

Revisión general acerca del HLB (Huanglongbing) o enfermedad del enverdecimiento de los cítricos

Andrea Carolina Soto Pertuz

Trabajo de Investigación como requisito para optar el título de Microbiólogo (a)

**Elwi Machado Guillermo Sierra
Yani Cristina Aranguren Diaz**

RESUMEN

Los cítricos, son un conjunto de frutas que se caracterizan principalmente por ser jugosas y aromáticas, en la industria agrícola representan una alternativa muy viable para realizar cultivos, debido a que su periodo productivo puede durar entre 30 y 40 años y pueden desarrollarse en un clima subtropical, adicionalmente la industria cítrica es un campo de gran interés debido a que su uso puede ir desde la fase primaria, siendo esta la venta de frutas (limones, naranjas, limas mandarinas, toronjas, entre otros) hasta una fase asociada a productos industriales derivados (jugos, néctares, concentrados, pulpas, mermeladas, aceites, entre otros), por esto los árboles de cítricos son los que tienen mayor demanda a nivel mundial y el comercio de estos favorece principalmente a aquellos países en donde las condiciones climáticas permiten el óptimo desarrollo de estos; aunque Colombia no se encuentra entre los principales países productores de cítricos, este cultivo frutal representa aproximadamente el 1% del PIB de todo el país y para el periodo 2018/19 alcanzo una producción anual de 101,5 millones de toneladas de frutas cítricas, entre las que la naranja figuro como la fruta de mayor producción. Existen una gran variedad de enfermedades que afectan a los cítricos, con diversos orígenes, ya sea viral, fúngico, bacteriano o simplemente enfermedades asociadas con parásitos, estas resultan ser de gran interés, debido a que su presencia en los cultivos se relaciona no solo con grandes pérdidas económicas sino también con grandes inversiones por parte de los productores para la búsqueda de alternativas de solución viables que no afecten la productividad y calidad de sus productos; una de las enfermedades de mayor importancia dentro de esta industria es el Huanglongbing (HLB) o enfermedad del enverdecimiento de los cítricos, esta es considerada a nivel mundial como la enfermedad mas amenazadora para la industria cítrica, se encuentra ampliamente distribuida por los 5 continentes e impacta en gran manera el rendimiento de los principales países productores. Huanglongbing es un término de procedencia china cuyo significado en español es “enfermedad del dragón amarillo”, el origen del HLB se asoció al sur de china cuando a finales del siglo XIX diferentes agricultores observaron un amarilleo en los cultivos de árboles cítricos, sin embargo, hay datos consistentes de que la primera aparición de la enfermedad fue en el siglo XVII, en donde fue el agente causal de la muerte progresiva de diversos cultivos de cítricos en la India, más adelante hacia el año 1937 se reportó por primera vez la variación africana en Sudáfrica y luego en 1960 se asoció el HLB con la enfermedad del moteado de las hojas de cítricos en

Filipinas; respecto al continente americano el primer caso fue reportado en São Paulo, Brasil en 2004, para el año 2005 ya se había extendido a Florida EE.UU y a en Colombia el vector *Diaphorina citri* se reportó por primera vez en 2008 y el primer caso asociado a HLB fue para el año 2016. El HLB se asocia a tres especies de alfa-proteobacterias, estas tienen la capacidad de causar la enfermedad en los diferentes continentes, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf); estas bacterias Gram Negativas y limitadas al floema son transmitidas a través de 2 vectores *Diaphorina citri* (Para las especies americanus y asiaticus) y *Trioza erytrae* para la variación africana; CLas tiene la capacidad de moverse a lo largo de toda la planta, debido a la necesidad que tiene de situarse en órganos de alta demanda de nutrientes; la virulencia de esta bacteria se relaciona principalmente con lipopolisacáridos codificados por 21 genes, algunos componentes de la membrana externa de las bacterias que contribuyen a la aptitud bacteriana y los flagelos que son los responsables de la propulsión. La capacidad que tiene *D. citri* de transmitir a CLas, ha sido estudiada a profundidad pero aun así la verdadera naturaleza existente detrás de la interacción entre este patógeno y el vector, sigue siendo en ciertos aspectos poco conocida; de manera general se puede decir que la infección con CLas tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la población de psílidos, el vector adquiere a la bacteria cuando se alimenta de un árbol infectado (la adquisición de la bacteria puede darse luego de 4 horas de alimentación) una vez ocurre esto las bacterias sufren una fase de latencia del vector, que puede ser de entre 3 y 20 días y finalizada esta etapa el vector puede transmitir la bacteria a plantas sanas. La sintomatología en hojas se describe principalmente como manchas irregulares y asimétricas, con moteado difuso, engrosamiento y aclaramiento de las nervaduras y defoliación; respecto a los frutos se produce una deformación y asimetría, reducción del tamaño, inversión de la coloración de maduración, aborto de semillas y caída prematura de los frutos. Hasta ahora el método aceptado para el diagnóstico de HLB es la qPCR, pero es una técnica demasiado costosa, que requiere de una certeza al momento de seleccionar la muestra tomada para llevar a cabo el análisis, por lo que se han investigado diversos métodos como aquellos basados en reconocimientos de patrones en imágenes, espectrofotométricos, cromatográficos y moleculares los cuales representan alternativas innovadoras que pueden tener diferente nivel de eficiencia en tiempo, costo y confiabilidad en la detección de árboles enfermos con HLB o en el manejo de la enfermedad. El HLB es una problemática real, que demanda especial atención, la presencia de CLas obstruye el paso de los productos de la fotosíntesis a través del floema provocando una pérdida en el vigor e incluso la muerte productiva del árbol, por lo que se debe invertir en investigaciones cuyo objetivo sea la obtención de una solución segura, eficaz y replicable que evite la diseminación y propagación de HLB a diversos cultivos; de igual manera es de suma importancia la aplicación de las BPA, tomando medidas fitosanitarias para el manejo integrado de HLB, las cuales están dirigidas principalmente a suprimir las poblaciones del insecto vector (ya sea por control químico o biológico) y la eliminación de árboles enfermos.

Antecedentes:

El Huanglongbing (HLB), también conocido como enverdecimiento de los cítricos; es una enfermedad altamente destructiva, principalmente a los cultivos de naranja

dulce y mandarina; se ha convertido en una de las enfermedades que más ha afectado la producción de cítricos a nivel mundial y a medida que continua propagándose va acentuando el impacto negativo originando grandes pérdidas en la industria cítrica (1). El HLB se evidencia por una variedad de síntomas foliares dentro de los que se incluyen el amarilleamiento de las hojas, moteados con manchas y necrosis corchosas, sintomatologías que tienden a confundirse muy fácilmente con deficiencias nutricionales en la planta, dificultando en gran medida el diagnóstico correcto de esta enfermedad. Además de los síntomas foliares presenta una amplia variedad de síntomas en el fruto, como la malformación, decoloración, la caída prematura y finalmente la muerte de los árboles(2)(3). Una vez los árboles se infectan el tiempo de vida se reduce y su rendimiento se ve significativamente afectado.(4)

El diagnóstico en campo del HLB, es difícil porque estos síntomas suelen asociarse con deficiencias de nutrientes de la planta y porque el microorganismo causante aún no ha sido cultivado. La enfermedad puede diagnosticarse a través de la microscopía electrónica pero es un método que requiere mucho tiempo, equipos costosos y una preparación adecuada de la muestra, si alguno de los factores se altera no resulta viable y genera duda acerca de la confiabilidad de los resultados; han intentado desarrollar pruebas serológicas pero no se ha logrado por la dificultad de generar anticuerpos específicos contra un organismo no cultivado y los cambios en las propiedades antigénicas del patógeno diana; la biología molecular, ha desarrollado diversas herramientas centradas en PCR convencional para la detección de HLB, que a su vez requiere del diseño de cebadores basados en secuencias de un grupo de genes clonados de proteína ribosómica y DNAr 16S para la obtención de resultados altamente sensibles y específicos, pero por el contrario se obtienen amplicones muy largos que no permiten reacciones sensibles y estables (5).

Esta enfermedad es causada por 3 especies del género *Candidatus Liberibacter* spp., *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (6); la especie que se encuentra más ampliamente distribuida alrededor del mundo es *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), que ha sido informada en Asia, América del Norte, América del Sur y África, a diferencia de las especies *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) y *africanus* (CLaf), que únicamente han sido identificadas originalmente en África y Brasil respectivamente; CLas y CLam se transmiten de manera natural a través de psílidos asiáticos de los cítricos (ACP, *Diaphorina citri*) y la especie CLaf se transmite a través de un psílido africano de cítricos (AfCP, *Trioza erytaea*); tanto patógenos como vectores han logrado expandirse a nivel global, logrando una extensión a nuevos territorios entre los que se incluyen Brasil, varios estados de los Estados Unidos y países del Caribe (7).

Objetivos:

- ✓ Identificar los aspectos relevantes conocidos sobre *Candidatus Liberibacter* y el impacto que tiene sobre la actividad cítrica.
- ✓ Describir las técnicas usadas en la actualidad para la detección y control de HLB.
- ✓ Analizar y resumir la información disponible sobre el HLB, su impacto e importancia.

