

## ANEXO 2

### FICHA TÉCNICA

#### HUANGLONGBING O GREENING DE LOS CÍTRICOS

(*Candidatus Liberibacter* spp.)



Julio 4 de 2009.

# HUANGLONGBING O GREENING DE LOS CÍTRICOS.

(*Candidatus Liberibacter asiaticus*).

## I. Introducción.

El Organismo Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) implementa acciones para la prevención, control y erradicación de plagas en cultivos en el territorio nacional, las cuales son realizadas por la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria (ONPF), de cada país. Para el caso de plagas cuarentenarias, como la bacteria asociada al Huanglongbing (HLB) de los cítricos *Candidatus Liberibacter asiaticus*, las actividades tienen como objetivo detectar oportunamente brotes en las zonas cítricas y traspato. Para ello, se realiza la búsqueda de síntomas del HLB, así como, toma de muestras de material vegetativo (hoja y fruta) y del vector para su diagnóstico por PCR en los laboratorios autorizados, para que en caso de una detección positiva se implementen las actividades fitosanitarias de control, contención y/o supresión.

La presente Ficha Técnica contiene información descriptiva del HLB y sus vectores, así como, la metodología a seguir en las actividades de prospección y control de la enfermedad y sus vectores. Este documento, es para uso de personal oficial y personal técnico de la ONPF, quienes realizan las actividades descritas, así como para colaboradores de Instituciones u Organizaciones, la mayoría de las cuales son integrantes de la Comisión Nacional de Apoyo Fitosanitario a la Cadena de Cítricos y otras frutas, así como, para el público en general.

## II. Objetivo de la Ficha Técnica.

Conocer los antecedentes, importancia, aspectos técnicos de la bacteria, síntomas y demás información descriptiva del HLB y sus vectores, así como la metodología para una vigilancia fitosanitaria activa y sistemática para supresión y control.

Servir como manual de referencia para la capacitación y las metodologías para la vigilancia fitosanitaria activa y sistemática para la prospección, diagnóstico y control del HLB.

## III. Antecedentes del HLB y su vector.

Esta enfermedad de los cítricos fue detectada por primera vez en Asia (China), a finales del siglo XVIII donde se reportaron severos problemas con una enfermedad descrita como “Muerte Regresiva” de los cítricos (Capoor, 1963). A finales del Siglo XIX, se reportó una enfermedad similar en Assam, India, y en 1912 era considerada serio problema en la provincia de Bombay (Capoor, 1963). La causa de esta enfermedad no era conocida. En 1919, Reinking (1919) describe brevemente un amarillamiento y moteado foliar en el Sur de China. Este autor afirma que los habitantes de esta región de China llamaban a la enfermedad: “**Huanglongbing**”, que él tradujo erróneamente como “Dragón Amarillo”. Posteriormente, Zhao (1981) aclaró que la traducción correcta era “**Retoños Amarillos**” y no “dragón amarillo”. *Liberibacter* significa bacteria en el

floema. El significado correcto de Huanglongbing es Huang (amarillo), Long (retoño) y Bing (enfermedad), lo que se traduce como **“Enfermedad de los Retoños Amarillos”**. Esto ha sido confirmado recientemente por estudios históricos-lingüísticos (Zhao, 2006) hechos en el Distrito de Chaosang, Provincia de Guandong, donde la enfermedad fue observada por primera vez en el Siglo XVIII (Lin, C., 1956, Lin, K. 1963). En 1927, Husain y Nath, describen los síntomas de la enfermedad en cítricos en Punjab y lo atribuyen al ataque masivo de psilidos. En su reporte se menciona las “frutas insípidas” por lo que los expertos no tienen duda que este es el primer reporte del HLB asociado al ataque de psilidos. En la década de 1920, nuevas enfermedades de cítricos, todas con síntomas similares al HLB, fueron reportadas en la mayoría de los países asiáticos.

En 1929, cultivadores de cítricos de Sud-África reportaron esta enfermedad (Oberholtzer, 1965) (Van del Merwe, 1937). En el oeste del país llamaron a la enfermedad “Rama Amarilla” mientras que en el este, la llamaron “Enverdecimiento” **“Greening”** debido al pobre color desarrollado por la fruta. El nombre de “Greening” fue usado para describir esta enfermedad por influencias de los científicos sudafricanos, pero, el significado del término está asociado a la inversión de color. En 1995, en el Congreso de la Organización Internacional de Virólogos de Cítricos realizado en China, se acordó usar el nombre original de **“Huanglongbing”** como el nombre oficial de la enfermedad (Moreno et al, 1996).

Por muchos años, esta enfermedad se consideró causada por deficiencias minerales, toxicidad o exceso de humedad en el suelo y no por un patógeno transmisible, hasta que Lin (1956) demostró su transmisión por injertos en 1956 en China. Poco después en Sud-África se comprobó la transmisión por injerto (Maclean & Oberholtzer, 1965a), así como, por el psilido africano *Trioza erytrae* Del Guercio (Maclean & Oberholtzer, 1965b).

