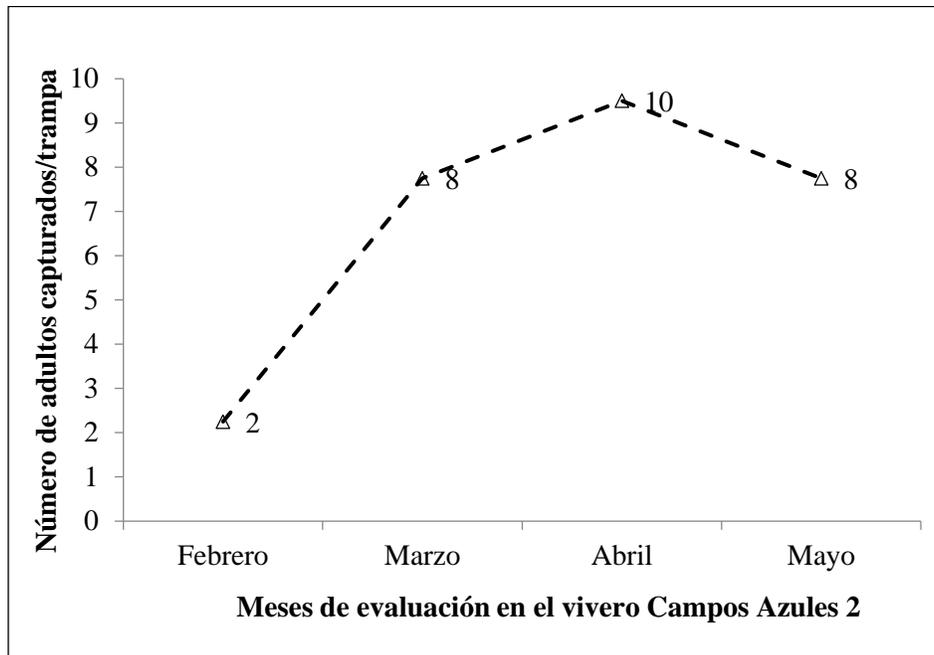


Figura 7. Fluctuación poblacional de adultos de *D. citri* en el vivero Campos Azules 2. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones.

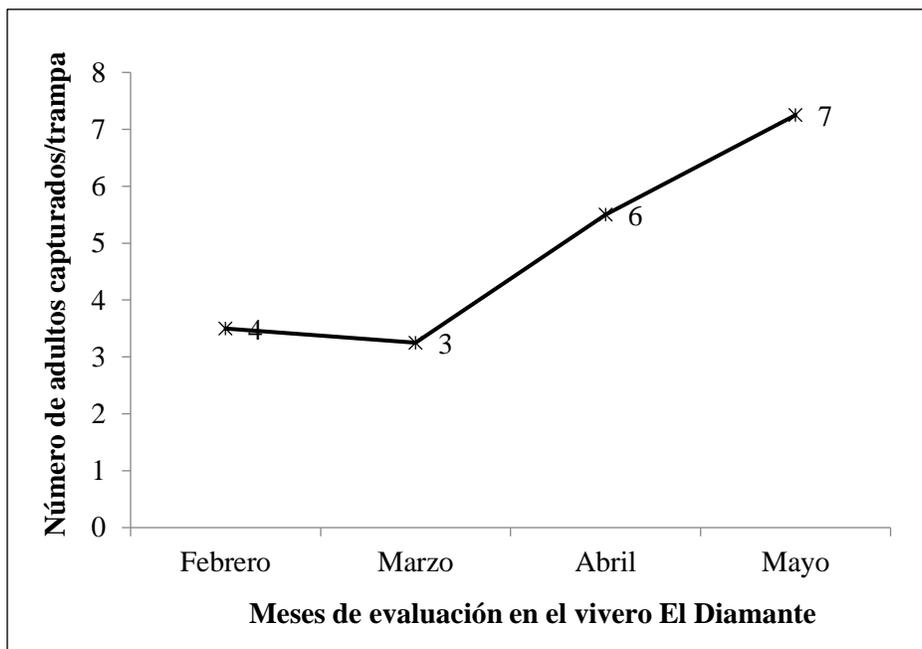


Figura 8. Fluctuación poblacional de adultos de *D. citri* en el vivero El Diamante. Cada punto en los gráficos representa un valor promedio de 16 evaluaciones.

Los resultados anteriormente obtenidos nos muestran la presencia de *D. citri* durante todo el periodo de evaluación, lo cual concuerda con lo reportado por Alemán *et al.*, (2007) quienes mencionan que el psílido no tiene diapausa, por lo tanto, el insecto siempre estará presente y sus poblaciones declinan en los periodos en que las plantas no están en brotación.

Aun reportando picos poblacionales bajos en algunas de las fechas de muestreo en cada uno de los viveros en estudio García *et al.*, (2016) plantean que el hecho de poder presentar un potencial de 16 generaciones al año, hace que su nivel de daño sea alto, con el agravante de que un nivel bajo poblacional no deja de ser preocupante para un insecto que sirve como vector del HLB.

4.2.1. Relación entre variables climáticas y *Diaphorina citri*

El psílido asiático de los cítricos, *D. citri*, se presentó durante todas las fechas de muestreo en cada uno de los viveros en estudio, presentado sus mayores niveles poblacionales a mediados de marzo y finalizando a mediados de abril (Figura 9). Estos niveles poblacionales altos se presentan en los meses donde se proyectan temperaturas promedio que van de 25.1°C y 26°C, lo cual coincide con lo descrito por Liu y Tsai (2000), los cuales establecen que el rango óptimo de temperatura para el desarrollo poblacional de *D. citri* es de 25°C a 28°C y las temperaturas de 32°C o mayores a este rango originan un declive en las poblaciones del insecto (Bové, 2006), por lo tanto se puede afirmar que en la zona donde se realizó la investigación no se presentaron condiciones limitantes para el desarrollo de *D. citri*, ya que las temperaturas de la zona en estudio están dentro del rango óptimo para el desarrollo del insecto.

