

Nota de Investigación

PRESENCIA DE NEMATODOS EN PATRONES DE CÍTRICOS EN ISABELA, PUERTO RICO^{1,2}

Laura Vásquez-Rojas³, Rebecca Tirado-Corbalá^{4}, Roberto Vargas-Ayala⁵,
Elvin Román-Paoli⁵ y Dania Rivera-Ocasio⁴*

J. Agric. Univ. P.R. 102 (1-2):107-112 (2018)

Los cítricos (*Citrus* spp.) son cultivos de importancia mundial. Para satisfacer la mayor demanda de fruta fresca y de sus derivados, ocasionada por el aumento poblacional, se ha incrementado la superficie sembrada (FAOSTAT, 2018; Spreen, 2001). Los principales países productores de cítricos son China, Brasil, Estados Unidos, México y España, con producciones de 27,370; 16,361; 10,131; 6,370 y 6,312 miles de toneladas, respectivamente (Dansa, 2013). Durante el período fiscal 2013-2014, las siembras de cítricos en Puerto Rico ocuparon una superficie de 39,370 hectáreas en el área central de la isla; el valor de la producción alcanzó \$14.2 millones, comprendido entre naranjas, limones y toronjas principalmente (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2018).

Los cítricos han sido amenazados por varias plagas y enfermedades, destacando una amplia población patogénica de virus, hongos, bacterias, insectos y nematodos, ocasionando pérdidas económicas considerables (Mc Bride et al., 2010). Dentro de los nematodos fitoparásitos asociados a este cultivo, el *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb) Thorne es la especie de mayor presencia e importancia económica en América, Asia, Europa y Australia (Crozzoli et al., 1997; Gené et al., 2005; Verdejo, 1992). En Puerto Rico, el nematodo se reportó ocasionando clorosis y enanismo en arbolitos de cítricos en un vivero (Román, 1978).

El nematodo de los cítricos tiene un hábito semiendoparasítico sedentario y se alimenta mayormente en las células corticales de las raíces (El-Borai et al., 2002; Coyne et al., 2010; Crozzoli, 2002). En Venezuela, se han reportado pérdidas en la producción de hasta un 37% (Crozzoli y González, 1989), esto debido a que provoca un decaimiento lento de la planta, clorosis, pérdida de vigor, reducción en tamaño y peso de los frutos (Duncan, 2005; Irshad et al., 2012).

La finalidad de esta investigación fue cuantificar e identificar diferentes grupos de nematodos en huertos de lima 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tan) y mandarina 'Nova' (*Citrus reticulata*) injertadas sobre varios patrones de cítricos. Ambos huertos se establecieron

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 23 de marzo de 2018.

²Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Alimentos y Agricultura (NIFA, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura Federal, Proyecto Hatch-94Q.

³Ex-estudiante graduada, Departamento de Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, PR.

⁴Catedrática Asociada, Departamento de Ciencias Agroambientales, Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR 00681. *Autor para correspondencia, Tel. 787-370-9179, E-mail: rebecca.tirado@upr.edu.

⁵Catedrático, Departamento de Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, PR.

en el 2009 en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela de la Universidad de Puerto Rico en un suelo del orden Oxisol de la serie Coto (muy fino, caolínico, isohiper-térmico Típico Hapludox) (Muñoz et al., 2018). La Subestación de Isabela está localizada al noroeste de la isla, a una altura de 128 metros sobre el nivel del mar.

Los patrones muestreados en el huerto de lima 'Tahití' fueron 'Carrizo' (*Citrus sine-sis x Poncirus trifoliata*), 'Limón de Cabro' (*Citrus jambhiri*), 'HRS 812' (Sunki mandarin, *Citrus reticulata x Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), 'HRS 896' (Cleopatra mandarin x Rubidoux trifoliata orange) y 'Swingle' (*Citrus paradisi x Poncirus trifoliata*). Los patrones muestreados en el huerto de mandarina 'Nova' fueron 'Carrizo', 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan), 'Limón de Cabro', 'HRS 812' y 'Swingle'. En los dos huertos, los árboles estaban sembrados arreglados en un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Durante los 18 meses que duró la investigación no se aplicaron nematocidas.

