

Distribución espacial de cafetos (*Coffea arabica* L.) posiblemente enfermos con el encorchamiento de la hoja causado por *Xylella fastidiosa* en Puerto Rico^{1,2}

Carlos Bolaños³, Mildred Zapata⁴, Brent Brodbeck⁵,
Pete Andersen⁶, Linda Wessel-Beaver⁷ y
Consuelo Estévez de Jensen⁷

J. Agric. Univ. P.R. 99(2):157-165 (2015)

RESUMEN

El café (*Coffea arabica* L.) es un cultivo de importancia económica y social. En Puerto Rico en el año 2012 la producción de café tuvo su nivel más bajo en toda la historia de la isla, tanto por los problemas de crisis económica como por los problemas fitosanitarios. Entre las principales enfermedades que afectan al cultivo está el encorchamiento de la hoja ('coffee leaf scorch', CLS) o crespada, causada por la bacteria *Xylella fastidiosa* (Xf) que ocasiona pérdidas económicas importantes en varios países. En la Cuenca del Caribe, Xf se encuentra en cafetos de Costa Rica, mientras que en Brasil la bacteria causa serias epidemias. Para determinar la distribución espacial de los cafetos posiblemente infectados con Xf, se muestrearon cafetos con síntomas similares a los de CLS. Para detectar a la bacteria en los árboles muestreados se realizó una prueba serológica comercial (DAS-ELISA) específica para Xf. Con datos de los árboles potencialmente infectados se realizaron conglomerados espaciales usando el programa SatScan. Muy pocos (< 5%) de los cafetos dieron lecturas de absorbancia dentro de los valores aceptados como positivos para Xf (≥ 0.7). Hubo una diferencia ($p < 0.0001$, χ^2) en la época seca versus la lluviosa en la proporción de cafetos seropositivos según la prueba para Xf. Además, el porcentaje de cafetos seropositivos a Xf varió dependiendo de la localidad muestreada ($p < 0.05$,

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 11 de marzo de 2015.

²Proyecto financiado por TSTAR USDA no. 2009-34135-20059 (UF 09140) (AES sub contrato ZTS-51) 'Efecto potencial de la bacteria *Xylella fastidiosa* en el establecimiento de cafetos bajo sombra en Puerto Rico'. Se agradece la cooperación de los agricultores que nos permitieron realizar los muestreos en sus fincas.

³Exestudiante Graduado, Departamento de Ciencias Agroambientales, P.O. Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, P.R. 00680.

⁴Catedrática, investigadora principal del proyecto, mildred.zapatasserrano@upr.edu, Departamento de Ciencias Agroambientales, PO Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, P.R. 00680.

⁵Investigador en Ciencias Biológicas-Entomología, Centro de Investigación y Enseñanza en el Norte de la Florida, EE.UU., Universidad de Florida, Quincy, FL.

⁶Profesor, Centro de Investigación y Enseñanza en el Norte de la Florida, EE.UU., Universidad de Florida, Quincy, FL.

⁷Catedrática, Departamento de Ciencias Agroambientales.

χ^2). Los conglomerados espaciales permitieron asociar con mayor riesgo relativo de enfermedad (sospechosos de CLS) a las localidades de mayor altitud: Adjuntas, Jayuya y Yauco (riesgo relativo mayor a 14; $P < 0.001$), lo que estuvo relacionado con conteos altos de vectores potenciales en estas localidades.

Palabras clave: CLS, cresperra, análisis de conglomerados espaciales, DAS-ELISA, CVC

ABSTRACT

Spatial distribution of coffee trees (*Coffea arabica* L.) potentially diseased with coffee leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico

Coffee (*Coffea arabica* L.) is an economically and socially important crop. In Puerto Rico, the harvest of 2012 was the lowest in the history of the island, mainly because of the economic crisis and phytosanitary problems. The main production problems are of biotic origin. Coffee Leaf Scorch (CLS) also known as 'cresperra' caused by the bacterium *Xylella fastidiosa* (Xf), results in significant economic losses in many countries. In the Caribbean Basin, Xf causes disease in coffee trees in Costa Rica, and in South America it causes epidemics in Brazil. To determine the presence of Xf in Puerto Rico, coffee trees showing CLS disease symptoms were tested with a double antibody sandwich enzyme linked immune absorbent assay (DAS-ELISA) specific for Xf. Spatial cluster analysis using SAT Scan was carried out on data from potentially symptomatic trees. Few trees (< 5%) had absorbance levels within the range of positive values (≥ 0.7) for Xf. There were significant differences ($p < 0.0001$, χ^2) in the percentage of trees suspected of infection with Xf in the dry versus the rainy season. Also, the percentage of suspected trees was variable among localities ($p < 0.05$, χ^2). Spatial clustering showed more than 14 times greater relative risk of encountering infected coffee trees with Xf at higher altitudes such as in Adjuntas, Jayuya and Yauco ($p < 0.001$), which was related to higher numbers of potential vectors at those localities.