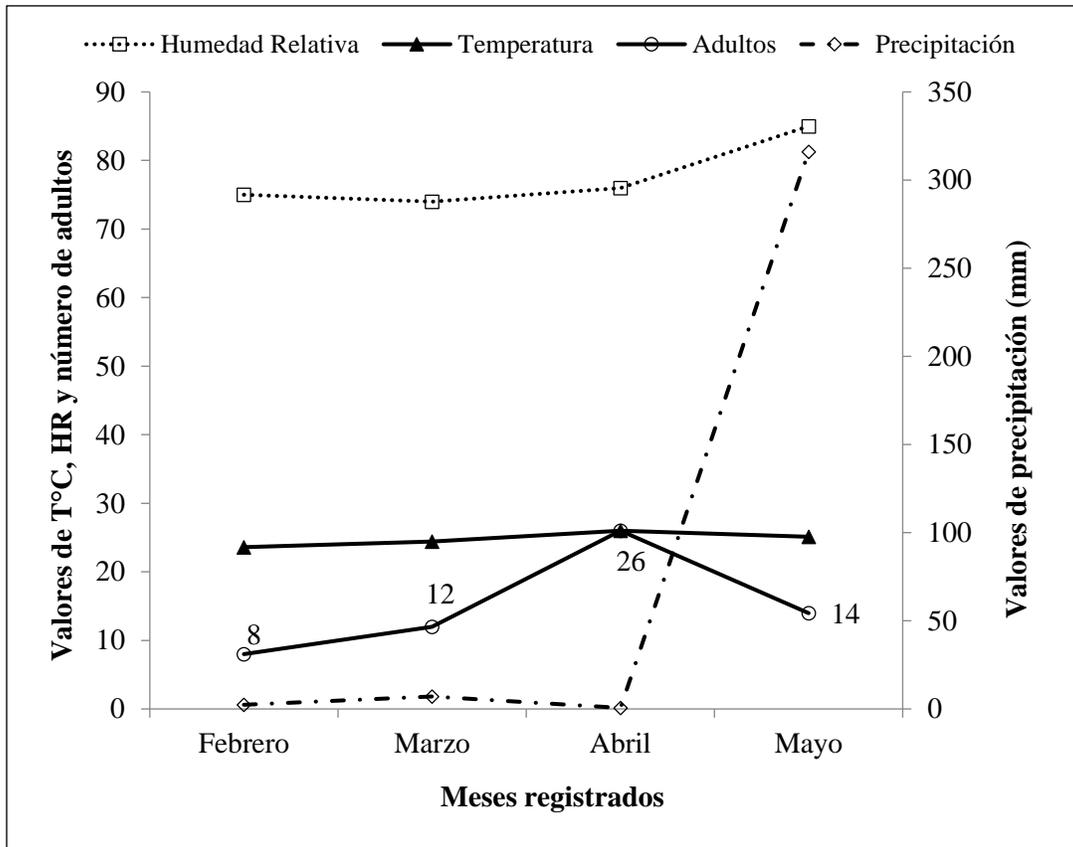


Figura 9. Relación entre *D. citri* y variables climáticas (temperatura, precipitación y humedad relativa)

Los resultados derivados del presente estudio demuestran un incremento en las precipitaciones a mitad del mes de abril e inicios de mayo y una leve baja en la temperatura en el mismo intervalo de meses, acompañado a estos resultados de precipitación y temperatura se observa una disminución en la población de *D. citri* la cual presenta una variación promedio de capturas que va desde los 26 a los 14 adultos capturados, presentando una baja promedio de menos doce adultos capturados (Figura 9). Los resultados encontrados coinciden con lo observado por Moreno *et al.*, (2008), los cuales observaron que, a pesar de la abundancia de brotes, la precipitación constante puede afectar el desarrollo poblacional del insecto.

4.2.2. Relación entre los estadios de *Diaphorina citri* y el número de brotes

No se encontró una correlación estadística significativa entre los tres estadios del vector (Anexo 5) y el número de brotes registrados en cada uno de los viveros. En el vivero El Román se registró el mayor número de individuos en los tres estadios de *D. citri* evaluados, con un promedio de 28 huevos, 42 ninfas y 15 adultos; seguido por vivero Campos Azules 1 con 14 huevos, 12 ninfas y 11 adultos. Los viveros Diamante y Campos Azules 2, presentan datos similares con respecto a los tres estadios. En relación al número de brotes, el valor promedio más alto se encontró en los viveros El Diamante y El Román con 34 cada uno, mientras que en los viveros Campos Azules 1 y 2, la brotación promedio se ubicó en 24 y 23 respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución numérica de brotes, huevos, ninfas y adultos de *Diaphorina citri* entre los cuatros viveros de cítricos incluidos en el estudio.

Vivero	Brotos	Huevos	Ninfas	Adultos
El Diamante	34	7	15	5
Campos Azules 1	24	14	12	11
Campos Azules 2	23	7	12	7
El Román	34	28	42	15

Con respecto a los meses, tampoco se encontró una correlación estadística significativa entre el número de brotes y los tres estadios de *D. citri*. El mayor número de brotes promedio se registró en el mes de marzo y a partir de ahí se observó un declive que duró hasta finales de mayo. Solamente los estadios ninfales tuvieron puntos coincidentes con el número de brotes en los meses de febrero, marzo y abril. A partir de abril, el número de ninfas comenzó a incrementarse aun cuando el número de brotes comenzó a declinar bruscamente a partir de ese mes. El número de adultos se incrementó de febrero a abril y a partir de ahí comenzó a declinar al igual que el número de brotes. El estadio de huevos tuvo un comportamiento totalmente independiente del número de brotes, ya que sus valores promedios se incrementaron desde febrero hasta mayo cuando finalizó el estudio (Figura 10).