Materiales y Métodos:

El método utilizado para realizar la investigación, fue una revisión sistemática (artículos científicos, revistas indexadas, entre otros) para dar inicio a la etapa exploratoria y analítica para la recolección de información que resultara relevante sobre los procedimientos existentes actualizados y efectivos para realizar una revisión. Luego utilizando una técnica comparativa se sintetizó toda la información relevante relacionada con el HLB, *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Diaphorina citri*.(8)

Los buscadores y bases de datos utilizados para la recolección de la información requerida fueron Google Académico, Scielo, ScienDirect y NCBI, la búsqueda de información se limitó por la filtración realizada relacionada a las palabras clave; HLB, enverdecimiento de cítricos, Diagnóstico de HLB, *Diaphorina citri*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e Industria cítrica.

Resultados:

Consumo y producción de cítricos

La historia y origen de los cultivos mundiales de cítricos representa aun un misterio, el que exista una alta demanda para la producción de los cítricos lo hace destacar entre los cultivos frutales. Como tal el desarrollo de la industria de los cítricos, ha llevado al desarrollo de diversas tecnologías que resulta en la expansión del comercio internacional relacionado al consumo de frutas cítricas y sus alimentos (9). Entre los árboles frutales de mayor demanda a nivel mundial, se encuentran los de frutas cítricas (principalmente naranja, limón y mandarina) en los cinco continentes, el cultivo de cítricos está relacionado directamente con el consumo de estos, el comercio se basa principalmente en la explotación de estos cultivos en los países en los cuales las condiciones permitan un óptimo desarrollo. Los cultivos de cítricos son permanentes y su periodo productivo va entre los 30 y los 40 años, el clima óptimo para su desarrollo es el subtropical porque su resistencia a los climas fríos es muy baja y son muy susceptibles a corrientes de vientos fuertes (pueden provocar la pérdida de frutos) influyendo de esta manera en la productividad de los árboles, además para su correcto desarrollo requieren buenas precipitaciones, adicionalmente estas se repartan uniformemente durante todo el año y en caso tal de que estas no sean constantes es necesario suplirlas a través del riego. Durante las etapas de floración y fructificación se requiere una gran fuente de luz de igual forma es necesario que los cultivos se encuentren en suelos profundos y con baja salinidad debido a que no toleran altas concentraciones de sal (10).

La cadena productiva de los cítricos puede abarcar los productos tanto en la fase primaria (naranjas, limones, limas, mandarinas y toronjas) así como también con una serie de productos asociados a la fase industrial (jugos, concentrados, néctares, pulpas, mermeladas, aceites, entre otros) (11)(12). Los cítricos entran dentro de las categorías que más se destacan en el mercado de frutas y hortalizas, por lo que su volumen de comercio y demanda aumenta. Durante un periodo aproximado de treinta años la producción ha aumentado de manera constante, alcanzando una producción de más de 130 millones de toneladas lo que representa alrededor del 135% y va estrechamente relacionado con el aumento de la demanda de estas frutas (10), se puede decir que la citricultura es una industria que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, según informes de la FAO las frutas cítricas se producen en diversas condiciones climáticas y agronómicas, en más de 80

países en el mundo (9). Para el periodo 2018/19 se alcanzó un récord de 101,5 millones de toneladas, esto representa un incremento interanual del 9%; las naranjas figuran como las frutas de mayor producción alcanzado un 53,4%, el 31,5% de mandarinas, el 8,3% de limones y lima, y el 6,7% (13). Los cítricos son cultivos permanentes y tienen la ventaja de la alta adaptabilidad a variadas condiciones del clima, esto facilita la presencia de cultivos de cítricos en un gran número de países, a pesar de esto las regiones productoras más que todo se localizan en el continente americano y la zona occidental del continente europeo (14)

Para el año 2010, Colombia reportó 62.409 hectáreas destinadas para el cultivo de cítricos, que se distribuyen en 12 departamentos los cuales a su vez están distribuidas en aproximadamente 10.500 unidades productivas, Colombia representa aproximadamente el 1% de toda la producción anual mundial de cítricos, con una tasa de crecimiento promedio del 1,6% por año (15). En el 2016 la producción de cítricos en el mundo se reportó un total de 113,42 millones de toneladas, Colombia ocupó el puesto 17 en el listado de los 25 principales países productores de cítricos. Ya para el 2017 el cultivo de cítricos alcanzó las 92.275 hectáreas sembradas en el país (16), algunas de las variedades de cítricos producidas en el país son la naranja, mandarina, limón, toronja y tangelo, en el mismo sentido se puede decir que en Colombia se distinguen 4 núcleos geográficos productores; el núcleo centro oriente (Santander, Norte de Santander, Boyacá, Cundinamarca, Tolima y Huila), núcleo sur-occidente (Eje Cafetero, Antioquia, Valle del Cauca, Cauca y Nariño), núcleo de la costa Atlántico (Atlántico, Bolívar, Cesar, Sucre, Córdoba, Magdalena y Guajira) y núcleo de la Orinoquia (Meta y Casanare), en el núcleo de la costa Atlántica, el departamento del Atlántico tiene como principal cultivo de cítricos, donde Santo Tomás representa a uno de los principales municipios productores, el cual llegó a reportar hasta 405 hectáreas de cítricos sembrada. Para el año 2019 el departamento reportó una producción de aproximadamente 62 toneladas de limón, alcanzando el departamento una participación del 1,2%.

Enfermedades de gran importancia en la industria citrícola

El comercio de cítricos dentro de la industria agrícola es de gran interés debido principalmente a que este se asocia con propiedades anti-mutagénicas y antioxidantes; además de esto las frutas cítricas contienen una colección de fibras, vitaminas y minerales, lo cual se relaciona con la buena salud de las personas y logra generar un área de mercadeo y producción atractiva para diferentes productores a nivel mundial. Así como existen una gran variedad de plantas de cítricos también existen un sin número de enfermedades que atacan a estas plantas, lo que convierte a estas enfermedades en una amenaza para la productividad y rentabilidad de los cultivos; en la industria agrícola estas patologías se convierten en la principal causa de la reducción en la producción y en las grandes pérdidas económicas de los agricultores dedicados a esta área debido a que tienen un impacto negativo en el rendimiento y la calidad de los mismos.(17) Los cultivos de cítricos son susceptibles a una amplia variedad de patógenos, que ocasionan grandes pérdidas en la industria citrícola. La aparición de un patógeno específico, la capacidad que este tiene para causar enfermedad, la facultad para sobrevivir y posteriormente propagarse de tal manera que logre dañar y afectar los cultivos, son condiciones más que todo regidas por aspectos externos como, las condiciones

agroclimáticas, la sensibilidad de la variedad a la que el patógeno este infectando, el tipo de suelo, entre otros; el resultado de la relación entre el patógeno, la planta y las condiciones externas; se resume en el éxito del patógeno para infectar a la planta o en el éxito de la planta para evadir la infección del patógeno.(18)

Los árboles y plantas cítricas pueden presentar una gran cantidad de síntomas, los cuales se convertirían en un reflejo de la falta salud, vitalidad y productividad de estos, en diversos grados. En la mayoría de los casos se pueden tomar medidas de control o medidas correctivas que permitan un adecuado control y manejo de la enfermedad, como la detección temprana de síntoma. Las enfermedades de los cítricos pueden variar dependiendo el origen de las mismas, estas pueden ser: a) de origen fúngico, como por ejemplo, las causadas por *Fusarium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Phoma tracheiphila*, , b) de origen bacteriano como *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* y *Candidatus Liberibacter spp.* que dentro de las enfermedades bacterianas representan a los agentes etiológicos con mayor importancia entre las enfermedades de los cítricos y las infecciones c) de origen viral como el *virus de la tristeza de los cítricos*, *virus de la psorosis de los cítricos* y el *virus de la leprosis en cítricos*, que dentro de las enfermedades cítricas de origen vírico son consideradas de gran importancia económica debido a que causan perdidas muy grandes en los cultivos de cítricos (19). De igual forma existen una amplia variedad de parásitos nematodos que afectan las plantas de cítricos, con un alto potencial destructivo (20)(21), especies como *Tylenchulus semipenetrans* y *Radopholus citrophilus* son de gran importancia a nivel económico debido a sus capacidades destructivas sobre estos cultivos y su presencia en todas las regiones productoras de cítricos; es importante resaltar que la asociación que estos nematodos tienen con los cultivos cítricos es muy estrecha debido principalmente a la capacidad que tienen las plantas de albergar y sustentar poblaciones muy grandes de estas especies antes de que el daño sea evidente. (22)

Aunque hay una gran variedad de enfermedades de los cítricos las principales son las causadas por patógenos de tipo hongos o bacterias (tabla 1), la ventaja frente a la planta que tienen estos microorganismos es que pueden aparecer en cualquier etapa del ciclo de vida de los cultivos y en toda la planta, ya sea en hojas, tallos raíces o frutos. Provocando una sintomatología típica, como clorosis, moteado, desarrollo y crecimiento reducido, absorción de nutrientes y agua insuficientes, descomposición, necrosis e incluso en condiciones mucho más extremas puede provocar la muerte de la planta (23), debido a que existen una gran cantidad de hongos, bacterias, virus, nematodos y otros patógenos con la capacidad de ocasionar grandes pérdidas respecto a las áreas cultivados, que pueden causar daño a los cultivos y que además requieren de un adecuado manejo y gestión eficaz (24), la cual se da principalmente a través del uso de plaguicidas químicos que aseguren un adecuado control y una erradicación total de las diversas enfermedades que atacan a los cítricos debido a que controlan adecuadamente la presencia de los agentes causales de la enfermedad; pero debido a que es necesario el desarrollo y promoción de una agricultura ecológica y sostenible, pero esto requiere de una alternativa biológica altamente estudiada que represente una efectividad mayor o igual a la mostrada por los productos químicos (25).