Poco después en la India y Filipinas, se comprobó que la enfermedad era transmitida por otra especie de psilido, el *Diaphorina citri* Kuwayama que era el vector de la enfermedad en Asia. Posteriormente, la enfermedad a través de los años, se diseminó hacia varios países de ambos continentes **En África:** Burundi, Camerún, Islas Comores, Etiopía, Mauricio, Isla Reunión, Kenia, Madagascar, Malawi, Ruanda, Somalia, Suazilandia, Tanzania y Zimbabwe; **En Asia:** Arabia Saudita, Bangladesh, Hong Kong, India, Indonesia, Japón, Malasia, Nepal, Paquistán, Filipinas, Taiwán, Tailandia, Vietnam y Yemen.

Hasta el año 2004, no se había tenido ningún reporte de esta enfermedad en los países de América, sin embargo, en ese año se encontró en Sao Paulo (Brasil), en la región de Araraquara; posteriormente (septiembre de 2005), se confirma su detección en Florida-EE.UU. (<http://www.pestalert.org>) y en 2007 se informa de su presencia en Cuba (Da Graca, 2008) y en el 2008 en Louisiana, Texas y en el 2009 en Carolina del Sur EEUU. Reciente, en República Dominicana se declara a través de la Resolución No. 47-2008 de la Secretaría de Estado de Agricultura del 2 de diciembre de 2008 y <http://www.pestalert.org> y se declara en mayo de 2009 en Belize.

**Figura 1.** En rojo la bacteria en la raza africana, en amarillo en la raza asiática y en verde la americana.

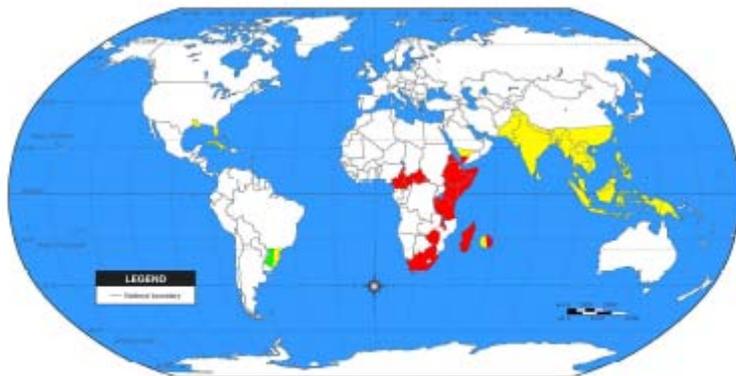


Figura 1. Distribución del HLB (*Candidatus Liberibacter* spp).  
Mapa cortesía (modificado) de John da Graca (2008).

■ L. asiaticus  
■ L. africanus  
■ L. americanus

Con relación al vector, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, se ha detectado en los países del sur de Asia, en la Región de OIRSA y Sudamérica, así como en Florida y Texas, EEUU. En el caso de México, se reportó oficialmente en el Estado de Querétaro en el año 2002 (<http://www.pestalert.org/espanol/pestnews.cfm>).

En la **Figura 2** se muestra la distribución de *Diaphorina citri* (en color amarillo), así como *Trioza erytreae* (en color rojo), éste último también vector de la bacteria, pero presente solo en países del continente africano.

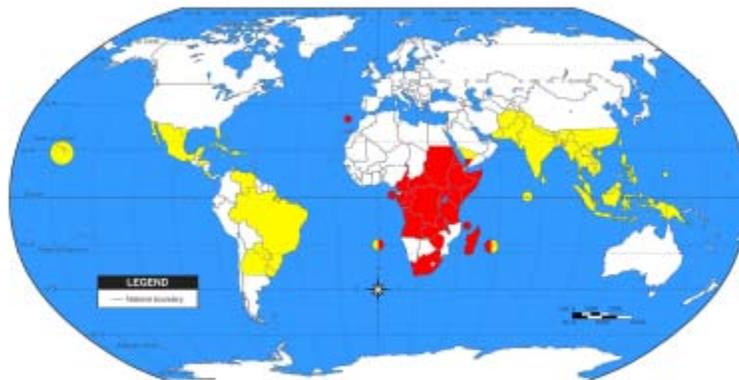


Figura 2. Distribución de los psílidos vectores del Huanglongbing de los cítricos.  
Mapa cortesía de John da Graca (2008).

■ *Diaphorina citri*  
■ *Trioza erytreae*

La Información detallada de los vectores del HLB se presenta en la Ficha Técnica en el Anexo 5.