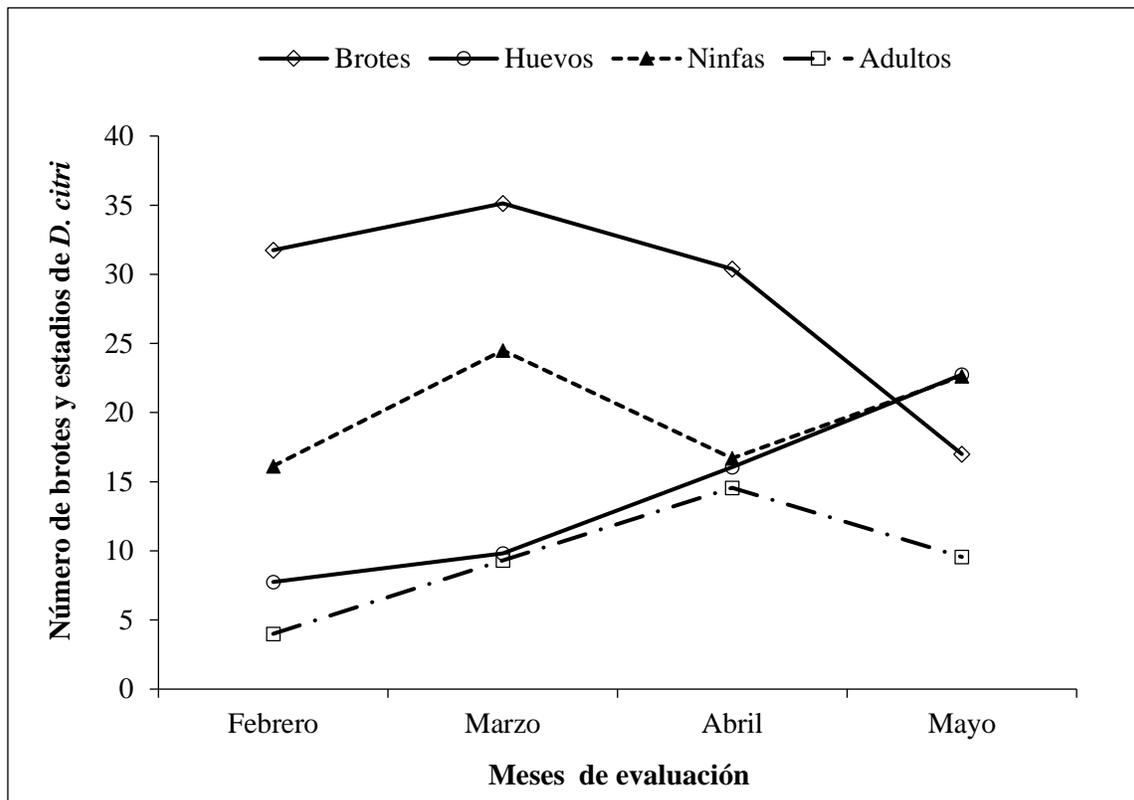


Figura 10. Número promedio de los diferentes estadios de *Diaphorina citri* y de brotes en cada uno de los meses que se realizó el estudio.

Los resultados del presente estudio concuerdan con otros estudios donde no se ha encontrado una correlación significativa entre la densidad de adultos de *D. citri* y el número de brotes (Chávez-Medina *et al.*, 2016). Sin embargo, en este estudio se pudo constatar que el número de adultos tuvo una tendencia a la disminución cuando el número de brotes también disminuyó en el mes de abril (Figura 10). De tal manera, la presencia de brotes vegetativos jóvenes favorece la presencia de adultos del vector, los cuales ovipositan en estos brotes jóvenes donde posteriormente se desarrollan los huevos y ninfas (Tsai *et al.*, 2002; Halbert y Manjunath, 2004; Hall *et al.*, 2008; Qureshi *et al.*, 2009; Ortega-Arenas *et al.*, 2013).

4.3. Relación entre el uso y frecuencia de aplicaciones de insecticidas y la fluctuación poblacional de *D. citri*.

Los resultados de la encuesta indicaron que los productores de plantas de vivero de cítricos en los sitios donde se realizó el estudio aplican diferentes formulaciones e ingredientes activos para el control del vector (*Diaphorina citri*) del HLB.

Los insecticidas más utilizados para el control de *D. citri* en los cuatros viveros fueron: BIODi®e (extracto de berberina, ricina, argemonina, terthienyl), el cual es un insecticida y acaricida de banda verde que actúa por contacto e ingestión; Tigre ® 25 EC (dimetoato + cipermetrina), es una formulación de un insecticida organofosforado con un piretroide; Abamectina ® 1.8% EC: es un acaricida e insecticida selectivo, con efecto sistémico local y translaminar, de residualidad media, que actúa sobre formas móviles (larvas y adultos). Cipermetrina ® 25 EC (cipermetrina): la cipermetrina es un insecticida, piretroide de amplio espectro, no sistémico, no volátil que actúa por contacto e ingestión. Ofrece un control efectivo de insectos y baja toxicidad para los mamíferos.

Los insecticidas anteriormente descritos coinciden con estudios más recientes de la respuesta de *D. citri* a los insecticidas los cuales indican sensibilidad por parte del vector a varias clases diferentes de insecticidas, incluyendo piretroides, organofosforados, carbamatos, neonicotinoides, algunos reguladores del crecimiento de insectos (IGR), aceite hortícola, el inhibidor de la síntesis de lípidos spirotetramat, spinetoram, abamectina, y octanoato de sacarosa (Grafton-Crdwell *et al.*, 2013).

Dentro de los insecticidas utilizados por los productores de los viveros en estudio, se encontró que el más utilizado es BIODie con un 80% de uso, seguido por Abamectina 1.8 EC con 15% de uso y Tigre 25 EC con 12% de uso, los cuales son utilizados para el control de *D. citri*, minador de la hoja y otros insectos (Figura 11).