Tabla 1. principales enfermedades de cítricos

TAXONOMIA DE LAS ENFERMEDADES DE CITRICOS
--

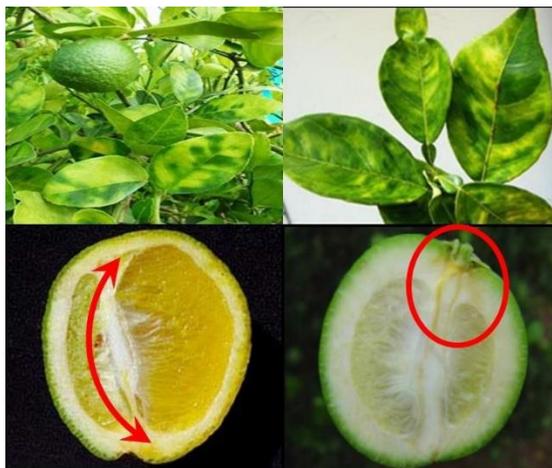
ENFERMEDAD	PATOGENO	SINTOMATOLOGIA
Cancro de los cítricos	Bacteria: <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i>	La infección grave con esta enfermedad puede tener múltiples efectos, incluida la defoliación al marchitarse, la fruta se daña gravemente, la calidad de la fruta se reduce y la fruta cae prematuramente. (26)
Mancha negra de los cítricos	Hongo: <i>Guignardia citricarpa</i>	Los síntomas más comunes de la MNC en frutas son "puntos duros" y la presencia de pseudomelanosa. Las lesiones de puntos duros (de hasta 5 mm de diámetro) tienen un borde Marrón oscuro que rodea un centro de color Marrón claro a gris que contiene picnidios (27)
Sarna de los cítricos	Hongo: <i>Elsinoe fawcettii</i>	Los tejidos de los cítricos infectados con <i>Elsinoe spp.</i> a menudo muestran pústulas de costras con apariencia verrugosa. Este hongo tiene la capacidad de producir muchas fitotoxinas de origen fúngico que contienen perilenquinona y causa la peroxidación de las membranas celulares lo que ocasiona una rápida fuga de electrolitos de los tejidos cítricos.(28)
Melanosa	Hongo: <i>Diaporthe citri</i>	Los síntomas de esta enfermedad aparecen como pequeñas manchas marrones en las hojas y frutos; las cuales están llenas de pegamento Marrón o rojizo y se encuentra sobre la superficie de la hoja. (29)
HLB	Bacteria: <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	Las plantas producen frutos verdes y deformados, que no son aptos para entrar a la venta de frutas frescas o zumos; ocasiona la caída temprana de la fruta. A medida que la enfermedad avanza, los árboles se vuelven más susceptibles a otras enfermedades; una vez la planta se infecta, no se puede curar y muere. (29)

HLB (Huanglongbing)

Los cultivos de cítricos son afectados por una amplia variedad de enfermedades de diversos orígenes, dentro de estas una de las más importantes es una enfermedad de origen bacteriano transmitida por vectores psílidos, que provoca enormes pérdidas económicas en todo el mundo, es conocida como Huanglongbing (HLB) o enfermedad del dragón amarillo; El HLB es considerada a nivel internacional como la enfermedad más destructiva de los cítricos, principalmente porque durante años ha tenido un avance significativo en todas las zonas cítricas del mundo sobre todo en el continente americano, provocando como consecuencia la pérdida de una gran cantidad de cultivos en un muy corto periodo de tiempo. Esta devastadora enfermedad se reportó por primera vez en China, en el año 1919; ya en 1937 se informaron los primeros brotes de la enfermedad en Sudáfrica, para luego extenderse en diferentes países productores y exportadores como Brasil y Estados Unidos (30)(31). Actualmente se reconoce que la enfermedad de Huanglongbing o HLB se encuentra estrechamente relacionada con la infección de la planta por bacterias gram negativas del género *Candidatus Liberibacter spp.*, se sabe que en cítricos son 3 las especies que causan síntomas de HLB en la planta, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* y *Candidatus Liberibacter africanus*; las especies americana y asiática comparten el vector, *Diaphorina citri* Kuwayama, que es conocido más comúnmente como el psílido asiático de los cítricos (ACP) mientras que la especie africana puede transmitirse a través del insecto *Tryoza erytreae*.(32)(33)

Los principales síntomas que caracterizan al HLB, son manchas moteadas con islas verdes en las hojas; los frutos suelen atrofiarse y de manera gradual las ramas se van marchitando, demuestra un poco de adelgazamiento del dosel, presencia de

ramas marchitas y hojas descoloridas; aunque las hojas infectadas pueden ser de un tamaño normal, estas suelen tener una coloración amarilla o moteada, o más pequeñas, erguidas y suelen mostrar diversos patrones de clorosis que son similares a los causados por la deficiencia de zinc u otros nutrientes (34)(35). Cuando la enfermedad avanza, la planta empieza a ser menos productiva, los frutos suelen ser más pequeños y llegan a tener una coloración de aspecto moteado entre verde y amarillo (Fig. 1), el tiempo de vida de los árboles se acorta y se reducen casi completamente las características de rendimiento y calidad de la fruta, afectando características como el contenido total de sólidos solubles, la acidez y el índice de acidez, dando como resultado pérdidas reportadas entre el 30 al 100% (2). La aparición de síntomas en la planta depende principalmente de la etapa en la que se encuentre la enfermedad, durante las primeras etapas es muy difícil hacer un diagnóstico acertado y definitivo; aún no está totalmente claro el tiempo que un árbol puede demorar infectado sin expresar los síntomas. Al comparar plantas sanas con infectadas, en cuanto a la raíz y la planta, se puede decir que los sistemas de raíces no se desarrollaron adecuadamente, por lo que se observan muy pocas raíces fibrosas, debido a la falta de suministro de nutrientes por parte de la planta (36). Es común que los árboles sintomáticos tengan una acumulación excesiva de almidón en la parte aérea (follaje), que se atribuye a la regulación en el sentido del alza del transporte glucosa-fosfato, que se relaciona con el ingreso



excesivo de glucosa en esa área (37); dando como resultado una degradación reducida y un transporte deficiente, lo que finaliza en una división ineficaz de células en hojas de cítricos, las raíces y las hojas jóvenes; lo que como consecuencia provoca que el almidón permanezca indefinidamente en diversas partes de la planta y no se degrade (incluso en los ciclos nocturnos) ocasionando un grave deterioro de salud e incluso puede llegar hasta la muerte del árbol (38)(39)(40).

Figura 1. Sintomatología HLB en frutos y hojas

(Tomado de: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/huanglongbing-de-los-citricos-hlb>)

Historia del HLB

Huanglongbing es una palabra de origen chino, cuyo significado en español es “enfermedad del dragón amarillo” aunque también se conoce a esta enfermedad por el nombre de enverdecimiento de los cítricos(41). Es muy difícil determinar con

certeza el origen del HLB y durante muchos años, el origen del HLB se asoció, al sur de China cuando a finales del siglo XIX diferentes agricultores observaron el amarilleo de los árboles de cítricos en sus cultivos, entonces acuñaron el término “Huanglongbing” (42), sin embargo, hay datos que proponen que el HLB fue el agente causal de la muerte regresiva de cítricos que se presentó en la India en el siglo XVII; inicialmente los investigadores creían que el responsable de la muerte regresiva de los cítricos indios era el virus de la tristeza de los cítricos, pero luego de realizar una exhaustiva investigación, se logró determinar que realmente era el HLB el agente causal de la muerte de los cítricos (43). La variación africana, fue reportada por primera vez en Sudáfrica, en 1937(44), luego se asoció el HLB con la enfermedad del moteado de las hojas de cítricos en Filipinas hacia la década de 1960 (45). En la actualidad, el HLB se ha extendido a más de 50 países de África, Asia, Oceanía y América, donde se incluyen las localidades de América del Sur, América del Norte, América central y el Caribe (Fig. 2) (46). En el continente americano el primer caso de HLB fue reportado en São Paulo, Brasil en 2004 (30); aunque en una encuesta que se aplicó 6 meses después de que se reportara HLB en Brasil, cerca de 46 ciudades reportaron infección en los árboles de cítricos, lo que sugiere que el HLB en Brasil existe desde casi 10 años antes de su reporte (32). En agosto de 2005, los síntomas que presentaban los cultivos de cítricos en Florida EE.UU. empezaron a asociarse con HLB, mas adelante en el año 2017 la problemática se había agravado debido a que esta patología ya se había expandido en todos los condados productores de cítricos y los cultivos de California, Georgia, Louisiana, Carolina del Sur y Texas ya estaban infectados por HLB (47)(48). El insecto vector *Diaphorina citri*, fue reportado por primera vez en Colombia en el año 2008, se asoció a cultivos de cítricos del departamento del Tolima (49), sin embargo al agente causal *Candidatus Liberibacter asiaticus*, se calcula que está presente en el país desde el año 2016 (50); debido a que en este mismo año el departamento del Atlántico, atravesó un emergencia fitosanitaria causada por HLB, que arrasó con aproximadamente el 60% de todas las hectáreas sembradas de cítricos en el departamento. (51)