Key words: CLS, spatial clustering analysis, DAS- ELISA, CVC

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas bióticos que afectan al café es la enfermedad del encorchamiento de la hoja (CLS, por sus siglas en inglés), que se conoce en Centro América como cresperra. La enfermedad ha causado graves pérdidas en la industria cafetalera de países como Brasil (Bretta *et al.*, 1996) y Costa Rica (Rodríguez *et al.*, 2001). La enfermedad CLS es causada por la bacteria restringida al xilema *Xylella fastidiosa* Wells et al. En Puerto Rico se han realizado esfuerzos en miras de detectar y aislar la bacteria presente en cafetos y cítricos (Rivera, 2006; Bolaños y Zapata, 2011; Zapata *et al.*, 2011; Bolaños y Zapata, 2012; Bolaños, 2012). La bacteria se transmite en el campo principalmente a través de insectos pertenecientes a la familia Cicadellidae.

En Puerto Rico, Mariño-Cárdenas y Zapata (2009) y Brodbeck *et al.* (2011) identificaron como especies predominantes en cafetos y vectores potenciales de Xf a: *Agallia pulchra*, *Apogonalia* spp., *Caribovia coffeicola* y *Hortensia similis*. Se han sugerido varias hipótesis acerca de la patogenicidad de *X. fastidiosa*, siendo la primaria la acumulación de la bacteria y de sus exudados en los vasos del xilema, lo cual no permite que los minerales y el agua que absorbe la planta lleguen a las hojas y a otros órganos (Souza *et al.*, 2006).

Otras hipótesis involucran a la biosíntesis de proteínas y alteraciones en los niveles hormonales (Hayward y Mariano, 2006). En Puerto Rico se han observado cafetos con sintomatología similar a la descrita para CLS, tales como ramificación anormal con acortamiento de ramas y entrenudos, lignificación y hojas pequeñas, que dan la apariencia de escobilla de bruja o roseta. La tecnología de sistemas de información geográfica (SIG), así como los conglomerados espaciales permiten dar una idea del desarrollo de una epidemia a partir de mapas (Venkata *et al.*, 2010). Se ha desarrollado la estadística de rastreo espacial para probar la presencia de conglomerados espaciales e identificar su locación aproximada (Kulldorf, 1997).

Para detectar conglomerados, el programa SatScan (Kulldorf, Cambridge, UK)⁸ mueve una ventana circular virtual alrededor de una región de estudio y compara el número de casos encontrados en la ventana con el número de casos esperados bajo la hipótesis nula (distribución al azar de los casos) (Piarroux *et al.*, 2011). De acuerdo al número de casos sospechosos se establece si siguen una distribución al azar o si están distribuidos de acuerdo al modelo de probabilidad de Bernoulli (Kulldorf, 2001). El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar los posibles casos de CLS en Puerto Rico usando para ello pruebas serológicas, y determinación de la distribución espacial de los cafetos potencialmente enfermos mediante el programa SatScan y su visualización en mapas mediante Sistemas de Información Geográfica, en cuatro localidades de Puerto Rico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de determinar los posibles casos de la enfermedad CLS se muestrearon cafetos con sintomatología de acortamiento de entrenudos, marchitez apical, muerte descendente y acumulación anormal de brotes formando una escoba de bruja. Se tomaron las muestras en

⁸Las marcas registradas se mencionan para proveer información específica. Su mención no constituye garantía ni endoso o preferencia de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico.

cuatro localidades de la zona montañosa de Puerto Rico: Las Marías (N18°13'14", W66°01'38"), altitud 445 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.); Adjuntas (N18°09'30", W66°45'27"), 779 m.s.n.m.; Yauco (N18°09'57", W66°49'36"), 918 m.s.n.m.; y Jayuya (N18°09'35", W66°38'45"), 947 m.s.n.m. Se utilizó un equipo de posicionamiento global satelital (GPS) Garmin CS60 (Garmin International, Olathe, Kansas, EE.UU.) para georeferenciar los árboles muestreados, y posibilitar el volver a ellos con el fin de confirmar los resultados mediante pruebas inmunológicas y moleculares.