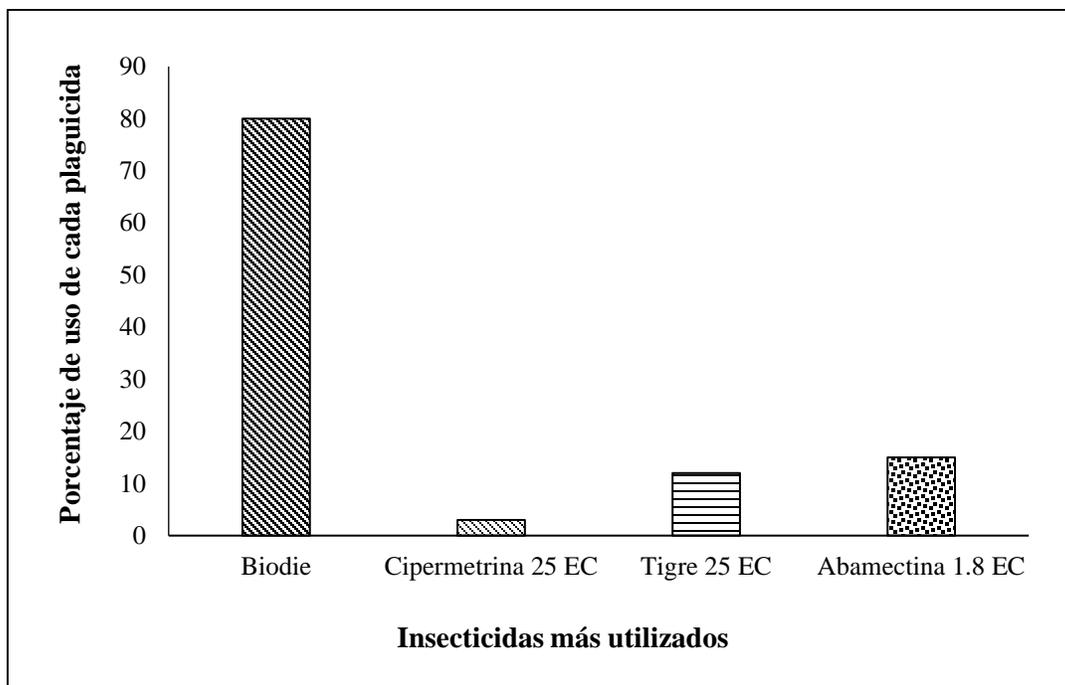


Figura 11. Porcentaje de uso de insecticidas en los viveros de cítricos.

Los resultados de la encuesta también indicaron que en los viveros El Diamante y Campos Azules 2, se hicieron aplicaciones de plaguicidas con mayor frecuencia (16 en total), coincidiendo en promedio con la baja presencia de *D. citri* (5 y 7 respectivamente); seguido por el vivero El Román (8 aplicaciones) y un promedio total de 15 capturas y en menor frecuencia el vivero Campos Azules 1 (6 aplicaciones) y un promedio total de 11 capturas (Figura 12).

En los viveros donde se realizó una mayor cantidad de aplicaciones las poblaciones de *D. citri* son más bajas, por lo tanto, es notorio el efecto que tienen las aplicaciones de plaguicidas sobre la reducción en las poblaciones de *D. citri* (Figura 12).

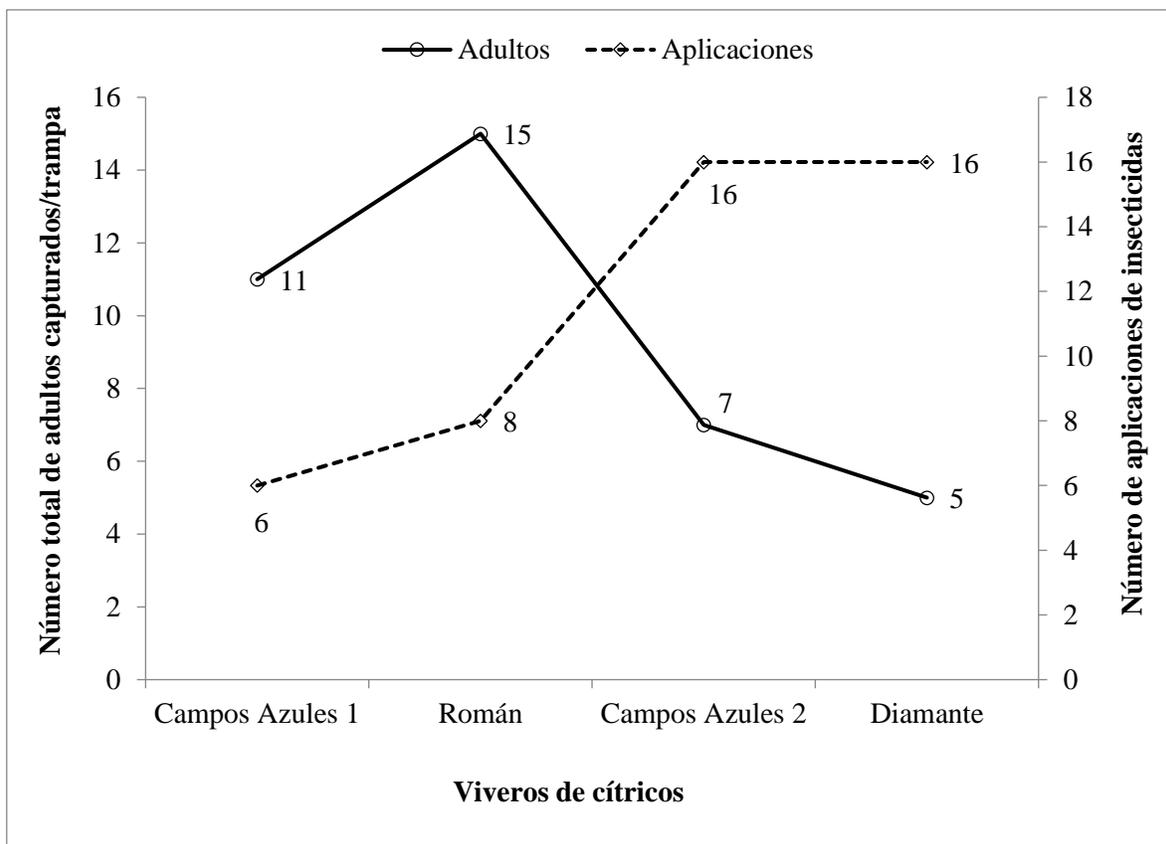


Figura 12. Relación entre el número de aplicaciones de insecticidas y el número total de adultos capturados por trampa en cada uno de los viveros en estudio.

En los últimos años se han propuesto estrategias para controlar a *D. citri*, sin embargo, el control químico es el método que ha mantenido las poblaciones del insecto más bajas y seguirá usándose a través de los años (Ruiz-Galvan *et al.*, 2015). El control químico se dirige principalmente hacia el vivero, plantaciones de fomento y plantaciones jóvenes, puesto que los árboles maduros soportan mejor los daños causados por el vector (Alemán *et al.*, 2007).