Se realizaron dos muestreos de raíces y suelo en julio del 2015 y 2016. Para determinar la población de nematodos, se colectaron 200 g de raíces (con un diámetro de 0.5 a 1 cm) a una profundidad de 20 a 30 cm. Para la recolección de muestras de suelo, se utilizó un barreno a una profundidad de 30 cm, se descartaron los primeros 5 cm para eliminar el efecto de malezas y se colocó alrededor de 500 g de suelo en una funda plástica. Las muestras de raíces y/o suelo en campo se colocaron en una nevera provista con hielo para mantener una temperatura de 10 a 15 °C.

En el Laboratorio de Nematología del Recinto Universitario de Mayagüez, de la Universidad de Puerto Rico, se realizó la extracción de nematodos fitoparasíticos y de vida libre presentes en el suelo mediante el método de embudo de Baermann, adaptado de Christie y Perry (Conce et al., 2016; Vargas et al., 2008). Se colocaron 250 g de suelo en un tamiz de 149 µm y debajo de este se colocó un tamiz de 45 µm. Para cada muestra, se lavó el suelo con agua del grifo hasta que se observara que saliera agua limpia a través de los tamices. Los tamices tenían una inclinación de 45° para evitar la pérdida de nematodos. Finalmente, con una espátula y una botella de lavado se colocó la suspensión del tamiz (45 µm) en el embudo Baermann con una rejilla metálica y un papel toalla húmedo (Kimwipes®, KimtechScience, E.E.U.U)⁶. Las muestras se dejaron reposar por 48 horas, luego se extrajeron los nematodos de la parte inferior del embudo y se recolectaron en un tubo de 8 ml. Las muestras en los tubos de 8 ml se dejaron reposar por 48 horas adicionales. Transcurrido este tiempo, se descartaron 4 ml de cada tubo y el volumen restante se calentó, por medio de baño María a 80° C por ocho minutos; los nematodos se preservaron añadiendo una solución de 4 ml de formaldehído al 5%.

Para extracción de los nematodos en las raíces, estas se lavaron con agua del grifo para eliminar las partículas de suelo y se cortaron a 1 cm de longitud. Se pesaron 10 g de raíces y se colocaron en una licuadora con 10 ml de agua por 10 segundos (Crozzoli et al., 1997). Posteriormente, la solución se filtró por los dos tamices (149 y 45 µm) con una inclinación de 45° y se lavó con agua del grifo hasta que se observara el agua limpia a través de los tamices. El tejido que quedó en el tamiz de 45 µm se colocó en un embudo Baermann que tenía una rejilla metálica con un papel de toalla húmedo y este se dejó reposar por 48 horas. Se tomaron 8 ml de la parte inferior del embudo. Transcurridas 48 horas adicionales se fijaron los nematodos según descrito anteriormente. Se utilizaron claves taxonómicas pictóricas para la identificación de los grupos funcionales de nematodos fitoparásitos y de vida libre (Mai y Mullin, 1975), utilizando un estereoscopio

⁶Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

CUADRO 1.—Identificación de grupos de nematodos en los huertos de mandarina 'Nova' y lima 'Tahiti' injertadas en cinco patrones de cítricos en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, 2015-2016.

Huerto	Patrón	Familia de nematodos predominantes	Promedio de nematodos No./250 g suelo	Hábito alimenticio	
Mandarina 'Nova'	'Carrizo'	Hoplolamidae <i>Rotylenchulus</i> sp.	57	Fitoparásito	
	'HRS 812'	Dorylaimidae	33	Omnívoro	
	'HRS 896'	Hoplolamidae	49	Fitoparásito	
	'Limón de Cabro'		<i>Rotylenchulus</i> sp.	58	Endoparasítico migratorio
			Pratylenchidae		
		'Swingle'	<i>Pratylenchus</i> sp. Aphelenchoitidae	46	Micófago
Lima 'Tahiti'	'Carrizo'	Rhabditidae	50	Bacteriófago	
	'HRS 812'	Hoplolamidae	14	Fitoparásito	
	'Cleopatra'		<i>Rotylenchulus</i> sp.	31	Omnívoro
			Dorylaimidae		
		'Limón de Cabro'	Rhabditidae	57	Bacteriófago
	'Swingle'				

(Leica®, Leica Zoom 2000, Modelo Z45V, EE.UU.) y un microscopio compuesto (Olympus U-TV1X-2, Tokio, Japón).

Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos de cuantificación de nematodos. Estos se sometieron a un análisis de varianza ($P < 0.05$) utilizando el programa estadístico “Infostat Professional” 2017 (Di Rienzo et al., 2017). Al obtener diferencias significativas, se realizó una separación de medias según Tukey.

En las muestras de raíces, tomadas en el 2015, de los huertos con los patrones lima ‘Tahití’ y mandarina ‘Nova’ no se encontró ni el nematodo de los cítricos (*T. semipenetrans*) ni otros nematodos parasíticos reportados en cítricos, tales como *Belanolaimus longicaudatus*, *Pratylenchus coffeae*, *P. brachyurus*, *Radopholus similis*, *Xiphinema vulgare* y *X. americanum* (Duncan, 2005; Rivas et al., 2002). Resultados similares fueron reportados por Crozzoli et al. (1997), donde no se obtuvo el nematodo *T. semipenetrans* en muestras de citrumelo ‘Swingle’ en los valles altos de Carabobo y Yaracuy en Venezuela. Mashela et al. (1992), Crozzoli y González (1989) y Duncan y Eissenstat (1993) han evidenciado que ciertos patrones de cítricos como ‘Swingle’ y *P. trifoliata* son resistentes a la presencia de este nematodo.

Las muestras de suelo tomadas en los años 2015 y 2016 en ambos huertos de cítricos no mostraron presencia de nematodos parasíticos. Iqbal et al. (2007) y Kayani et al. (2012) demostraron que el pH del suelo es uno de los factores limitantes para el desarrollo de este nematodo. En comparación con suelos alcalinos, en suelos ácidos las poblaciones son inferiores, correspondiendo al pH de suelo presente en el sitio de estudio (~4.5 a 5.2) (Tirado Corbalá et al., 2018). Otro factor que limita la presencia y supervivencia de este nematodo es el tipo de patrón (Iqbal et al., 2005; Rivas et al., 2002).

En general, para los dos años de muestreo de suelo (2015 y 2016) se encontraron nematodos de vida libre en mayor proporción que los fitoparásitos (Cuadro 1). Los nematodos más abundantes identificados en ambos huertos fueron de vida libre y pertenecían a las familias Rhabditidae (en los patrones ‘Carrizo’, ‘HRS 896’ y ‘Swingle’) y Dorylaimidae (‘HRS 812’). Wachira et al. (2009) sostienen que un aumento de la población de nematodos de vida libre (bacteriófagos, micófitos, omnívoros y depredadores) está asociado al contenido de materia orgánica en el suelo. Estudios realizados por Tirado-Corbalá et al. (2018) en ambos predios encontraron un contenido de materia orgánica entre 4.5 y 5.9%.

Los nematodos parásitos con mayor presencia fueron de las familias Hoplolaimidae y Pratylenchidae (‘Carrizo’, ‘HRS 812’, ‘HRS 896’ y ‘Limón de Cabro’), coincidiendo con las especies fitoparasíticas reportadas por Rivas et al. (2002) en cultivos de cítricos en

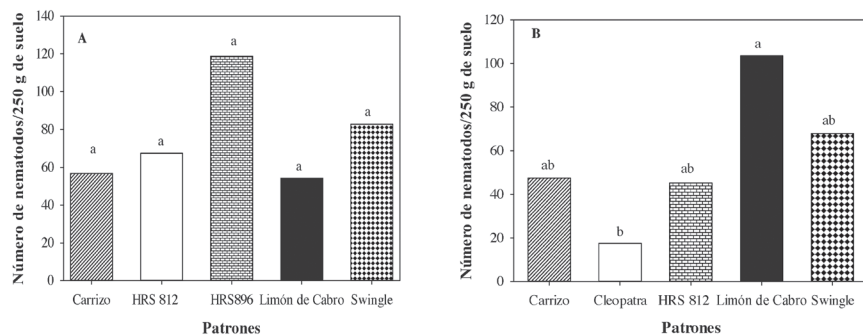


FIGURA 1. Promedio de nematodos de vida libre en huerto, año 2016: A) mandarina ‘Nova’ y B) lima ‘Tahití’ en Isabela, Puerto Rico, injertadas en cinco patrones. Columnas con letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