#### **IV. Importancia económica.**

El HLB se considera una de las enfermedades más destructivas para los cítricos en el mundo. HLB es una enfermedad grave porque no permite el uso de injertos en la búsqueda de resistencia, como si sucede con otras enfermedades como la muerte súbita o la tristeza de los cítricos. A la fecha, el HLB infecta independientemente del injerto que sea utilizado (no hay materiales resistentes). Tampoco existe un control químico disponible, como si ocurre con otras enfermedades (para el Canker, por ejemplo, existe el sulfato de cobre). Los 3 países más grandes productores de cítricos (China, Brasil y EEUU) tienen el HLB.

#### **Una reseña del impacto económico por este patógeno en diferentes partes del mundo señala:**

- En Tailandia el 95 % de los árboles de cítricos fueron afectados en 1981 (Bové, 2009).
- En Sudáfrica ocasiona pérdidas anuales del 30 al 100% de la producción, siendo la enfermedad más importante desde hace algunas décadas, donde afecta todas las especies sin importar el tipo de portainjerto utilizado.
- En la Isla Reunión (África) se perdió la citricultura en 1960 y en Tailandia se han reportado plantaciones abandonadas por los estragos que causa el HLB.
- En Filipinas, la producción de cítricos en el año 1960 fue de 11,700 toneladas, disminuyendo por el ataque de este patógeno hasta las 100 toneladas durante 1970; lo anterior, debido a que afectó a 7 millones de plantas en esa década; los registros muestran que en 1971 causó la muerte de un millón de árboles en una sola provincia de ese país.
- En Indonesia, más de 3 millones de plantas fueron afectadas entre 1960 y 1970.
- En Java y Sumatra, 3 millones de árboles fueron destruidos entre 1960 y 1970, y en Bali se perdieron 3.6 millones de árboles entre 1984 y 1987.
- En Guandong (China), durante el período comprendido entre 1977 y 1981 fueron erradicadas 960,000 plantas de mandarinas y limones por causa del HLB, disminuyendo la producción de la región de 450,000 a 5,000 toneladas.
- Todas las plantaciones de mandarinas y naranja dulce de Arabia Saudita desaparecieron durante la década de 1975 a 1985.
- En Taiwán se reporta que gran parte de la citricultura ha sido destruida por esta enfermedad.
- La industria cítrica de la India está siendo destruida lentamente por esta enfermedad.
- En Brasil 3 millones de árboles de naranja dulce fueron erradicados en 2004.
- En Florida se diseminó por dicho territorio en tres años y se estima la pérdida por HLB y Canker en US \$ 9.3 billones.

#### **V. Bacteria asociada al HLB.**

Las pruebas de PCR para la identificación de la bacteria asociada al HLB se utilizan ahora eficazmente para el diagnóstico tanto en plantas infectadas (sintomática o

asintomáticas) como en los vectores. La bacteria también puede ser detectada con un Microscopio Electrónico, ELISA y técnicas inmunológicas.

Desafortunadamente, muchos árboles infectados pueden escaparse de ser detectados si solo se usan los síntomas. Se estima que entre el 15% y 20% de las plantas infectadas no presentan síntomas que puedan ser detectados por inspectores calificados. Las plantas pueden ser asintomáticas por 2 meses o por 2 años, motivo por el cual es recomendable el diagnóstico por PCR también en plantas asintomáticas. Esta asintomatología dificulta el proceso de control del HLB.

El agente asociado al HLB es una alfa proteobacteria fastidiosa Gram Negativa, de cerca de 2000 nm de largo y 100 a 200 nm de diámetro, la cual, hasta ahora no ha sido posible cultivarla en medios artificiales. Este organismo se restringe al floema de algunos géneros de las Rutáceas (**Figura 3**) aunque tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivares de los psílidos vectores.

La bacteria solo vive en el floema, o sea no es realmente patógena en el sentido que invade y mata las células, sino que obstruye los vasos del floema por su crecimiento, como una "arterioesclerosis" en el humano. Esquivel, comunicación personal. 2009.

Observaciones recientes con el Microscopio Electrónico en Brasil, demuestran que la bacteria varía en su forma desde redonda a ovalada alargada a baciliforme. Estos corpúsculos están rodeados por una doble membrana compuesta cada una de ellas por tres capas, una membrana citoplasmática y una exterior.