En los viveros donde se realizó una mayor cantidad de aplicaciones las poblaciones de *D. citri* fueron más bajas, por lo tanto, es notorio el efecto que tienen las aplicaciones de plaguicidas sobre la reducción en las poblaciones de *D. citri* (Figura 12). Sin embargo, en una investigación realizada por Cortez *et al.*, (2010) indican que los insecticidas de contacto y sistémicos pertenecientes a diferentes grupos toxicológicos, han logrado disminuir las poblaciones de *D. citri*, en dependencia del uso oportuno de cada uno.

Para establecer una relación estadística entre el número de aplicaciones de insecticidas y el número de adultos capturado de *D. citri*, en el presente estudio, se realizó un análisis de regresión el cual corrobora que la frecuencia con que se aplican los insecticidas determina la fluctuación poblacional del vector *D. citri*. Por consiguiente, a mayor número de aplicaciones, la cantidad de adultos capturados disminuyó de forma considerable (Figura 13).

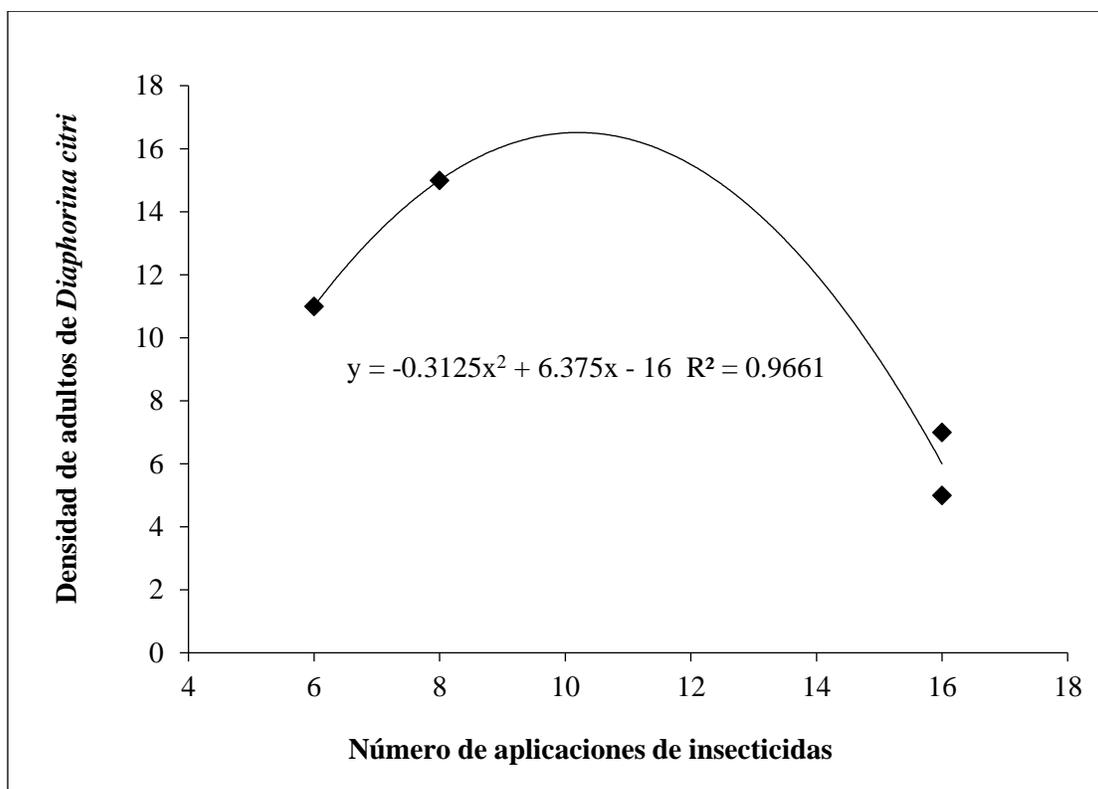


Figura 13. Relación entre el número de aplicaciones de insecticidas y la densidad de adultos del vector del HLB, *Diaphorina citri*, en los viveros estudiados.

4.4. Patrón de dispersión de *Diaphorina citri*

En todos los meses, el Índice de dispersión (ID) fue mayor de 1, lo cual indica que el patrón de dispersión de los adultos de *D. citri* fue agregado. Se obtuvo una probabilidad altamente significativa para ese Índice en los meses de febrero marzo y abril ($P < 0.0001$; $\alpha = 0.05$), pero no en el mes de mayo ($P = 0.186$; $\alpha = 0.05$) (Cuadro 3). La distribución binomial negativa (DBN) suministró un buen ajuste a los datos de frecuencia observados y por lo tanto el arreglo espacial de los adultos en los viveros fue agregado en los meses de febrero, abril y

mayo [$P(\chi^2) \geq 0.05$]. Solamente en el mes de marzo se encontró un parón de dispersión aleatorio [$P(\chi^2) \leq 0.05$].

Cuadro 3. Parámetros de dispersión utilizados para estimar el patrón de dispersión de *D. citri* en un período de cuatro meses en cuatro viveros de cítricos del departamento de Masaya.

Parámetros de dispersión	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
Media muestral (\bar{x})	4	4.60	14.6	9.6
Varianza muestral (s^2)	16.27	13.6	90.53	12.53
Índice de dispersión (ID)	4.07	2.98	6.22	1.31
$P(\chi^2)$ del ID	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.186
Binomial negativa (BN)	10.46	11.29	4.53	5.43
$P(\chi^2)$ de la BN	0.107	0.023	0.87	0.80
Patrón de dispersión	Agregado	Aleatorio	Agregado	Agregado

P = probabilidad ($\alpha = 0.05$)

Los patrones de agregación del vector *D. citri* encontrados en el presente estudio también han sido registrados en otros lugares del mundo (Bayles *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2010; Hernández-Landa *et al.*, 2013; Sétamuo y Bartels, 2015) en plantaciones de cítricos jóvenes y maduras. Sin embargo, en Nicaragua este es el primer reporte del patrón de dispersión del vector del huanglongbing bajo condiciones de vivero.