Fig. 2 Mapa de la distribución global de *Candidatus Liberibacter* spp. 2017 (Tomado de: CABI 2017; EPPO 2017(46,48)

La bacteria causante de HLB, pertenece al género *Candidatus Liberibacter* spp. el cual dispone de tres especies que afectan a los cítricos *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) y *Candidatus Liberibacter*

americanus (Lam) (52). Los nombres de cada especie, la sugerencia de estos se relaciona más que todo con el continente en el que cada una fue reportado la primera vez; a pesar de que sean 3 especies diferentes, los síntomas del HLB son prácticamente los mismos en cualquier lugar en el cual se desarrolle la enfermedad, convirtiéndose en el síntoma más temprano y característico, la aparición de una condición de moteado o manchado en las hojas que resulta en el aspecto de brotes amarillos en el follaje.. La forma de transmisión del HLB es a través de psílicos vectores que de igual forma varían las especies dependiendo la localidad. Las especies de estos psílicos son *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*, se conocen generalmente dos tipos diferentes de HLB una forma sensible al calor que se desarrolla a temperaturas de 22-25°C y una forma tolerante al calor que tiene la capacidad de desarrollarse a temperaturas superiores a 30°C (32). El HLB es una enfermedad que afecta a todas las especies comerciales de los cítricos e incluso a otras especies perteneciente a la familia Rutaceae; esta enfermedad afecta de manera grave a los cultivos de naranja (*Citrus sínthesis*), mandarina (*Citrus reticulata*), algunos cítricos agrios como el Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y el Limón persa o Tahití (*Citrus latifolia*), sin embargo, hay muchas otras variedades de cítricos que pueden manifestar una gran cantidad de síntomas solo que en diferentes niveles de expresión(53).

Vector – *Diaphorina citri*

Las relaciones que pueden darse entre patógenos, plantas e insectos vectores, pueden definirse como la variedad de interacciones entre huésped y hospedero, y está supeditado al beneficio mutuo (54). La coevolución, es la relación simbiótica existente entre patógenos y vectores, les permite a ambos coexistir y obtener beneficios mutuos, conduce a una compensación entre el nivel de virulencia del patógeno y las características del hospedero. Aspectos como una virulencia reducida y la multiplicación por parte del patógeno dentro del vector (hospedero) puede ser el resultado de compensaciones fisiológicas dentro del vector y estas pueden generar alteraciones como consecuencia en los rasgos o en la aptitud del insecto, Generalmente todos los beneficios indirectos de los patógenos pasan a acumularse y de esta forma el hospedador vector puede aprovecharlos; beneficios como la supresión de las defensas de la planta o la mejora del valor nutricional por parte de los hospederos a través de una mayor disponibilidad de aminoácidos libres (55)(54). *Diaphorina citri* Kuwayama, se describió por primera vez en Taiwán y es originario de Asia; se extendió hacia el hemisferio occidental, en Brasil ha estado durante décadas y su alcance se ha expandido hacia el norte de Sudamérica y el Caribe (56), este psílido asiático de cítricos es en la actualidad una de las plagas más importantes de los cítricos, su estatus, no deriva del daño que este ocasiona sino de que es el único vector conocido de la enfermedad HLB.(57)(58).

El patógeno se propaga mediante la adquisición de CLas cuando *Diaphorina citri* se alimenta de la savia infectadas (una vez el vector adquiere la bacteria, la tendrá de una manera persistente a lo largo de todo su ciclo de vida), a lo que le sigue la inoculación a árboles susceptibles. El vector *Diaphorina citri* tiene un amplio rango de plantas hospederas principalmente las pertenecientes a la familia Rutaceae lo que facilita la diseminación de la enfermedad entre especies (59), las bacterias sufren una fase de latencia dentro del vector, que transcurre entre los 3 y 20 días luego de que el vector adquiere a la bacteria, una vez finalizada la esta etapa, la

inoculación a plantas sanas con CLas puede ocurrir luego de 30 minutos de alimentación del vector (60);. La capacidad que tiene *D. citri* de transmitir a *Candidatus Liberibacter asiaticus* se ha investigado a profundidad, pero, aun así la verdadera naturaleza que hay detrás de la interacción entre este patógeno y el vector, sigue siendo en ciertos aspectos poco comprendida. De manera general se puede decir que la infección con CLas tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la población de psílidos, lo que podría favorecer y facilitar la propagación de Huanglongbing (61). La presencia de los vectores es un indicador de que las plantas del cultivo pueden estar infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*; generalmente es mucho más sencillo identificar a los adultos de la especie *Diaphorina citri*. Características como; su tamaño (3-4 mm) y las franjas horizontales presentes en la parte superior e inferior de las alas y su particular forma de alimentarse (en una inclinación de 45° con las ramas u hojas de las que comen) (Tabla 2); las ninfas a diferencia de los insectos adultos, son difíciles de ver, debido a que son planos y tienden a mimetizarse con la planta, su color puede variar entre verde o naranja (62).

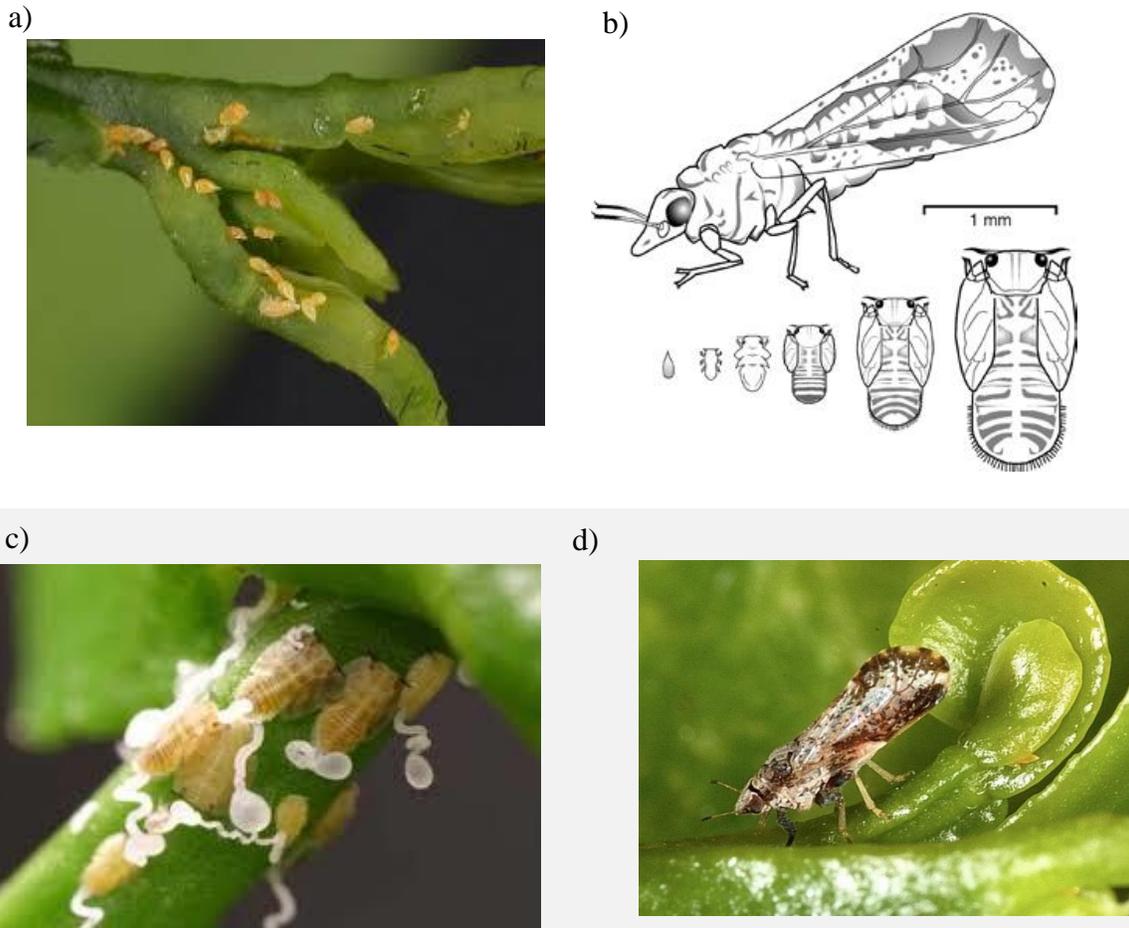


Fig. 3 *Diaphorina citri*. a) huevos y psílidos de ninfas para incubar b) Ciclo de vida *Diaphorina citri* huevo, 5 estadios larvales e insecto adulto c) Tubulos cerosos producidos por ninfas d) Psílido *Diaphorina citri* alimentándose . Tomado de: <https://www.cdfa.ca.gov/plant/acp/docs/anr/8205.pdf>