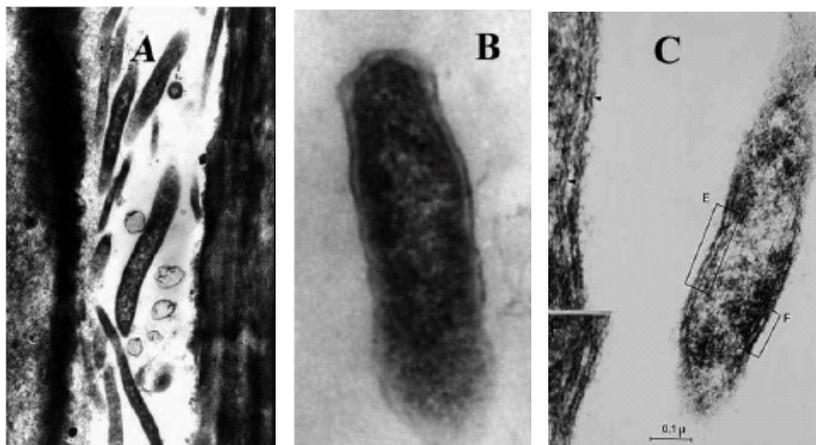


Figura 3. Fotografías de Microscopio Electrónico de la Bacteria Liberobacter (Bové, 2006).

Dentro de estos insectos, la bacteria cruza la pared intestinal hasta llegar a las glándulas salivares, vía hemolinfa, tomándole de 1 a 3 semanas según la virulencia de la variante. Las investigaciones con anticuerpos monoclonales hechas con muestras de China, India y África, demostraron la existencia de varios serotipos o cepas de HLB. Las pruebas moleculares como el PCR y pruebas de tipos específicos de ADN, han sido

usadas exitosamente para detectar y diferenciar *Candidatus Liberacter spp* en plantas e insectos vectores.

También se sabe que, algunas especies de cítricos, como la Naranja Dulce y Mandarinas, producen un compuesto llamado glucósido gentísico, como resultado de la infección. El ácido gentísico brilla bajo luz ultravioleta y puede ser visto directamente en el albedo de las frutas de las naranjas dulces.

Por muchos años se han usado plantas indicadoras para el diagnóstico del HLB. Los mejores indicadores son el Ponkan (*Citrus reticulata*) y el tangelo Orlando (*Citrus tangelo*), sin embargo si están presente formas severas del Virus de la Tristeza (CTV) se puede confundir la expresión de los síntomas.

En la actualidad se reconocen tres razas de este patógeno:

- *Candidatus Liberibacter asiaticus*: Presente en Asia, Brasil, Florida, EEUU y la Región de OIRSA.
- *Candidatus Liberibacter africanus*: Presente en África
- *Candidatus Liberibacter americanus*: Presente en Brasil (en prevalencia muy baja actualmente, según Bové, 2009).

En Brasil 2004/2005, la raza americana **Liberibacter americanus** estaba presente en 95 % de los árboles. Sin embargo, en 2008 la situación se ha invertido y la que prevalece es la raza asiática **Liberibacter asiaticus**. Esta situación puede deberse a que **Liberibacter asiaticus** es tolerante al calor (San Pablo, en Brasil es caliente) Bové, 2009, comunicación personal.

La raza africana es menos agresiva y la temperatura ideal para manifestar síntomas es en climas frescos entre los 22°C y 24°C. En regiones con temperaturas más calientes (27°C a 30°C), los síntomas son menos severos; incluso la ocurrencia de temperaturas calientes por períodos largos puede inactivar completamente la variante africana del patógeno (no tolera 32°C). Por otra parte, los síntomas de infección por la raza asiática se manifiestan bien en altas temperaturas.

Otra diferencia entre ambas razas está relacionada con la altura sobre el nivel del mar a la cual se encuentra el cultivo. En el caso de la raza africana aparece con más frecuencia en zonas localizadas por encima de los 500 msnm, mientras la raza asiática se desarrolla en superficies más bajas y calurosas. La raza americana, recientemente detectada en Brasil se asemeja a la variante asiática del HLB en la expresión y severidad de los síntomas; sin embargo, estudios realizados en Brasil indican que es intolerante al calor como la raza africana (Gottwald, 2007).

Investigaciones muy recientes hechas en Florida, EEUU, a través de microscopía electrónica, PCR y la secuencia de productos de PCR han encontrado que el HLB no es causado por una sola especie de bacteria, sino por dos. El *Liberibacter sp* y una actinobacteria simbiote del género *Propionibacterium*. Al parecer, el *Propionibacterium sp* se encuentra comúnmente en los tejidos cítricos y en la hemolinfa de los psíidos

vectores y es esencial para el desarrollo del *Liberibacter sp* posiblemente por la producción de factores de crecimiento aún desconocidos (Davis et al, 2008).

El término *Candidatus* significa que la bacteria nunca ha sido cultivada en medios de cultivos en laboratorio y ha sido solo caracterizada por técnicas moleculares de ADN (Murray & Scheleifer, 1994). Por otro lado, no ha sido posible probar el postulado de Koch en esta bacteria por lo que se usa el término “**asociada al HLB**” y no es correcto referirse a la bacteria como “agente causal”. Actualmente el *Liberibacter sp* ha podido ser cultivado por investigadores en medios artificiales en co-cultivo con la bacteria *Propionibacterium sp*.