Para la prueba diagnóstica, se utilizó el 'Pathoscreen Kit': DAS-ELISA para *X. fastidiosa* (Agdia, Elkhart, Indiana, EE.UU.) aplicada a las nervaduras y ramas de cafetos sintomáticos. El protocolo que se utilizó correspondió al de la casa comercial con las siguientes modificaciones: Se tomaron cinco nervaduras principales de las hojas y tres ramas, se maceraron separadamente en proporción de 1 tejido:10 amortiguador, utilizando el amortiguador para extracción general ('general extraction buffer', GEB) (sulfito de sodio, 1.3 g/L; polivinilpirrolidona, 20 g/L; azida sódica, 0.2 g/L; albumina de huevo, 2 g/L; y Tween-20, 20 g/L). Las muestras se cernieron con una malla fina ('cheese cloth') y se centrifugaron a 4,000 rpm por cinco minutos. A partir de allí, se continuó con el protocolo de la casa comercial.

Se examinó la placa para ver cambios en color, usando una longitud de onda de 650 nanómetros (nm). Se consideraron resultados positivos aquellos de color azul con absorbancia mayor a 0.7 A. Para elaborar mapas, se utilizó la base de datos de 'Imagery' del programa ARC GIS Explorer Online (Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, EE.UU.).

Mediante la prueba de chi cuadrado (χ^2) se probó el efecto de época y localidad sobre la proporción de cafetos sospechosos de estar infectados con *X. fastidiosa*. Para clasificar los datos, se contó el número de muestras con y sin valor de absorbancia mayor o igual a 0.7A (definido como lectura sospechosa).

Se usó la prueba de t pareada para determinar si habían diferencias en los valores de absorbancia entre hoja y rama. Para determinar el riesgo relativo de CLS, se utilizó el modelo de cociente de probabilidades de Bernoulli (Kulldorf, 2009) presente en el programa SatScan. Los conglomerados espaciales para los casos sospechosos de CLS se generaron según la estadística de rastreo espacial (Kulldorf, 2009) presente en el programa SatScan, la cual consiste en determinar los radios de conglomerados más probables ('likelihood radio test') a través de una ventana circular de diámetro variable que se mueve alrededor del área de estudio con una distancia máxima del 50% de la población (Kulldorf y Nagarwalla, 1995; Kulldorf, 2001).

Se ingresaron al programa tres archivos: el archivo de casos que se presentaron en el presente ensayo; el archivo de población que contenía todos los árboles que se georeferenciaron en las fincas de muestreo; y el de las coordenadas geográficas de cada punto de georeferenciación. La significancia estadística de cada conglomerado se obtuvo a través de 999 iteraciones del modelo más probable usando la prueba de hipótesis de Monte Carlo (Heffernan *et al.*, 2004; Elias *et al.*, 2006; Piarroux *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Usando la prueba DAS-ELISA específica para *X. fastidiosa*, se detectaron 24 casos positivos, que corresponden al 8% del total de cafetos georeferenciados; estos cafetos tuvieron lecturas de absorbancia ≥ 0.7 (Cuadro 1). Hubo una diferencia ($p < 0.0001$, χ^2) en la proporción de cafetos sospechosos de estar infectados por *X. fastidiosa* en la época seca versus la lluviosa. Más de 10% de los cafetos muestreados en la época seca tuvieron una absorbancia ≥ 0.7 , mientras que menos de 1% de los cafetos sospechosos se detectaron en la época lluviosa (Cuadro 1). Estos resultados se deben a que en la época seca el muestreo fue más eficiente porque los síntomas son más evidentes. Del 2003 al 2005, Andersen (2005) llevó a cabo un proyecto en Puerto Rico y también encontró que muchos cafetos aparecían sintomáticos para CLS durante la época seca (febrero a mayo).

Xylella fastidiosa es un patógeno restringido al xilema, por ello se ha sugerido que los síntomas son atribuibles a una disfunción del sistema de conducción de agua relacionada a la oclusión de los vasos del xilema (Queiroz-Voltan *et al.*, 2007), de ahí que los síntomas sean más visibles en la época de sequía. Además, en Puerto Rico las fincas de café, en general, no utilizan riego, por lo que las plantas sufren estrés hídrico durante los meses de diciembre a mayo, y ciertos problemas bióticos como CLS podrían ser más notorios por verse comprometido el sistema vascular de los cafetos.