El ciclo de vida de *Diaphorina citri*, inicia con la ovoposición de la hembra adulta de huevos con forma de almendras de color amarillo anaranjado brillante en las puntas de los brotes en crecimiento o en las grietas de hojas desplegadas, el número de huevos puestos por la hembra adulta dependerá de la planta hospedera, en aproximadamente 4 días los huevos eclosionaran y darán paso al desarrollo de los estadios ninfales (miden entre 0,25 y 1,27 mm de longitud), este insecto atraviesa 5 estadios ninfales, estas son generalmente de color naranja o amarillo y se alimentan exclusivamente de los brotes nuevos (El tiempo total que puede llegar a durar un insecto en los estadios ninfales puede ser de 15 días bajo las condiciones adecuadas (Temperatura de 28°C), y el ultimo estadio se caracteriza porque las alas de la ninfa tienen un tamaño mayor (63). Todos los estadios ninfales son similares, pero aumentan de tamaño después de cada muda, cuando las ninfas se alimentan producen túbulos cerosos que alejan la melaza de su cuerpo y pueden ocasionar una malformación permanente en el sitio de alimentación. Cuando el psílido es adulto el patrón de coloración es muy característicos, este se basa en manchas oscuras hacia el borde de las alas y el centro ligeramente transparente, esta característica junto con el grado de inclinación son de las características más representativas y que facilitan la identificación de este vector en campo (64). su tiempo de vida es de entre 1 y 2 meses, este tiempo se ve influenciado por las condiciones que ofrece la planta hospedera, cuando la hembra se vuelve grávida su abdomen toma una coloración amarillo anaranjada brillante(65).

***Candidatus Liberibacter asiaticus*: Bacteria no cultivable, patógena de plantas**

En los últimos años, algunos síntomas que se desarrollaban en plantas y que al inicio se atribuían a virus, fitoplasmas e incluso a insectos; han sido asociados con un género de bacterias dependiente del floema denominado *Candidatus Liberibacter*, este grupo de bacterias no tiene la capacidad de crecer en los medios de cultivo utilizados actualmente, por lo que al género de la bacteria le antecede el termino formal *Candidatus*, *Liberibacter* procede del latín Liber (corteza) (66). *Candidatus Liberibacter*, es un grupo de bacterias Gram negativas, pertenecientes a la clase Alpha-proteobacteria, del orden Rhizobiales y de la familia Rhizobiaceae, reconocidas parásitos obligados de plantas e insectos (Tabla 2). Actualmente, hay descritas 8 especies de *Candidatus Liberibacter*: *Candidatus Liberibacter Africanus*, *Candidatus Liberibacter americanus* y *Candidatus Liberibacter asiáticos*, causantes del Huanglongbing (HLB) o enfermedad del enverdecimiento en los cítricos; *Candidatus Liberibacter solanacearum*, que afecta a especies de solanáceas y apiáceas; *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, *Candidatus Liberibacter europeus* y *Candidatus Liberibacter brunswickensis*, que están asociadas a cítricos, peral y psílicos de berenjena y algunas solanáceas, respectivamente, aun no se ha demostrado que alguna de estas 3 especies produzcan enfermedad en los cultivos en los que se les ha detectado. La octava especie perteneciente a este género es *Liberibacter crescens*, que está asociada con la papaya de montaña y es la única especie que ha sido cultivada de todo el género, por lo que se utiliza como modelo de estudio en las diferentes investigaciones realizadas sobre el *Liberibacter*, aunque esta especie aún no ha sido identificada como un patógeno de plantas (67). Dentro de las especies causantes de HLB, *Candidatus Liberibacter americanus* es reconocido únicamente como patógeno del naranjo dulce; con relación a las

especies *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *americanus*, se relacionan como patógenas de varias especies del género *Citrus* y sus diferentes híbridos (naranja, limonero, lima, mandarino, ponelo, entre otros), así como rutáceas de otros géneros como *Poncirus* (el cual es ampliamente usado como patrón de los cultivos de cítricos), *Fortunella*, *Murraya*, *Severina*, *Atalantia*, *Limonia* o *Toddalia* (68). *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bloquea los haces vasculares de la planta, ocasionando un déficit en el paso de nutrientes a lo largo de toda la planta y desarrolla como consecuencia brotes amarillos luego de un periodo latente de entre 6 y 18 meses; algunas partes del árbol enfermo pueden permanecer asintomáticas (69).

CLas tiene la capacidad de moverse a lo largo de toda la planta, esta capacidad la adquirió debido a la necesidad que esta tiene de situarse en órganos de alta demanda de nutrientes, conocer la distribución y el movimiento de la bacteria en los árboles infectados es extremadamente importante ya que permite analizar el mecanismo de virulencia, favoreciendo el desarrollo de diversas estrategias efectivas para la detección de la enfermedad y el manejo de la misma (70). Hacia el año 2009 se logró secuenciar el genoma completo *Candidatus Liberibacter asiaticus*; se obtuvo como resultado un genoma de 1,23 Mb con un contenido de GC del 36,5%, los resultados indican que tiene una limitada capacidad aeróbica y es probablemente auxotrófica para cinco aminoácidos (triptófano, tirosina, leucina, isoleucina y valina); este fue el primer genoma de una alpha-proteobacteria no cultivable que es tanto un patógeno intracelular como un simbiote de insectos. ‘*Ca. L. asiaticus*’ carece de sistemas de secreción tipo III y tipo IV, así como también de las enzimas degradativas extracelulares de colonización de plantas o de vida libre típicas(71). Este patógeno intracelular obligado, tiene un genoma relativamente pequeño (1.2 Mb),. *Candidatus Liberibacter asiaticus* puede manipular el metabolismo de su vector *Diaphorina citri* para de esta manera obtener nucleótidos energéticos para su beneficio pero que resulta para el vector en una vida útil más corta y una alteración en el comportamiento de alimentación del vector.(72)

Tabla 2 Clasificación taxonómica *Candidatus Liberibacter asiaticus*

BACTERIA	
DOMINIO	
PHYLUM	Proteobacteria
CLASE	Alphaproteobacteria
ORDEN	Rhizobiales
FAMILIA	Rhizobiaceae
GENERO	<i>Candidatus Liberibacter</i>
ESPECIES	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> , <i>americanus</i> , <i>africanussolanacearum</i> , <i>caribbeanus</i> , <i>europaeus</i> , <i>brunswickensis</i> y <i>crescens</i>

Hay diversos componentes que pueden ser importantes para la virulencia de *Candidatus Liberibacter*, en primer lugar están los lipopolisacáridos (codificado por 21 genes), componentes de la membrana externa de las bacterias que contribuye a la aptitud y virulencia bacteriana debido a que mantiene la integridad estructural de la célula además de protegerla contra el estrés ambiental(73), los flagelos son los responsables de la propulsión, y la colonización del huésped a través de la, FlaA, es el componente principal del filamento flagelar en esta bacteria (74,75); para la

supervivencia y desarrollo de la enfermedad es necesaria la capacidad de manipular tanto al hospedador como al vector. CLas debe poseer genes que le permitan la formación de la vía secretora general, que es una de las rutas principales para la traslocación de proteínas bacterianas desde el citoplasma(76). CLas cuenta con un sistema de secreción tipo I, el cual tiene 3 proteínas localizadas en la envoltura celular; TolC (proteína de exportación de la membrana externa), HlyD (proteína de fusión de la membrana, su función es unir las proteínas de la membrana interna y externa) y PrtD (funciona como un transportador ABC) (77); la función y contribución de este sistema y de sus sustratos con relación a la virulencia de CLas aun no es determinada.(78).

Técnicas de diagnóstico

La técnica más utilizada en la actualidad para monitorear la presencia de HLB es la exploración (inspección visual de síntomas) pero, debido a que es un proceso laborioso y que requiere mucho tiempo, además de que el periodo de incubación del HLB es muy extenso, se dificulta en gran manera la detección visual de síntomas, adicionalmente la expresión de síntomas por parte de una planta puede ser influenciada por factores como la edad y la salud del árbol infectado, debido a esto el número de infecciones asintomáticas puede duplicar al número de aquellas infecciones sintomáticas visualmente detectables (79); por esto se requiere identificar y desarrollar soluciones efectivas y viables que le permitan a los cultivadores detectar de una manera temprana la enfermedad, todo esto con el fin de lograr mitigar el impacto que esta enfermedad podría llegar a tener sobre los cultivos (80), entonces para la detección de HLB, también surge la técnica de microscopia electrónica la cual no es muy efectiva pero funciona como método alternativo, existiendo aun la necesidad del desarrollo de una técnica más rápida y efectiva, por lo que los investigadores han buscado técnicas novedosas para el diagnóstico de HLB, entre estas la más resaltada son las técnicas moleculares, diseñadas para la detección sensible de HLB (81).