En 2007, árboles con hojas y frutos con síntomas de HLB mostraron que fueron negativos para todas las especies de **Liberibacter** pero fueron positivas a un fitoplasma, el fitoplasma (no tiene membrana celular) se encuentra en el mismo lugar que la bacteria de HLB. Es transmitido a los cítricos por un saltahoja (Cicadellidae) o por *Diaphorina citri* de una planta que no es cítrica. Fue identificado en plantas de leguminosa de cobertura en las plantaciones de los cítricos (*Crotalaria juncea*). En China hay otro fitoplasma asociado a HLB diferente al de Brasil (Bové, 2009. Comunicación personal).

Una nueva especie de *Candidatus* **Liberibacter solanacearum** ha sido asociada con enfermedades de plantas solanáceas como tomate, pimentón y papa en Nueva Zelanda y ha sido asociada con la enfermedad zebra de la papa en EEUU y México. El vector asociado es el psílido *Bactericera cockerelli* y la bacteria ha sido caracterizada como **Liberibacter psyllaureus**. Este psílido ha sido encontrado en EEUU, Canadá, México, Guatemala y Honduras. Los cítricos no son hospedantes de este psílido. El *Liberibacter* de la papa es el primer *Liberibacter* de hospedantes no cítricos. Los estudios muestran que las plantas solanáceas son hospedantes de un *Liberibacter* cítrico y el *Liberibacter* de la papa puede casi probablemente ser transmitido a la naranja dulce y si es así podría ser asociado con el HLB. Una vez en el cítrico, la bacteria podría ser transmitida por *Diaphorina citri* de cítrico a cítrico. Bové, 2009 (Liefting et al 2009- Hong Lin et al, 2009- Gudmestad and Secor, 2007). Recientemente, *Candidatus* **Liberibacter asiaticus** fue transmitido a tomate (Duan et al, 2008). Estos resultados muestran que el *Liberibacter* de los cítricos puede infectar tabaco y tomate. Así el *Liberibacter* de las solanáceas es capaz de infectar cítricos (Bové, 2009).

La enfermedad HLB es también conocida como Blotchy Mottle, Branco Disease, Citrus Greening, Dieback, Enverdecimiento de los Cítricos, Leaf Mottle, Likubin, Vein Phloem Degeneration, Yellow Branch, Yellow Dragon Disease y Yellow Shoot Disease, aunque el nombre oficial es Huanglongbing.

## (黄龙病)

(Huanglongbing en chino).

### VI. Rango de Hospedantes.

Algunos autores afirman que los síntomas se expresan de forma más severa (más susceptibles) en naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y toronjas. Los síntomas son más moderados en mandarinas (*Citrus reticulata*), limones (*Citrus lemon*) y naranja agria (*Citrus aurantium*), mientras que las manifestaciones son pocas o inexistentes en naranja trifoliata con sus híbridos. Casi todas las especies de Citrus y otras especies de la familia Rutaceae pueden ser infectadas por el HLB (alrededor de 50 especies). En el Anexo 3 se detalla la lista de especies susceptibles.

También es conveniente mencionar que aparte de alimentarse de brotes tiernos de los cítricos, el psílido asiático se alimenta de brotes de la Rutácea ornamental conocida como mirto o limonaria o jazmín (*Murraya paniculata*), la cual se considera el hospedero preferido por el psílido, lo que hace difícil su control, ya que es común encontrar esta especie en jardines, avenidas y traspatios de zonas urbanas (Zhou, 2007). En EEUU el HLB pasó de Florida a Louisiana a través del traslado de la *Murraya paniculata*. La especie ornamental *Swinglea glutinosa* (Limoncillo), es muy utilizada en cercas y divisiones de propiedades y Jardines, por su gran cantidad de espinas y está reportada como hospedera del *Diaphorina citri*, por lo que debe ser considerada en las prospecciones.

La Lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) es la especie que en todos los países de OIRSA se le llama erróneamente limón, pero que es lima. Porque el verdadero limón es *Citrus limon* ó limón rugoso. La Lima mexicana y la *Murraya paniculata* (mirto, limonaria o jazmín) son "**plantas amplificadoras**". Este término significa que la lima mexicana y la *Murraya paniculata* son extremadamente atractivas al insecto vector *Diaphorina citri*. Por eso, el insecto *Diaphorina* siempre preferirá la Lima mexicana y la *Murraya paniculata* a otro cítrico o Rutácea. El insecto al comportarse de esa manera en estas plantas "amplifica" el inóculo de la bacteria debido a las altas poblaciones del insecto. Paralelamente, la Lima mexicana es más resistente a la bacteria o sea al HLB o greening, que la naranja. En resumen: la lima mexicana es mucho más susceptible al insecto, pero más resistente a la bacteria ó HLB (greening) que la naranja, lo que significa que eventualmente el Greening afectará más a la naranja que a la lima mexicana y la Región de OIRSA debe prepararse a esa proyección epidemiológica.