El desarrollo de estrategias efectivas de manejo de plagas insectiles requiere de un mejor entendimiento de los patrones de distribución espacial de estas plagas dentro de los agroecosistemas (Thomas *et al.*, 2001). El patrón de dispersión del psílido asiático de los cítricos (PAC) en muchas regiones cítricas del mundo, incluyendo Nicaragua, ha sido poco estudiado. Por consiguiente, la develación de los patrones espaciales de este vector económicamente importante es de mucha relevancia para el desarrollo de un programa efectivo de manejo. Hasta ahora, el control del PAC se ha limitado mayoritariamente al uso de insecticidas aplicados a toda la plantación de cítricos, sin tener en cuenta aspectos tan importantes como la localización del PAC dentro de la plantación, el comienzo de la colonización de la plantación por parte del PAC y el progreso de las poblaciones del vector durante la temporada del cultivo.

V. CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* a través de la prueba de PCR en los cuatro viveros estudiados.
- El psílido asiático de los cítricos, *D. citri*, se presentó durante las dieciséis fechas de estudio, presentando sus picos poblacionales más altos en los meses de marzo y abril, concordando con las altas temperaturas y las bajas precipitaciones.
- En los viveros donde se realizó una mayor cantidad de aplicaciones insecticidas químicas las poblaciones de *D. citri* fueron más bajas.
- El patrón de dispersión de los adultos de *D. citri* en los viveros fue agregado en los meses de febrero, abril y mayo, mientras que en el mes de marzo fue aleatorio.

VI. RECOMENDACIONES

- Es importante continuar con los estudios de fluctuación poblacional y de patrones de distribución espacial de *D. citri* tanto en el departamento de Masaya como en otras zonas citrícolas del país, tomando en cuenta superficies mayores, plantaciones de mayor edad y períodos de estudio más largos, con el fin de corroborar los resultados aquí obtenidos y conocer el comportamiento del psilido, así como las épocas más apropiadas para su control.
- Llevar a cabo estudios posteriores donde se incluya la detección del agente causal del HLB en los adultos y ninfas del vector *Diaphorina citri*.
- Realizar estudios de detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter* no solamente en follaje de las plantas de cítricos, sino también en sus raíces.

VII. LITERATURA CITADA

- Ahmad, K., Sijam, K., Hashim, H., Abdu, A., Rosli, Z., 2010. Assessment of Citrus susceptibility towards *Candidatus Liberibacter Asiaticus*-Terengganu isolate based on vector and graft transmission tests. *Journal of Agricultural Science* 3:159-166.
- Alemán, J, Baños, H., y Ravelo, J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista de Protección Vegetal* 22:154-165.
- Arredondo Valdés, R., Delgado Ortiz, J.C., Beltrán Beache, M., Anguiano Cabello, J., Cerna Chávez, E., Rodríguez Pagaza, Y., and Ochoa Fuentes, Y.M. 2016. A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Canadian Journal of Microbiology* 62:803-811.
- Bastianel, C., M. Garnier-Semancik, J. Renaudin, J. M. Bové, and S. Eveillard, 2005. Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” based on the *omp* Gene Sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6473-6478.
- Bayles, B.R., Thomas, S.M., Simmons, G.S., Grafton-Cardwell, E.E., Daugherty, M.P. 2017. Spatiotemporal dynamics of the Southern California Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) invasion. *PLoS ONE* 12(3): e0173226.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.
- Bové, J. M., and A., Ayres. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* 59: 346-354.
- Chávez-Medina, J.A., Flores-Zamora, L.F., Góngora-Gómez, A.M., Gómez Peraza, R.L. y Cristino Baruch García-Negroe, C.B. 2016. Distribución temporal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en el municipio de Sinaloa, Sinaloa. *Entomología Mexicana* 3:324-329.
- Childers, C. C., Simms, M. K. & Threlkeld, D. K. 2002. Evaluation of insecticides for control of Asian citrus psylla (ACP) on Florida citrus, 2001. *Arthropods Management Tests* 27: D2.
- Coletta-Filho, Targon, M. L., P. N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu Jr., J., 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.