CUADRO 1.—Frecuencia de cafetos seropositivos (≥ 0.7) y seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*, distribuidos por época.¹

Absorbancia ²	Época lluviosa	Época seca	Total
< 0.7	238	218	456
≥ 0.7	2	22	24
Total $P < 0.0001$; χ^2	240	240	480

¹Se colectaron muestras en cuatro localidades en la región cafetalera de Puerto Rico en la época seca y lluviosa durante 2010 a 2012.

²Absorbancia en prueba DAS-ELISA para Xf a 650 nm.

CUADRO 2.—Frecuencia de cafetos seropositivos (≥ 0.7) y seronegativos (< 0.7) en la prueba DAS-ELISA para *X. fastidiosa*, distribuidos por localidad.¹

Absorbancia ²	Adjuntas	Jayuya	Las Marías	Yauco	Total
< 0.7	108	112	118	118	456
≥ 0.7	12	8	2	2	24
Total $P < 0.05$; Chi ²	120	120	120	120	480

¹Se colectaron muestras en cuatro localidades en la región cafetalera de Puerto Rico en la época seca y lluviosa durante 2010 a 2012.

²Absorbancia en prueba DAS-ELISA para Xf a 650 nm.

El porcentaje de árboles seropositivos a *X. fastidiosa* (absorbancia ≥ 0.7) varió dependiendo de la localidad muestreada ($p < 0.05$, χ^2) (Cuadro 2). Dicho porcentaje de cafetos positivos fue mayor en Adjuntas y Jayuya. Zapata y colaboradores (datos no publicados) realizaron estudios durante 2003-2006 y encontraron una mayor incidencia de cafetos positivos de estar enfermos con CLS en Adjuntas versus otras localidades. Brodbeck *et al.* (2011) encontraron los mayores niveles de insectos vectores potenciales en estas mismas localidades.

Hubo diferencias altamente significativas ($p < 0.01$, prueba t de student pareada) para la absorbancia de nervaduras de las hojas versus las ramas del cafeto, siendo las respectivas absorbancias de 0.44 y 0.34, indicativo de que las hojas podrían ser un nicho preferencial para la multiplicación de la bacteria. Lacava *et al.* (2004) también encontraron una mayor frecuencia de aislamiento de bacterias endofíticas a partir de hoja en comparación a ramas en naranjo dulce y mandarina. Los presentes valores de absorbancia observados en ramas y hojas de cafeto son inferiores a los informados por Zumbado (2007) en Costa Rica, de entre 0.8 y 1.2 de absorbancia en cafetos con sintomatología de CLS o 'crespera'.

El análisis de distribución espacial con el programa SatScan (Kulldorf, 2009) permitió generar dos conglomerados: el principal y el secundario. Referente a la distribución espacial del conglomerado principal, hubo un total de 22 casos (absorbancia ≥ 0.7) de una población total de 351 valores de absorbancia analizados. El conglomerado generó las coordenadas 18.160200°N, 66.646200°W con un radio de 16.84 km. Dentro del radio establecido por el programa SatScan se determinó un riesgo relativo de 14.95.

El riesgo relativo considera la probabilidad de un evento (riesgo) en relación a la exposición del individuo a la bacteria (Sistrom y Garvan, 2004). Por lo tanto, hay 14.95 veces más probabilidad de encontrar una planta enferma dentro del conglomerado que fuera del mismo ($p < 0.001$). El conglomerado principal agrupó a los cafetos muestreados

de las zonas de Adjuntas, Jayuya y la zona de mayor altitud referente al nivel del mar de Yauco (Figura 1). Dicho conglomerado agrupa también a los municipios de Utuado y una parte con mayor altitud de Lares, localidades no muestreadas pero donde se esperaría que exista un número elevado de casos. Vale mencionar que estas localidades son las más altas de la zona cafetalera.

Los cafetos sospechosos de enfermedad se ubicaron mayormente en Adjuntas y Jayuya (conglomerado principal) con 43% y 45% de los casos totales, respectivamente. Mariño-Cárdenas *et al.* (2007) encontraron el mayor porcentaje de captura de vectores potenciales de Xf en fincas de Adjuntas (66%), lo cual también fue confirmado por los estudios de Brodbeck *et al.* (2011). Esta información corrobora lo observado en el presente estudio con alta densidad de vectores potenciales y mayor presencia de cafetos con síntomas de la enfermedad causada por Xf en el conglomerado principal versus el secundario.