Esto explica porqué el HLB se ha detectado en República Dominicana y en Belize, en árboles de lima mexicana, en traspatio y generalmente hacia las costas del Caribe.

### VII. Sintomatología.

#### Generalidades en la sintomatología.

Los síntomas varían con las especies, las variedades y la edad de la planta afectada, ya que estos se observan claramente en árboles jóvenes, mientras que en los afectados después de su desarrollo, los síntomas son menos marcados (INISAV, 1999).

La prospección debe ser dirigida hacia los árboles jóvenes de 6 a 9 años y de menores alturas de 5 a 9 pies porque son los más susceptibles al HLB, según experiencia de Brasil y Florida. Es importante recalcar que éstas experiencias indican que hay mayor prevalencia de síntomas en la parte superior de la copa de los árboles, así como, en los árboles que están al borde de la plantación “efecto de borde”, por lo que se recomienda buscar los síntomas de HLB en los primeros 100 metros hacia adentro de la plantación. Debido principalmente a la característica de asintomatología de esta enfermedad, se recomienda realizar 4 prospecciones por año, cuando se detecta la bacteria porque una sola no es suficiente (por la asintomatología).

Si no se tiene el HLB, las inspecciones pueden ser de 1%, 5% y 10 % dependiendo de la cercanía o lejanía a países o fincas que tengan la enfermedad. Los síntomas pueden presentarse durante todo el año, sin embargo, hay que analizar en cada país en qué periodo del año, se concentran las mayores probabilidades de tener más árboles asintomáticos, para evitar esos periodos e identificar en qué periodos del año se presentan los árboles más sintomáticos (probablemente en invierno), por el efecto de las condiciones climáticas y varietales de cada país o de la Región. Esta información será suministrada por la base de datos que muestre los registros mensuales en cada país, así, si se incrementa la cantidad de muestras es porque la incidencia de la enfermedad es mayor. Esta base de datos será una valiosa herramienta para tomar decisiones precisas y acertadas en el control del HLB.

### Asimetría del síntoma de HLB versus simetría de deficiencias de nutrientes.

Los síntomas del HLB se basan en la asimetría lo cual consiste en que si dividimos visualmente la hoja por la nervadura central, los lados muestran patrones moteados asimétricos. Esta asimetría del HLB contrasta con la marcada simetría que es característica en los síntomas de las deficiencias de nutrientes en las hojas (lado izquierdo muy similar al lado derecho), ejemplo: la deficiencia de Zinc.



**Deficiencia de Zinc. Foto izquierda.**



### Moteado asimétrico y difuso (blotchy mottle): el síntoma más importante. Foto a la derecha.

En la detección del HLB, la presencia del moteado asimétrico y difuso conocido en inglés como “blotchy mottle” es el síntoma más



importante en la prospección de la enfermedad y los recursos humanos y económicos deben ser dirigidos principalmente a la búsqueda de dicho síntoma. El blotchy mottle o moteado son manchas de formas irregulares, verdes-claras o amarillas mezclado con un verde normal, sin una clara división entre sí. Ver los síntomas al final de esta Ficha Técnica 4.



### **Moteado asimétrico difuso: el síntoma más importante.**

Es importante mencionar que al ver el moteado, debe asegurarse que ese moteado no es causado por otra plaga, por ejemplo, mancha gracieta o alimentación de ácaros, para ello, se debe observar el envés de la hoja, de esta forma se asegura que el moteado es por HLB y no está enmascarado por otra plaga. El moteado en el haz debe reflejar que en el envés no hay otra causa (hoja limpia en el envés). Este moteado puede presentarse también en hojas pequeñas o jóvenes.

### **Retoños amarillos.**

Es importante observar el árbol en su contexto general (a distancia), así se podrá apreciar los retoños amarillos de donde deriva el nombre de la enfermedad (enfermedad de los retoños amarillos). Estos retoños amarillos se forman cuando los moteados de las hojas han avanzado hacia la clorosis de las hojas (hojas amarillas). Posteriormente, esas hojas cloróticas caen y finalmente las ramas se secan.



### **Nervaduras Amarillas.**

Probablemente el más prevalente síntoma en algunas épocas del año, sin embargo, no necesariamente el mejor síntoma de diagnóstico (solo para inspectores experimentados), debido a que las venas amarillas también pueden ser causadas por herbicidas, *Phytophthora* o daño físico y hay que ser cuidadosos con este síntoma.



### **Nervaduras amarillas.**

### **Islas verdes.**

Las islas verdes son un síntoma de extrema deficiencia de Zinc. Sin embargo, árboles con HLB mostrarán deficiencias de zinc, por lo cual, el síntoma puede estar asociado con el HLB. El síntoma de las islas verdes es frecuentemente encontrado después del blotchy mottle. La experiencia en Florida indica que cuando se encuentra solamente este síntoma y ninguno de los otros síntomas, no es HLB.