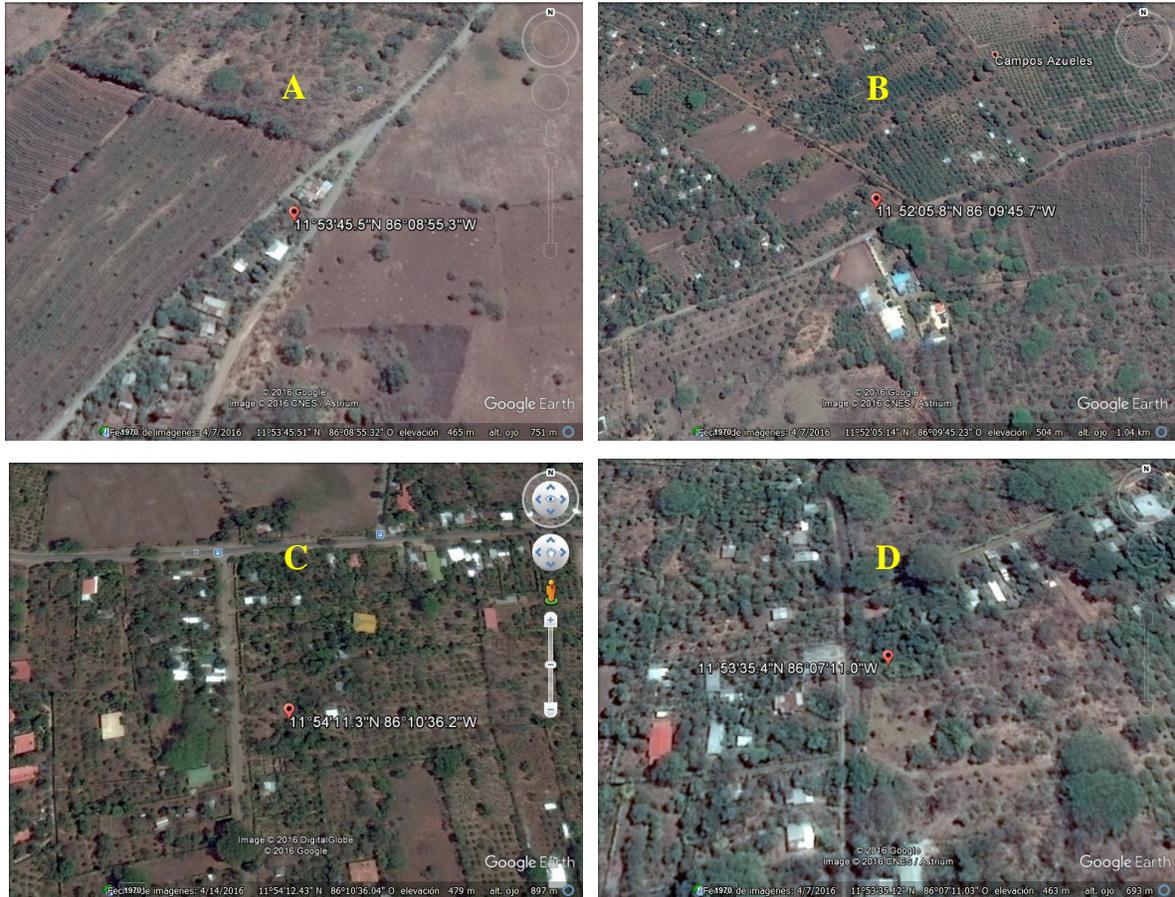
- Cortez, M. E., López A., J. I., Hernández, L. M., Fú, A. & Loera, J. 2010. Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama en cítricos dulces, en México. Selección de insecticidas y época de aplicación. Folleto técnico No.35 INIFAP- SAGARPA
- Costa, M.G., Barbosa, J.C., Yamamoto, P.T., Leal, R.M. 2010. Spatial distribution of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. Sci. Agric. (Piracicaba, Brazil) 67:546-554.
- Ding, F., Duan, Y., Paul, C., Brlansky, R.H., Hartung, J.S. 2015. Localization and distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus and periwinkle by Direct Tissue Blot Immuno Assay with an Anti-OmpA Polyclonal Antibody. PLoS ONE 10(5): e0123939.
- Fujikawa, T., and Iwanami, T. 2012. Sensitive and robust detection of citrus greening (huanglongbing) bacterium “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” by DNA amplification with new 16S rDNA specific primers. Molecular and Cellular Probes 26:194-197.
- García, Y., Ram, Y.P., Sotel, P.A., Kond, O.M. y Takumasa, 2016. Biología de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) bajo condiciones de invernadero en Palmira, Colombia. Revista Colombiana de Entomología 42:36-42.
- Garnier, M., & Bové, J. M. 2000. Huanglongbing in Cambodia, Laos, and Myanmar. In: Proceedings of 14th Conference IOCV, IOCV, Riverside, 2000. pp. 378-380.
- Grafton-Cardwell, E. E., Stelinski, L. L., and Stansly P. A., 2013. Biology and Management of Asian Citrus Psyllid, Vector of the Huanglongbing Pathogens. The Annual Review of Entomology 58:413–32.
- Gottwald, T.R. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. Annual Review of Phytopathology 48:119-139.
- Halbert, S. E., and 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.
- Hall, D. G., Hentz, M. G., y Adair Jr., R. C. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. Environmental Entomology 37:914-924.
- Hartung, J. S., Halbert, S. E., Pelz-Stelinski, K., Brlansky, R. H., Chen, C., and Gmitter, F. G. 2010. Lack of evidence for transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ through citrus seed taken from affected fruit. Plant Disease 94:1200-1205.
- Hernández-Landa, L., López-Collado, J., García-García, C.G., Osorio-Acosta, F., Nava-

- Tablada, M.E. 2013. Dinámica espacio-temporal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en *Murraya paniculata* (L.) Jack en Cuitláhuac, Veracruz. *Acta Zoológica Mexicana* 29:334-345.
- Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J.M., Garnier, M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and Cellular Probes* 13:373–379.
- Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology* 147:599-604.
- Hung, T.H., Hung, S.C., Chen, C.N., Hsu, M.H., Su, H.J. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllid: application to the study of vector pathogen relationships. *Plant Pathology* 53:96-102.
- InfoStat. 2008. InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina. 334 p.
- Lacayo, L.N. 2013. Cítricos amenazados. Consultado 25 mayo 2016. Disponible en: <http://www.elnuevodiario.com.ni/economia/288686-citricos-amenazados/>.
- Lee, J.A., Halbert, S.E., Dawson, W.O., Robertson, C.J., Keesling, J.E., and Singer, B.H. 2015. Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. *PNAS* 112:7605-7610.
- Li, W., Hartung, J. S., and Levy, L. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “*Candidatus Liberibacter* species” associated with citrus huanglongbing. *Plant Disease* 91:51-58.
- Liu, Y.H., and Tsai, J.H. 2000. Effects of temperature on biology and table life parameters of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology* 137:201-206.
- Lopes, S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Fernandes, N. G., and Cambra, M. 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. *Phytopathology* 99:301-306.
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J.I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Gutiérrez-Espinosa A., y Loeza-Kuk E. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32:108-119.