Para el conglomerado secundario se detectaron dos casos, de una población total de 342 valores de absorbancia analizados. El conglomerado secundario se generó en las coordenadas 18.202300° N, 67.137400° W con un radio de 35.23 km. El riesgo relativo fue de 0.075. Por lo tanto, la probabilidad de encontrar cafetos positivos a la enfermedad causada por Xf en el conglomerado secundario es casi nula ($p < 0.001$). El conglomerado secundario agrupó a los cafetos muestreados en Las Marías (Figura 1).

El conglomerado secundario abarca también los municipios de Aguadilla, Aguada, Rincón, Añasco, Moca, parte de menor altitud de Lares,

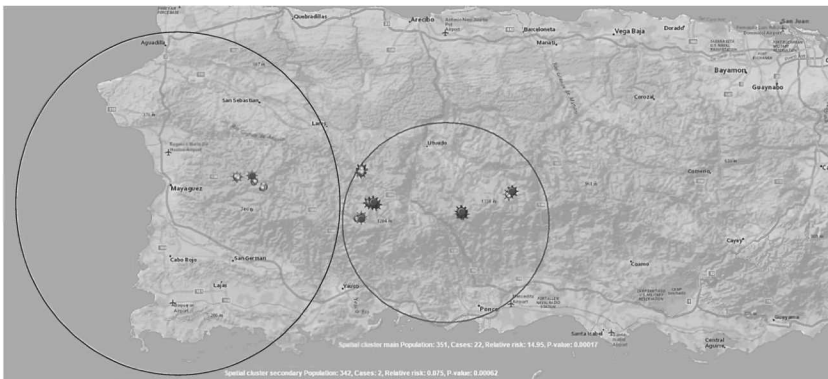


FIGURA 1. Mapa parcial de la isla de Puerto Rico (sin escala) mostrando los conglomerados principal (menor tamaño) y secundario (mayor tamaño) de los cafetos positivos a Xf de acuerdo a la prueba DAS - ELISA. Los puntos con aristas representan los lugares donde se colectaron cafetos seropositivos (Absorbancia ≥ 0.7). Fuente: U.S. Geological Survey, U.S. Environmental Protection Agency | Esri, HERE, DeLorme, NGA, USGS.

San Sebastián, Cabo Rojo, Hormigueros, Lajas y Sabana Grande, en la zona oeste de la isla, donde se espera baja probabilidad de la enfermedad en las plantaciones cafetaleras. Es notable que el conglomerado secundario separa a la localidad de Las Marías de menor altitud frente a las de mayor altitud (Adjuntas, Yauco y Jayuya) que se agruparon en el conglomerado principal. Los sistemas de información geográfica y los conglomerados espaciales permitieron asociar con un alto riesgo relativo de la presencia de cafetos con síntomas de la enfermedad causada por Xf a las localidades de mayor altitud (Adjuntas, Jayuya y Yauco) frente a Las Marías situada a menor altitud. Mediante este estudio se ha confirmado un mayor riesgo relativo de cafetos sospechosos de la enfermedad causada por Xf en las localidades de Adjuntas, Yauco y Jayuya. Por lo tanto, los estudios de monitoreo y las medidas de prevención para las posibles enfermedades infecciosas, tales como CLS y CVC (clorosis variegada de los cítricos) ambas causadas por Xf, deben centrarse en dichas zonas.

En otros países, la prueba de DAS-ELISA para Xf utilizada en este estudio se considera como confirmatoria de la presencia de *Xylella fastidiosa*. Sin embargo, es recomendable que se utilicen técnicas de polimerasa en cadena (PCR) con iniciadores recomendados para Xf. Debido a los resultados erráticos obtenidos de los estudios realizados en forma independiente durante esta investigación, se recomienda realizar nuevos ensayos de PCR. Por último, se recomienda llevar a cabo estudios conducentes a la secuenciación de la bacteria.