El Salvador y las reportadas por Junior et al. (2011) en Brasil (Cuadro 1). En nuestro estudio, los patrones que no presentaron ataque de nematodos fueron 'Carrizo', 'Cleopatra' y 'Swingle'.

Cuando se realizó el análisis de nematodos de vida libre en ambos huertos para el año 2016, se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los patrones Limón de Cabro y Cleopatra en el huerto de lima 'Tahiti'; mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes patrones en el huerto de mandarina 'Nova' (Figura 1).

En conclusión, en las muestras procesadas, tanto de raíces como de suelo, de los huertos de lima 'Tahiti' y de mandarina 'Nova' en el 2015 y 2016, no se detectó el nematodo de los cítricos (*T. semipenetrans*). Por otro lado, al cuantificar el número de nematodos totales en los dos huertos, se observaron bajas poblaciones de nematodos, lo cual puede estar asociado al déficit de humedad del suelo debido a la ausencia de lluvia en los meses de muestreo (junio 2015 y junio 2016).

LITERATURA CITADA

- Conce, M., J. Chavarría, L. Rivera, P. Morales y R. Macchiavelli, 2016. Prácticas agrícolas para el manejo de nematodos fitoparásitos en plátano (*Musa* spp., AAB): Efecto sobre la actividad microbiológica del suelo. Tesis para Maestría en Ciencias en Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico. p. 1-111.
- Coyne, D. L., J. M. Nicol y B. Claudius-Cole, 2010. Practical Plant Nematology: A Field and Laboratory Guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- Crozzoli, R., 2002. Especies de nematodos fitoparásitos en Venezuela. *Interciencia* 27 (7): 354-364.
- Crozzoli, R., D. Rivas, N. Greco, L. Montes y K. Gómez, 1997. Presencia de *Tylenchulus semipenetrans* en las principales zonas productoras de cítricos de los valles altos de los estados Carabobo y Yaracuy, Venezuela. *Nematología Mediterránea* 25: 151-154.
- Crozzoli, R. y A. González, 1989. Reacción de once patrones de cítricos al nematodo *Tylenchulus semipenetrans*. *Agronomía Tropical* 39 (4-6): 269-279.
- Dansa, A., 2013. Perfil de mercados de cítricos. Dirección de mercados agrícolas. Área de mercado de frutas. Consultado el 10.03.2015. Disponible en: www.minagri.gob.ar/new/00/programas/dma/frutas/perfil_cC3ADtricos_2013.pdf.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico. Inventario de estadística, Oficina de Estadísticas agrícolas. Accesado 4 de marzo de 2018. Disponible en: www.pr.gov/agencias/Agricultura/estad%C3%ADsticas/Documents/Estad%C3%ADsticas/IBA%202009-2014%20final.pdf
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. W. Robledo, 2017. Infostat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. www.infostat.com.ar
- Duncan, L. W. y D. M. Eissenstat, 1993. Responses of *Tylenchulus semipenetrans* to citrus fruit removal: Implications for carbohydrate competition. *Journal of Nematology* 25(1):7-14.
- Duncan, L. W., 2005. Nematodes parasites on citrus. p. 321-346 En: M. Luc, R. A. Sikora, y J. Bridge, eds. Plant-parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, England: CAB International.
- El-Borai, F. E., L. W. Duncan y J. H. Graham, 2002. Infection of citrus roots by *Tylenchulus semipenetrans* reduces root infection by *Phytophthora nicotianae*. *Journal of Nematology* 34(4): 384-389.
- FAOSTAT, 2018. Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas. Estadísticas de producción mundial de aguacate del año 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Gené, J., S. Verdejo-Lucas, A. S. Stchigel, F. J. Sorribas y J. Guarro, 2005. Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. *Biocontrol Science and Technology* 15(7): 721-731.