Debido a la distribución desigual y baja concentración del patógeno en las plantas, se dificulta la detección de manera temprana del HLB, para dar una solución a esta problemática se ha establecido como método oficial para el diagnóstico la técnica molecular de PCR en tiempo real (qPCR) por su sensibilidad alta sensibilidad en comparación con la PCR convencional; este método se basa principalmente en el uso de cebadores que se unen al segmento de ADN específico de especies de *Candidatus Liberibacter* asociadas con HLB, es una técnica que combina la amplificación y detección en un mismo paso, logrando establecer una correlación del producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (82). Entre los factores que dificultan la detección de la bacteria por qPCR se relaciona con la presencia de inhibidores de PCR en los extractos que son tomados como muestras, esto sumado a los elevados costos que se requieren para realizar la prueba, esto quiere decir que cada prueba realizada para la confirmación de la enfermedad representa una inversión grande de dinero y como la mayoría de los casos es simplemente la suposición de que la planta este enferma no es acertado realizar el diagnóstico de la enfermedad si no hay presencia de síntomas. Debido a todas las dificultades que pueden presentarse, al momento de diagnosticar la enfermedad se evidencia la necesidad de una mejora que se dirija a la

sensibilidad de los resultados obtenidos, a través de una determinación de las condiciones adecuadas que requiera este método para determinar aquellos casos realmente positivos de la enfermedad(83). Los primers más utilizados para desarrollar la PCR para detectar *Candidatus Liberibacter asiaticus* son dos, un par va dirigido al ADNr 16S de CLas, Las606f (GGAGAGGTGAGTGGAATTCCGA) y LSSr (ACCCAACATCTAGGTAAAAACC); y el otro par de primers se diseñó en base a un supuesto gen de la bacteria (m94329), HLB65 (5' TCCTGAGAATTACACACAAAC 3' F) y HLB66 (5' TCTAAGTCTATCCTGTAACCC 3' R) HLB-66. Ambos pares de primers han sido utilizados en diversos análisis y estudios para la detección de HLB por método de PCR, además de que a través de análisis bioinformáticos ha logrado demostrarse su alta sensibilidad y especificidad para la detección de CLas. (84) Las muestras tomadas para realizar un diagnóstico en laboratorio ya sea a través de microscopia o técnicas moleculares, pueden tomarse directamente de los insectos vectores, de las hojas, flores o frutos de los árboles infectados; es posible tomar la muestra de diversas partes de la planta porque una vez el patógeno se encuentra dentro del insecto o de la planta, estará permanentemente, aun así lo más recomendable es que en caso tal de que la muestra sea tomada de la planta enferma, se tome de los órganos de mayor demanda (flores, frutos o nervaduras de hojas jóvenes)(70).

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad, es desarrollar metodologías altamente sensibles, específicas, novedosas y de bajo costo para la detección temprana de la enfermedad; diversos estudios comprueban la eficacia de algunas técnicas en cienciometría que además son novedosas para el diagnóstico de HLB en plantas durante un estadio no tan avanzado de la enfermedad para de esta forma facilitar el manejo y control de la misma dentro de los cultivos; dentro de estas podemos encontrar: la espectroscopia de fluorescencia inducida por láser, que es capaz de identificar no solo hojas sintomáticas de HLB en campo, sino también arboles sintomáticos, esta herramienta es realmente útil debido a que puede proporcionar información útil respecto a la concentración y las propiedades fisicoquímicas de algún sustrato biológico; la espectroscopia de ruptura inducida por láser es un método novedoso este es más que todo un método óptico que se basa en la generación de plasma a través de la ablación de láser y de esta forma lograr un análisis espectroscópico de la emisión, debido a que se basa en la toma de huella de registros de plantas sanas y enfermas en función a sus componentes orgánicos e inorgánicos, además de que usa un láser junto con un microscopio para tomar espectros del floema de las plantas(85).

La espectrometría infrarroja transformada junto con una sonda de muestreo de reflexión de muestreo total atenuada, se usa en la detección de enfermedades de plantas debido a su eficacia y se basa en las ondas cortas a ciertas longitudes de onda en donde la respuesta se encuentra influenciadas por el contenido de agua, la celulosa y las concentraciones de lignina así como otros componentes bioquímicos; la espectroscopia de Raman también es una técnica muy usada, debido a que esta no es invasiva y es fácil desarrollarla, esta técnica mide la dispersión de luz inelástica basada en una fuente monocromática lo que proporciona información sobre la composición química del objeto analizado; la técnica de imágenes polarizadas se basa más que todo en el principio de la acumulación de almidón en las hojas de cítricos infectadas, dentro de este método se usa un sensor

desarrollado con el propósito de detección en tiempo real de HLB en condiciones de campo; la espectroscopia del infrarrojo cercano-visible y las imágenes térmicas se usan debido a que estos luego de ser analizados me permiten revelar la diferencia de los valores promedio de reflectancia de árboles sanos y enfermos facilitando de esta forma el diagnóstico en campo de la enfermedad (86).

Conclusiones:

La industria citrícola, debido a las exigencias comerciales de mercado, a nivel nacional e internacional, la demanda por parte de consumidores y clientes de productos inocuos, consistentes, uniformes y con una presentación agradable, se ha visto en la necesidad de evolucionar, haciendo que diversos productores ubicados a lo largo del mundo dirijan todos sus esfuerzos con el único objetivo de lograr el cumplimiento de todas estas exigencias y tendencias; esto ha despertado un gran interés tanto a nivel gubernamental como social, porque todas las producciones de esta industria pueden disponerse de tal manera que se encuentren en línea con la sostenibilidad ambiental, económica y social, favoreciendo de esta forma a la estabilidad de los países productores de cítricos (87). Las enfermedades que afectan la productividad de los cultivos de cítricos representan una amenaza a todo el esquema de trazabilidad establecido y ocasiona una creciente reducción en los ingresos producidos por estos para el desarrollo del país, el HLB es una problemática real que demanda especial atención; como aún son desconocidas las estrategias efectivas para el manejo y control de esta enfermedad, el gobierno debe destinar una inversión mayor en investigaciones con el objetivo de plantear una solución segura, eficaz y replicable para evitar la diseminación y propagación de HLB a lo largo del país.

El HLB obstruye el paso de los productos de la fotosíntesis por la acumulación de sustancias como el almidón en el floema, lo que provoca una pérdida en el vigor y en etapas más avanzada la muerte productiva y fisiológica del árbol, implica un debilitamiento severo de la planta, esta problemática se torna más severa porque ninguna de las medidas adoptadas por los países en la actualidad ha resultado en una solución definitiva para la lucha contra el HLB, y los principales países productores o aquellos con gran participación en la industria citrícola han optado por convivir con la enfermedad, enfrentando una disminución de la productividad, lo que representa pérdidas económicas y además grandes inversiones para el control y manejo de la enfermedad; se han desarrollado 3 estrategias para lograr un manejo efectivo del HLB en los cultivos, la primera estimula el control evitando la propagación de la enfermedad en a través del mecanismo de eliminación de los árboles que presenten la sintomatología específica de HLB o sean casos confirmados de la enfermedad, la segunda se basa en el uso de material certificado para evitar que a través de los materiales contaminados se disemine la enfermedad y la última es el control del insecto vector que puede realizarse a través del uso de dos herramientas, la primera sería el uso de productos químicos y la segunda sería el uso de controladores biológicos (uso de parasitoides, depredadores y entomopatógenos) (88). *Diaphorina citri* es considerada una plaga de gran importancia económica y de categoría cuarentenaria, el método más utilizado para el control de este psílido es a través de la aplicación de productos químicos, pero aun así, trae como consecuencias el desequilibrio ecológico, la resistencia de algunos insectos a insecticidas, la aparición de plagas secundarias e incluso la

disminución de los enemigos naturales (89) de igual forma, el impacto en la salud de las personas y a la toxicidad de estos productos antes y después del uso, por lo que se está buscando el establecer un control biológico efectivo sobre esta plaga. Las principales medidas fitosanitarias para el manejo integrado de HLB están dirigidas a suprimir las poblaciones del insecto vector y la reducción del inoculo(90) y el control eficaz de la propagación de HLB se basa en la detección precisa de la enfermedad en una etapa temprana; en la agricultura se usan herramientas como los sistemas de visión automatizados, que son consideradas como alternativas de alto potencial para conseguir un monitoria permanente de los cultivos en todas las etapas, desde la siembra hasta la cosecha; de igual forma, hay otras alternativas novedosas para la detección de árboles que se encuentren infectados; A pesar de esto la detección de la enfermedad en una fase temprana basada en la inspección visual de síntomas, es muy complicado debido a que las plantas pueden tardar 6 o más meses en mostrar una sintomatología específica que pueda asociarse con el HLB (91), sin embargo, la detección de plantas sintomáticas presentes en los huertos de cítricos así como también su erradicación es vital para el manejo del HLB; las inspecciones visuales principalmente son realizadas por personal capacitado y se realiza en aquellas zonas en las que se tenga la sospecha de una infección sistémica (92), si no se tienen en cuenta los aspectos mas importantes por parte de los productores como consecuencia estará la mayor incidencia de la enfermedad e incluso puede llegar a darse la pérdida total del negocio cítrícola, por lo que es necesario tener en cuenta, que como tal para el éxito del manejo de HLB, la eliminación de plantas sintomáticas y el control del vector, son primordiales pero también se requiere un trabajo por parte de todos los citricultores donde las medidas sean ejercidas de una manera integrada, que permita ampliar el espectro de manejo y control. “El objetivo ‘realista’ del Manejo del psílido no es la total erradicación del HLB... Pero, mantener a la población del psílido, en los lugares donde la enfermedad está presente, a niveles bajos para reducir la tasa de diseminación de la enfermedad” M. Rogers (93).