El HLB puede provocar deficiencia de Zinc y por esto expresarse como islas verdes. La deficiencia de Zinc, que es muy común, puede enmascarar los síntomas del HLB, por lo que es muy importante mantener la plantación o los plantones de viveros fertilizados. (Bové, 2009 Comunicación personal).

## Nervaduras corchosas

En algunos casos se observa el engrosamiento de las nervaduras de las hojas, tomando un aspecto corchoso o protuberante.



## Nervaduras corchosas

### Síntomas en hojas versus diagnóstico positivo por PCR

Debido a que los síntomas del HLB en las hojas, varían de país en país, inclusive en la misma especie y variedad de cítrico, se recomienda que cada país caracterice su propia sintomatología basada en fotografías de síntomas de hojas con resultados positivos en PCR.

### Recomendación en la búsqueda de síntomas de HLB.

Se recomienda que se camine la plantación observando minuciosamente y cuando se vean síntomas de deficiencias de nutrientes, venas amarillas, retoños amarillos y moteados difusos o blotchy mottle el inspector se detenga y tome la muestra del blotchy mottle, marque y registre el árbol. Es importante marcar el árbol y georreferenciar la finca porque de ser diagnosticado positivo al HLB por PCR, deberá ser removido lo más pronto posible.

### Síntomas en Frutos.

Durante la infección las floraciones, éstas tienen pobre cuajado de frutos; se presenta la caída prematura y los que se mantienen en el árbol son pequeños y torcidos; también toman la coloración normal solo en la parte expuesta al sol, mientras que la otra parte toma una coloración verde-olivo intenso (Gottwald, 2007).

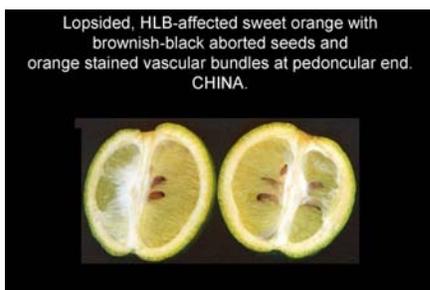
Los síntomas en las frutas, son fácilmente vistas en la naranja dulce y mandarina tangor. En una fruta de naranja normal cuando madura el color amarillo empieza desde el extremo de la fruta hacia el pedúnculo, sin embargo, en una fruta de naranja con HLB la maduración comienza desde el pedúnculo hacia el extremo (inversión de color).

Por otro lado, en la naranja dulce, la zona donde se une el pedúnculo al fruto es verde en una fruta sana y de color anaranjado en una fruta con HLB. Cuando la fruta de naranja dulce está infectada con HLB y está todavía verde la zona de inserción del pedúnculo se muestra de color anaranjado, mientras que en una fruta sana es de color verde pálido. El color anaranjado en este lugar peduncular de la fruta es el resultado de la inversión de color, que se inicia por allí y puede ser vista removiendo el pedúnculo. La invasión de la bacteria en este sector en que se une el pedúnculo con la fruta se proyecta hacia dentro

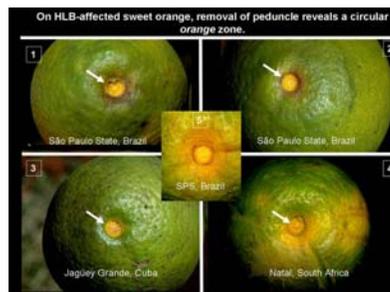


de la fruta como haces vasculares de color naranja (como una reacción del tejido infectado a la bacteria).

Si el pedúnculo está verde en su incisión, la fruta está sana y al alarla no se desprende. La fruta infectada es deforme o torcida y al ser cortado por la mitad se observa un lado del lóbulo bien desarrollado y el otro menos desarrollado, así como, el albelo más grueso (grosor de la cáscara). Ver fotos Bové, 2008.



Fruto torcido (ver lóbulos asimétricos)



Inserción color anaranjado por HLB.

Los frutos poseen una baja cantidad de jugo, además de poca concentración de sólidos solubles y azúcares, por lo que son muy ácidos y no pueden utilizarse en la industria por su sabor amargo-salado desagradable (INISAV, 1999). Las semillas son abortadas, pequeñas, semidesarrolladas y atrofiadas, con una coloración oscura y dispareja, a menudo con manchas.

En resumen, los daños causados por el HLB son los siguientes:

- Disminución del peso de los frutos.
- Disminución del nivel de azúcar (parámetro importante para la industria).
- Aumento del nivel de acidez.
- Disminución del porcentaje de jugo.
- Disminución del tamaño y alteración del color y forma.
- Una planta joven no llega a producir frutos.
- Afecta a todas las variedades independientemente de los patrones.
- La fruta no es apta para consumo, ni para el comercio.