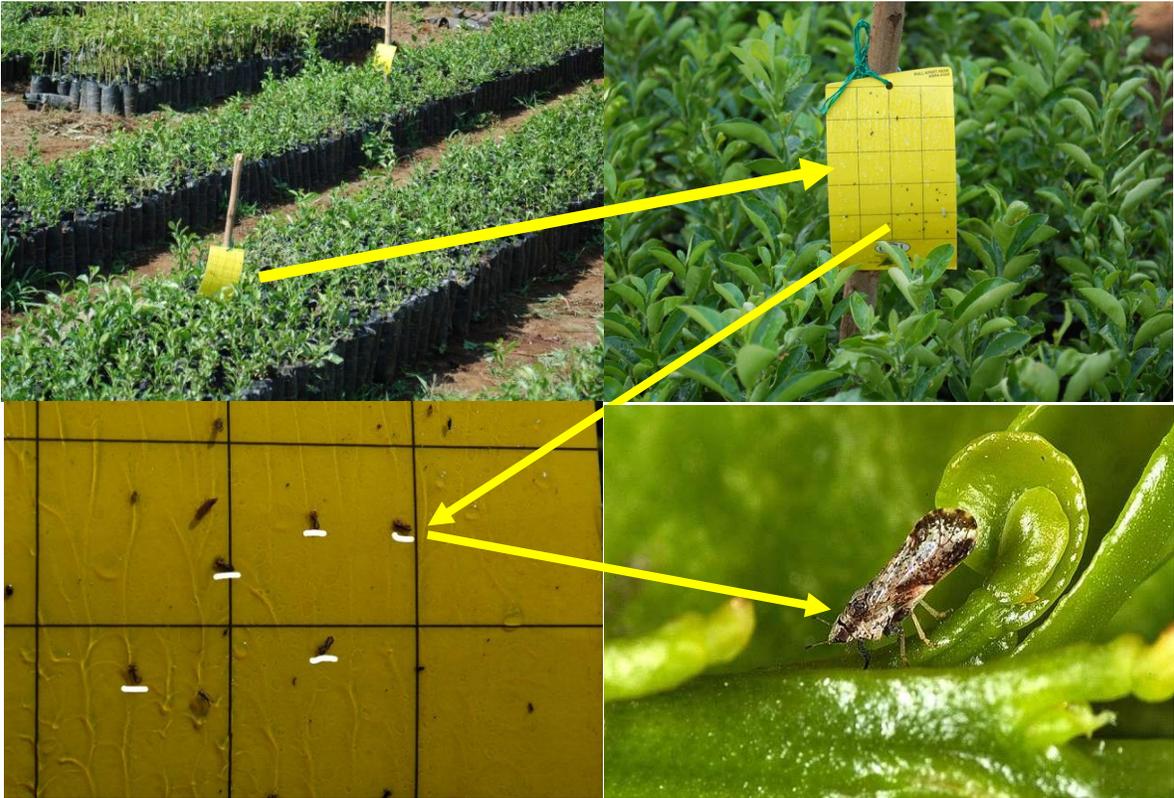
- Moreno, P. M., Pozo, V. E., Valdés, H. R. y Cárdenas, M.M. 2008. Distribución espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) sobre lima persa (*Citrus latifolia* Tanaka). *Fitosanidad*, 12:33-37.
- Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Ramírez-Reyes, A. J. y E. E. Mendoza-García. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemíptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazones, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* 29:317-333.
- Qureshi, J. A., Rogers, M. E., Hall, G. D. and A. P. Stansly. 2009. Incidence of invasive *Diaphorina citri* (Hemíptera: Psyllidae) and its introduced parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Florida citrus. *Journal of Economic Entomology* 102: 247-256.
- Ruiz-Galván, Isabel, Bautista-Martínez, N., Sánchez-Arroyo, H., Valenzuela Escoboz, F.A. 2015. Control Químico de *Diaphorina Citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) En Lima Persa. *Acta Zoológica Mexicana* 31:41-47.
- Sétamou, M., and Bartels, D.W. 2015. Living on the Edges: Spatial niche occupation of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in Citrus Groves. *PLoS ONE* 10(7):e0131917.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 2012. *Biometry*. 4th Edition. W.H. Freeman. New York. 960 p.
- Stansly, P. A. & Qureshi, J. A. 2007. Insecticidal control of Asian citrus psyllid through foliar applications on orange, 2006. *Arthropod Management Tests* 32:D10.
- Thomas, C.F.G., Parkinson, L., Griffiths, G.J.K., Garcia, A.F., and Marshall, E.J.P. 2001. Aggregation and temporal stability of carabid beetle distributions in field and hedgerow habitats. *Journal of Applied Ecology* 38:100-116.
- Tsai J. H., Wang, J. J. & Liu, Y. H. 2002. Seasonal abundance of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist* 85:446-451.
- Ukuda-Hosokawa, R., Sadoyama, Y., Kishaba, M. 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 and Environmental Microbiology* 81:3728-3736.
- Yamamoto, P. T., Felipe, M.R., Garbim, L.F., Coelho, J.H.C., Ximenes, N.L., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Sousa, M.C., Abrahão, D.P., Braz, J.D. 2006. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. *Proc. Huanglongbing Greening International Workshop*, Ribeirão Preto. p. 96.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Vista satelital de los lugares donde estaban establecidos que se incluyeron en la investigación: Campos Azules 1 (A), Campos Azules 2 (B), El Román (C) y El Diamante (D).



Anexo 2. Captura de adultos de *Diaphorina citri* con trampas amarillas Semiotrap en viveros de cítricos.



Anexo 3. Encuesta realizada a los propietarios y encargados de los viveros donde se realizó la investigación.

Nombre del vivero _____	Localidad _____
Nombre del Productor _____	Fecha: _____
Hora de comienzo: __ : __	Hora de finalización: __ : __

1. ¿Usted Utiliza productos químicos para combatir plagas en su vivero?

 SI NO

si la repuesta es No (especifique)

2. ¿Qué tipo de producto Utiliza?

3. ¿Nombre comercial del producto e Ingrediente Activo?

4. ¿Dosis y frecuencia con que aplica el Producto?

5. ¿Para qué tipo de plagas aplica este producto?

6. ¿Cuál es el modo de aplicación de este producto?

Anexo 4. Análisis de varianza para el número promedio de adultos capturados de *D. citri*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Adultos	64	0.71	0.59	65.66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4121.53	18	228.97	6.06	<0.0001
Vivero	965.55	3	321.85	8.52	0.0001
Semana	3155.98	15	210.40	5.57	<0.0001
Error	1699.20	45	37.76		
Total	5820.73	63			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.79573

Error: 37.7601 gl: 45

Vivero	Medias	n	E.E.	
Diamante	4.88	16	1.54	A
Erick	6.81	16	1.54	A B
Róger	10.75	16	1.54	B C
Román	15.00	16	1.54	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=15.75247

Error: 37.7601 gl: 45

Semana	Medias	n	E.E.	
6.00	1.75	4	3.07	A
7.00	2.75	4	3.07	A
1.00	2.75	4	3.07	A
4.00	3.00	4	3.07	A
5.00	4.25	4	3.07	A B
2.00	4.50	4	3.07	A B
3.00	5.75	4	3.07	A B
13.00	8.50	4	3.07	A B
14.00	9.25	4	3.07	A B
16.00	9.75	4	3.07	A B
12.00	10.00	4	3.07	A B
15.00	10.75	4	3.07	A B
10.00	11.50	4	3.07	A B
11.00	17.00	4	3.07	A B C
9.00	19.75	4	3.07	B C
8.00	28.50	4	3.07	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5. Fotografías de adultos (A), ninfas (B) y huevos (C y D) observados en laboratorio con ayuda de microscopio en brotes recolectados en campo. Las fotografías son propiedad del autor de esta investigación.