La detección confiable y constante de la bacteria se complica por la presencia de diversos factores, que finalmente se relacionan con la baja concentración y distribución del patógeno en las plantas e insectos vectores (94) e han desarrollado diferentes técnicas de investigación en el ámbito de la biología molecular, en su mayoría basados principalmente en la detección de la enfermedad usando el método de PCR, porque a partir de esta se pueden realizar otras investigaciones que permitan tener resultados más confiables en un menor tiempo. Adicionalmente también se pueden utilizar las técnicas espectrométricas, que representan una alternativa económica, sin embargo, la aplicación de estas debe considerarse debido a que existen diversas patologías que pueden ocasionar en la planta un moteado similar al que es producido por HLB, lo cual pone en duda la confiabilidad de estos métodos y dificulta en gran manera el uso de los mismos, debido a la necesidad de la definición precisa y exacta de los cambios bioquímicos (absorbancia, transmitancia y reflectancia) en las plantas que presenten alguna enfermedad con sintomatología similar, aquellas que presenten alguna deficiencia de nutrientes o con estrés hídrico y contrastarlo con los resultado que se obtendrían (según la literatura) en un caso positivo de HLB; lo que complica el uso y manejo de este tipo de metodología. Algunos de estos métodos representan alternativas

innovadoras que tienen niveles de eficiencia muy bueno ya sea respecto a los costos, confiabilidad y el tiempo, para la detección de árboles enfermos o también en el manejo de la enfermedad con respecto a otros métodos que son tradicionalmente utilizados.

Palabras clave:

HLB, enverdecimiento de cítricos, Diagnóstico de HLB, *Diaphorina citri*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e Industria cítrica.

REFERENCIAS

1. Gottwald TR, Graham JH, Irey MS, McCollum TG, Wood BW. Inconsequential effect of nutritional treatments on Huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Prot* [Internet]. 2012;36:73–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.004>
2. Wang N, Trivedi P. Citrus Huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*. 2013;103(7):652–65.
3. da Graça J.V. KL. Citrus Huanglongbing: Review, Present status and Future Strategies. In: *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I* [Internet]. Springer, Dordrecht; 2004. p. 229–45. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-2606-4_4#citeas
4. Gottwald, T. R, da Graça, J. V., and Bassanezi RB. Citrus Huanglongbing : The Pathogen and Its Impact. *Plant Heal Prog*. 2007;
5. Wang Z, Yin Y, Hu H, Yuan Q, Peng G, Xia Y. Development and application of molecular-based diagnosis for “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the causal pathogen of citrus Huanglongbing. *Plant Pathol*. 2006;55(5):630–8.
6. Merfa M V, Pérez-López E, Naranjo E, Jain M, Gabriel DW, De La Fuente L. Progress and obstacles in culturing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology*. 2019;109(7):1092–101.
7. Wang N. A perspective of citrus Huanglongbing in the context of the Mediterranean Basin. *J Plant Pathol*. 2020;102(3):635–40.
8. Salvino RA, Colella MF, De Luca G. NMR-based metabolomics analysis of Calabrian citrus fruit juices and its application to industrial process quality control. *Food Control* [Internet]. 2021;121(January):107619. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107619>
9. ICA. Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos (Citrus) Medidas para la temporada invernal [Internet]. Bogotá, Colombia; 2012. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/18307859-8953-4a7d-8d7f-864e3f4898cf/Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-citricos.aspx>
10. Cardona JH, Rodríguez Saavedra A. La citricultura en el eje cafetero. 1997.
11. Espinal C, Martínez H, Peña Y. La Cadena De Cítricos En Colombia. *Min Agric y Desarro Rural Obs Agrocadenas Colomb* [Internet]. 2005;(54):40. Available from: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112145659_caracterizacion_cacao.pdf
12. Larocca L. Análisis de Mercado. Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay. 1996.

13. Orduz Rodríguez JO. Características de la citricultura en el departamento del Meta y avances en el proceso de desarrollo tecnológico. 1998.
14. ASOHORFRUCOL. Comportamiento del Mercado Nacional e Internacional de Cítricos Frescos. Congr Int Citric [Internet]. 2018;56. Available from: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/CongresoInternacionalCitricola/Comportamiento_Mercado_Nacional_Internacional_citricos_frescos.pdf
15. DANE. Informe de contexto. 2019;83(34):28. Available from: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_may_2019.pdf
16. Iqbal Z, Khan MA, Sharif M, Shah JH, ur Rehman MH, Javed K. An automated detection and classification of citrus plant diseases using image processing techniques: A review. Comput Electron Agric [Internet]. 2018;153(September 2017):12–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.07.032>
17. Naqvi SAMH. Diagnosis and Management of Certain Important Fungal Diseases of Citrus. Dis Fruits Veg Vol I. 2006;l:247–90.
18. Tennant PF, Robinson D, Fisher L, Bennett S-M, Hutton D, Coates-Beckford P, et al. Diseases and Pests of Citrus (Citrus spp.). Tree For Sci Biotechnol. 2009;3:81–107.
19. Hutton DG. Parasitic nematodes associated with various plant especies in Jamaica 1949 - 1981. Meloidogyne. 1982;92.
20. Duncan L, Shapiro DI, Mccoy C, Graham J, Polavarapu S. Entomopathogenic nematodes as a component of citrus root weevil IPM. In 1999.
21. LARRY W. DUNCAN. Managing nematodes in Egyptian citrus orchards. In: Springer D, editor. Integrated Management of Plant Pests and Diseases. 2009. p. 135–73.
22. Pydipati R, Burks TF, Lee WS. Identification of citrus disease using color texture features and discriminant analysis. Comput Electron Agric. 2006;52(1–2):49–59.
23. Gade RM, Lad RS. Biological Management of Major Citrus Diseases in Central India—A Review. Int J Curr Microbiol Appl Sci [Internet]. 2018;6(6):296–308. Available from: <https://www.ijcmas.com/special/6/R.M. Gade and R.S. Lad.pdf>
24. Abraham AO. Biological Control of Phytophthora Root Rot of citrus seedlings and cuttings. 2005.
25. Das AK. Citrus canker - a review. J Appl Hortic. 2003;05(01):52–60.
26. Spósito MB, Amorim L, Bassanezi RB, Filho AB, Hau B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. Plant Pathol. 2008;57(1):103–8.
27. Chung KR. *Elsinoë fawcettii* and *Elsinoë australis*: The fungal pathogens causing citrus scab. Mol Plant Pathol. 2011;12(2):123–35.
28. Hodges AW, Spreen TH. Economic Impacts of Citrus Greening (HLB) in Florida ,. IFAS Ext. 2012;(January):1–6.
29. Coletta-Filho, D., Targon, N., Takita, A., De Negri, D., Pompeu, J., Machado, A., Amaral, M., Muller W. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. Plant Dis. 2004;88.
30. COSAVE. PLAN REGIONAL DE CONTENCIÓN DEL HUANGLONGBING DE LOS CITRICOS (HLB). p. 1–59.

31. Bove J. Huanglongbing: a Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *J Plant Pathol.* 2006;85(4):265–70.
32. Tanse JA, Vanaclocha P, , Cesar Monzo, Moneen Jones and PAS. Costs and benefits of insecticide and foliar nutrient applications to HLB-infected citrus trees. *Pest Manag Sci.* 2016;0160.
33. Graca JV da. Citrus greening disease. *Annu Rev Phytopathol.* 1991;29(1):109–36.
34. Albrecht U, Fiehn O, Bowman KD. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiol Biochem.* 2016;107:33–44.
35. Batool A, Iftikhar Y, Mughal SM, Khan MM, Jaskani MJ, Abbas M, et al. Citrus greening disease-a major cause of citrus decline in the world-a review. *Hort Sci(Prague).* 2007;34(4):159–66.
36. Martinelli F, Dandekar AM. Genetic mechanisms of the devious intruder *Candidatus Liberibacter* in citrus. *Front Plant Sci.* 2017;8:904.
37. Etxeberria E, Gonzalez P, Achor D, Albrigo G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2009;74(1):76–83.
38. Fan J, Chen C, Brlansky RH, Gmitter FG, Li ZG. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *Plant Pathol.* 2010;59(6):1037–43.
39. Zheng Y, Kumar N, Gonzalez P, Etxeberria E. Strigolactones restore vegetative and reproductive developments in Huanglongbing (HLB) affected, greenhouse-grown citrus trees by modulating carbohydrate distribution. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2018;237:89–95.
40. Halbert SE, Manjunath KL. Asian citrus psyllids (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomol.* 2004;87(3):330–53.
41. da Graça J V. Etiology, History and World situation of citrus Huanglongbing. *2Nd Int Work Citrus Huanglongbing Asian Citrus Psyllid.* 2010;53(May):1689–99.
42. Capoor S áP. Decline of citrus trees in India. *Bull Natl Inst Sci India.* 1963;24:48–64.
43. Van der Merwe AJ. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Farming S Afr.* 1937;12:439–40.
44. Fraser LR. Greening virus, the likely cause of citrus dieback in India. *FAO Plant Prot Bull.* 1966;14:127–30.
45. CABI. Citrus Huanglongbing (Greening) Disease (Citrus Greening) [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16567>
46. Baldwin E, Plotto A, Manthey J, McCollum G, Bai J, Irey M, et al. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. *J Agric Food Chem.* 2010;58(2):1247–62.
47. EPPO. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2017.
48. Ica. Boletín epidemiológico; Vigilancia fitosanitaria sobre Huanglonbing (HLB)

y su vector el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* kuwayama) en Colombia. 2012;1–4.