LITERATURA CITADA

- Andersen, P., 2005. *Xylella fastidiosa* in plants and in leafhoppers of Puerto Rico. <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0198646-xylella-fastidiosa-in-plants-and-in-leafhoppers-of-puerto-rico.html>.
- Beretta, M., R. Harakava, M. Chagas, K. Derrick, G. Barthe, T. Ceccardi, R. Lee, O. Paradela, H. Sugimori e I. Ribeiro, 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Dis.* 80: 821.
- Bolaños, C., 2012. Detección y caracterización de bacterias endofíticas en árboles de caféto (*Coffea arabica* L.) y de sombra en Puerto Rico. Tesis M.S. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. 111 pp.
- Bolaños, C. y M. Zapata, 2011. Characterization of endophytic bacteria isolated from healthy and diseased coffee trees showing witches brooms under field conditions in Puerto Rico. *Phytopathol.* 101:S276.
- Bolaños, C. y M. Zapata, 2012. Spatial distribution of coffee and shade trees identified with endophytic bacteria using DAS-ELISA for *Xylella fastidiosa*. <http://cohemis.uprm.edu/prysig/2012/prysig12pres.html>
- Brodbeck, V., P. C. Anderesen, E. Schoeder, C. Bolaños y M. Zapata, 2011. Potential effects of Cicadellidae leafhoppers on shade and sun coffee in Puerto Rico. Abstract presented at the joint meeting of the APS Caribbean Division and the Southeastern Branch of the Entomological Society of America in San Juan, Puerto Rico, March 19-22, 2011.

- Elias, J., D. Harmsen, H. Claus, W. Hellenbrand, M. Frosch y U. Vogel, 2006. Spatio temporal analysis of invasive meningococcal disease, Germany. *Emerging infectious diseases* 12: 1689-1695.
- Hayward, A. y R. Mariano, 2006. Mecanismos de virulencia e patogénica de procariotos em plantas. *Revisão Anual de Patologias de Plantas* 5: 199-234.
- Heffernan, R., F. Mostashari, D. Das, A. Karpati, M. Kulldorff y D. Weiss, 2004. Syndromic surveillance in public health practice, New York City. *Emerging infectious diseases* 10: 858-864.
- Kulldorf, M., 1997. A spatial scan statistic. *Commun Stat A theory methods* 26: 1481-1496.
- Kulldorf, M., 2001. Prospective time-periodic geographical disease surveillance using a scan statistic. *J R Stat Soc.* 164:61-72.
- Kulldorf, M., 2009. SaTScan v9.1.1. Software for the spatial and space-time scan statistics. <http://www.satscan.org/>
- Kulldorf, M. y N. Nagarwalla, 1995. Spatial disease clusters: Detection and inference. *Statistics in Medicine* 14: 799-810.
- Lacava, P., W. Araujo, J. Marcon, W. Maccheroni y J. L. Azevedo, 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 55-59.
- Mariño-Cárdenas, Y., 2007. Identificación de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells et al. que se alimentan del tejido vascular de plantas de café *Coffea arabica* L. en tres localidades de Puerto Rico. Tesis MS. Universidad de Puerto Rico. Mayagüez, Puerto Rico.
- Mariño-Cárdenas, Y. y M. Zapata, 2009. Diversidad de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells et al. en cafetales en Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 93: 101-121.
- Piarroux, R., R. Barrais, B. Faucher, R. Haus, M. Piarroux, J. Gaudart, R. Magloire y D. Raoult, 2011. Understanding the cholera epidemic, Haiti. *Emerging infectious diseases* 17(7): 1161-1168.
- Queiroz-Voltan, R., L. Cabral, O. Paradela-Filho y L. Fazuoli, 2007. Efeito da poda do tipo decote no controle da *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro. *Bragantia* 66 (1): 69-80.
- Rivera, G., 2006. Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis M.S. Departamento de Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. 85 pp.
- Rodríguez, C., J. Obando, W. Villalobos y C. Rivera, 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Dis.* 85: 1027.
- Sistrom, C. y C. Garvan, 2004. Proportions, odds, and risk. *Radiology* 230(1): 12-19. doi:10.1148/radiol.2301031028.PMID 14695382.
- Souza, A., M. Takita, H. Coletta-Filho, R. Barata, L. Camargo y M. Machado, 2006. Genoma funcional de bacterias fitopatogénicas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 14: 51-55.
- Venkata, M., V. Prabhakaran, T. Jayaraman, J. Muliylil, A. Oommen, P. Dorny, J. Ver-cruysse y V. Rajshekhhar, 2010. Detecting spatial clusters of *Taenia solium* infections in a rural block in South India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104: 601-612.
- Zapata, M., J. Hartung, B. Brodbeck y P. Andersen, 2011. Endophytic bacteria from the vascular tissue of coffee (*Coffea arabica* L.) and citrus (*Citrus sinensis* L.) leaves found during the attempt to isolate the pathogen, *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. *Phytopathology* 101: S276.
- Zumbado, S., 2007. Dinámica de la sintomatología de crespada del café y su relación con la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa* (Wells et al). Informe BsC. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 74 pp.