- Iqbal, M. A., T. Mukhtar y R. Ahmad, 2007. Effect of soil types on the movement and infection of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. *Pakistan Journal of Nematology* 25(1): 69-72.
- Iqbal, M. A., T. Mukhtar, R. Ahmad y H. Khan, 2005. Relative susceptibility/ resistance of citrus rootstocks to citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*). *Pakistan Journal of Nematology* 23(2): 311-315.
- Irshad, U., T. Mukhtar, M. Ashfaq, M. Z. Kayani, S. B. Kayani, M. Hanif y S. Aslam, 2012. Pathogenicity of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) on *Citrus jambhiri*. *Journal of Animal & Plant Sciences* 22 (4): 1014-1018.
- Junior, M. F., C. Oliveira y M. Inomoto, 2011. Reação de porta-enxertos cítricos à população K5 de *Pratylenchus jaehni*. *Tropical Plant Pathology* 36(2): 125-128.
- Kayani, M. Z., T. Mukhtar y M. A. Hussain, 2012. Association of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with cucumber in the Pothwar region of the Punjab province of Pakistan. *International Journal of Biotechnology and Biotechnology* 9(1-2): 23-29.
- Mai, W. F. y P. G. Mullin, 1975. Plant Parasitic Nematodes, a Pictorial Key to Genera. Cornell University. 4th edition. p. 276.
- Mashela, P., L. Duncan y R. McSorley, 1992. Salinity reduces resistance to *Tylenchulus semipenetrans* in citrus rootstocks. *Nematropica* 22(1): 7-12.
- Mc Bride, S., R. French, G. Schuster y K. Ong, 2010. Citrus disease guide. The quick ID guide to emerging diseases of Texas Citrus. USDA-Citrus Health Response Program. Disponible en: www.agr.state.tx.us
- Muñoz, M. A., W. I. Lugo, C. Santiago, M. Matos, S. Ríos y J. Lugo, 2018. Taxonomic Classification of the Soils of Puerto Rico, 2017. Bulletin 313. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus. Colegio de Ciencias Agrícolas, Estación Experimental Agrícola, San Juan, Puerto Rico. 73 p.
- Rivas, A., J. Sermeño, M. Paniagua y J. Villacorta, 2005. Manual técnico: nematodos asociados a limón pérsico y otros cítricos en fincas de El Salvador. Universidad de El Salvador. p. 1 - 48.
- Román, J., 1978. Fitonematología Tropical. Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico - Mayagüez. Río Piedras, P.R. 256 pp.
- Spreen, T., 2001. Proyecciones de la producción y consumo mundial de los cítricos para el 2010. FAO Simposio sobre cítricos. China. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-x6732s/x6732s03.pdf>
- Tirado-Corbalá, R., D. Rivera-Ocasio, A. Segarra-Carmona, E. Román-Paoli y A. González, 2018. Performance of two Citrus species grafted in different rootstocks in presence of Citrus Greening in Puerto Rico. *Horticulturae* 4(4)38.
- Van Gundy, S. D. y J. P. Martin, 1961. Influence of *Tylenchulus semipenetrans* on the growth and chemical composition of sweet orange seedlings in soils of various exchangeable cation ratios. *Phytopathology* 51: 146-151.
- Vargas, H., T. Hernández, J. Durán, C. Muñoz, F. Gómez y A. Gadea, 2008. Identificación, cuantificación, caracterización y dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*) en el cantón de Upala, región Huetar norte de Costa Rica. Tesis para el grado de Ingeniero agrónomo. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cede San Carlos. p. 1 - 86.
- Verdejo-Lucas, S., 1992. On the occurrence of the "Mediterranean biotype" of *Tylenchulus semipenetrans* in Spain. *Fundamental and Applied Nematology* 15 (5): 475-477.
- Wachira, P. M., J. W. Kimenju, S. A. Okoth y R. K. Mibey, 2009. Stimulation of nematode destroying fungi by organic amendments applied in management of plant parasitic nematode. *Asian Journal of Plant Sciences* 8: 153-159.