49. ICA. Dispersión del HLB de los cítricos en Colombia, factores asociados. Agro Llanos. 2019;
50. ICA. RESOLUCION-10508-2EMERGENCIA-HLB-ATLANTICO.pdf [Internet]. 2016. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/7b0cf8e8-c92a-480f-8c8a-af6417107bec/2016R10508.aspx>
51. Schwarz RE, Knorr LC, Prommintara M. Presence of citrus greening and its psylla vector in Thailand. *FAO Plant Prot Bull.* 1973;21:132–8.
52. Santivañez T, Mora G, Díaz G, López J, Vernal P. Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe [Internet]. Fao. 2013. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2017000669>
53. Stout MJ, Thaler JS, Thomma BPHJ. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu Rev Entomol.* 2006;51:663–89.
54. Anderson RM, May RM. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology.* 1982;85(Pt 2):411–26.
55. Halbert SE, Núñez CA. Distribution of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. *Florida Entomol.* 2004;87(3):401–2.
56. Hall DG, Richardson ML, Ammar ED, Halbert SE. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol Exp Appl.* 2013;146(2):207–23.
57. Yang Y, Huang M, C. Beattie GA, Xia Y, Ouyang G, Xiong J. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. *Int J Pest Manag* [Internet]. 2006 Oct 1;52(4):343–52. Available from: <https://doi.org/10.1080/09670870600872994>
58. León M. Insectos y ácaros de los cítricos: compendio ilustrado de especies dañinas y benéficas, con técnicas para el manejo integrado de plagas. 2017;
59. Rogers ME, Brlansky RH, Ebert TA, Serikawa RH, Schumann RA, Stelinski KP. Acquisition of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, and the potential use of insecticides to prevent pathogen transmission. In: *International Research Conference on Huanglongbing* (ed by TR Gottwald & JH Graham). 2008. p. 207.
60. Pelz-Stelinski KS, Killiny N. Better Together: Association with “*Candidatus Liberibacter Asiaticus*” Increases the Reproductive Fitness of Its Insect Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2016;109(3):371–6.
61. Services C. September 2004 ASIAN CITRUS PSYLLIDS (STERNORRHYNCHA : PSYLLIDAE) AND GREENING DISEASE OF CITRUS : A LITERATURE REVIEW Halbert & Manjunath : *Diaphorina citri* and Citrus Greening Disease. *Florida Entomol.* 2004;87(September):330–53.
62. Martínez-Carrillo JL. Ficha Técnica: *Diaphorina citri* Kuwayama Psílido asiático de los cítricos. 2016.
63. Hall DG. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. In: *Proceedings*

- of the International Workshop on Huanglongbing and Asian Citrus Psyllid. Citeseer; 2008. p. 1–11.
64. Elizabeth E. Grafton-Cardwell, Kris E. Godfrey, Michael E. Rogers, Carl C. Childers PAS. Asian Citrus Psyllid. 2019.
 65. Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 1994;44(3):379–86.
 66. Haapalainen M. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Ann Appl Biol.* 2014;165(2):172–98.
 67. PALOMO JL, SIVERIO F, CUBERO y J. *Candidatus Liberibacter*: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. 2017;14–22. Available from: https://www.researchgate.net/publication/323178654_Candidatus_Liberibacter_agentes_causales_de_enfermedades_importantes_en_cultivos_de_interes_en_Espana
 68. Belasque Jr J, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Ayres AJ, Tachibana A, Violante AR, et al. Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *J Plant Pathol.* 2010;285–302.
 69. Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T, et al. In planta distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology.* 2008;98(5):592–9.
 70. Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, et al. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, “*candidatus liberibacter asiaticus*” obtained through metagenomics. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2009;22(8):1011–20.
 71. Thapa SP, De Francesco A, Trinh J, Gurung FB, Pang Z, Vidalakis G, et al. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Mol Plant Pathol.* 2020;21(5):716–31.
 72. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71(1):635–700.
 73. Rossez Y, Wolfson EB, Holmes A, Gally DL, Holden NJ. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004483.
 74. Tambalo DD, Bustard DE, Del Bel KL, Koval SF, Khan MF, Hynes MF. Characterization and functional analysis of seven flagellin genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Characterization of *R. leguminosarum* flagellins. *BMC Microbiol.* 2010;10(1):219.
 75. Segers K, Klaassen H, Economou A, Chaltin P, Anné J. Development of a high-throughput screening assay for the discovery of small-molecule SecA inhibitors. *Anal Biochem.* 2011;413(2):90–6.
 76. Kanonenberg K, Spitz O, Erenburg IN, Beer T, Schmitt L. Type I secretion system—it takes three and a substrate. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(11):fny094.

77. Shree P Thapa, Agustina De Francesco, Jessica Trinh, Fatta B Gurung, Zhiqian Pang, Georgios Vidalakis, Nian Wang, Veronica Ancona, Wenbo Ma GC. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Mol Plant Pathol* [Internet]. 2020;716–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32108417/>
78. Gottwald TR. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annu Rev Phytopathol.* 2010;48:119–39.
79. Wang B, Pan S-Y, Ke R-Y, Wang K, Wei Y-M. An overview of climate change vulnerability: a bibliometric analysis based on Web of Science database. *Nat Hazards.* 2014;74(3):1649–66.
80. Valdés RA, Ortiz JCD, Beache MB, Cabello JA, Chávez EC, Pagaza YR, et al. A review of techniques for detecting huanglongbing (Greening) in citrus. *Can J Microbiol.* 2016;62(10):803–11.
81. Aguilera P, Ruiz Tachiquín M, Rocha Munive MG, Pineda Olvera B, Chánez Cárdenas ME, Chain P. PCR en tiempo real. *Herramientas Mol Apl en Ecol* [Internet]. 2015;13(3):175–202. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
82. Garza-Saldaña JJ, Varela-Fuentes S, Gómez-Flores W, Garza-Saldaña JJ, Varela-Fuentes S, Gómez-Flores W. Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos. *Biotechnol y Ciencias Agropecu* [Internet]. 2017;11(2):93–104. Available from: http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v11n2/2007-7858-cuat-11-02-00093.pdf%0Ahttp://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582017000100093&script=sci_arttext
83. Fujikawa T, Iwanami T. Sensitive and robust detection of citrus greening (huanglongbing) bacterium “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” by DNA amplification with new 16S rDNA-specific primers. *Mol Cell Probes.* 2012;26(5):194–7.
84. Ponce L, Etxeberria E, Gonzalez P, Ponce A, Flores T. Rapid identification of Huanlongbing-infected citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy of phloem samples. *Appl Opt.* 2018;57(30):8841–4.
85. Orjuela WA, Araque Echeverry WA, Cabrera Pedraza RA. Identificación de tecnologías y métodos para la detección temprana del Huanglongbing (HLB) a través de cienciometría en artículos científicos y patentes. *Cienc Tecnol Agropecu.* 2020;21(2):1–24.
86. Fernando D, Rueda R. Congreso Socolen. 2017;
87. Futurcrop. Prevención del Huanglonbing (HLB) a través del control del ciclo biológico y tratamiento de la *Diaphorina citri*. [Internet]. 2018. Available from: <https://futurcrop.com/es/blog/post/prevencion-del-huanglonbing-hlb-a-traves-del-control-del-ciclo-biologico-y-tratamiento-de-la-diaphorina-citrus>
88. Rodríguez-Plomera M, Cambero-Campos J, Robles-Bermudez A, Carvajal-Cazola C, Estrada-Virgen O. Enemigos naturales asociados a *diaphorina citri* kuwayama (hemiptera: psyllidae) en limón persa (*citrus latifolia tanaka*) en Nayarit, México. *Acta Zoológica Mex.* 2012;28(3):625–9.
89. INTERNACIONAL O, SANIDAD R DE, AGROPECUARIA. Protocolo del

- manejo integrado del Huanglongbing [Internet]. 2016. p. 54. Available from: https://www.oirsa.org/contenido/2018/Sanidad_Vegetal/WEB-DRSV-UCom-HLB/HLB/2. Manejo Integrado del HLB/Protocolos HLB/Manejo Integrado del HLB.pdf
90. Orjuela-Garzón WA, Araque Echeverry WA, Cabrera Pedraza R. Identification of technologies and methods for the early detection of Huanglongbing (HLB) through scientometrics in scientific articles and patents. *Cienc Tecnol Agropecu.* 2020;21(2):1–22.
 91. Pedreira M, Takao P, Beozzo R, Aparecido S, Belasque J, Diaz ME. Situación del Huanglongbing (HBL) en Brasil y manejo de la enfermedad. *NASPA J.* 2005;42(4):1.
 92. Yamamoto PT. Monitoreo y control de *Diaphorina citri* en Brasil [Internet]. 2018. Available from: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/CongresoInternacionalCitricola/Monitoreo_psilido_Diaphorina_citri.pdf
 93. Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO DE LA NAPPO PD 02 Huanglongbing de los cítricos. 2012.