Es importante anotar que el HLB no produce la muerte de los árboles de cítricos, pero en la práctica produce la “muerte económica” del árbol, ya que este deja de producir frutos.

## VIII. Diseminación del Huanglongbing o Greening.

La diseminación de la bacteria se da por injertos y por el insecto vector.

### ▪ Transmisión por Insectos Vectores.

La principal forma de diseminación de este patógeno es a través de dos vectores: *Diaphorina citri* para la cepa bacterial asiática y *Trioza erytreae* para la cepa bacterial africana. Bajo condiciones favorables la diseminación de la enfermedad se da

rápido. Se calcula que el vector se dispersó en la isla de Cuba en menos de 3 años.

El patógeno posiblemente se multiplica en el vector, pero esto no ha sido demostrado hasta ahora.

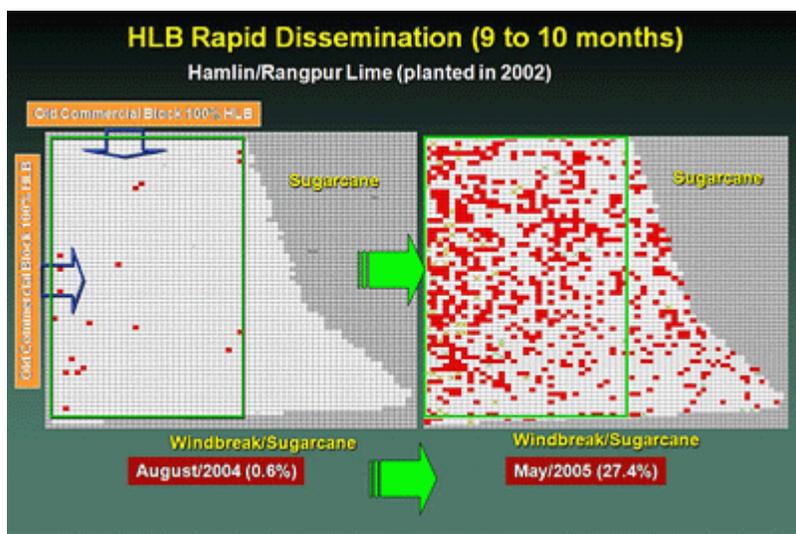


Figura 5. Comparación de detección de casos de HLB con una diferencia de 9 meses en Naranja Hamlim, en Brasil. Los cuadros blancos son árboles sanos, los rojos son infectados con HLB. Fundecitrus. 2009.

*Trioza erytreae* es muy sensible al calor y al clima seco. Lo favorece el frío ( $20^{\circ}\text{C}$ - $24^{\circ}\text{C}$ ) y las condiciones que se presentan por encima de los 500-600 msnm. Los huevos son depositados en la epidermis de las hojas, donde existan las condiciones húmedas necesarias (Figura 4). Las hembras permanecen fértiles de 11 a 16 días en ausencia de machos adultos y su máxima producción de huevos (2,000 por hembra) la alcanza en la mitad de su ciclo vital que es de 17 a 50 días.



Figura 4. Huevos de *Trioza erytreae* sobre hojas de cítricos. [http://www.apto.org/QUARANTINE/bacteria/Uberbaatar\\_afrikanum/LIBESP\\_imags.htm](http://www.apto.org/QUARANTINE/bacteria/Uberbaatar_afrikanum/LIBESP_imags.htm)

*Diaphorina citri* (**Figura 5**) tiene un corto período de vida y una alta fecundidad. Las hembras tienen un período de oviposición de 12 días y son capaces de depositar varios huevos por oviposición, los cuales eclosionan a los 3 días en verano y hasta los 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15 a 47 días, pudiendo presentar hasta 10 generaciones por año. El adulto puede hibernar hasta por más de seis meses. Las hembras pueden ovipositar más de 800 huevos en el transcurso de su vida.



Adulto de *Diaphorina citri* alimentándose (posición en ángulo de 45°)

Un comportamiento típico de este insecto es saltar de las hojas cuando éstas son movidas, al estar sobrepobladas o cuando posean pocas condiciones para su desarrollo, efectuando saltos de 3 a 5 metros, diseminándose la enfermedad dentro de la plantación, a través de la alimentación. El insecto vector vuela de 25 a 50 metros entre plantas (Infección secundaria / fuente de inóculo local) y coloniza nuevas plantaciones hasta 3.5 kilómetros (Infección primaria / fuente de inóculo externo).

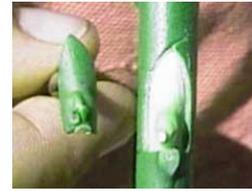
Ambos psílidos pueden adquirir el patógeno después de un corto período dealimentación, 15 a 30 minutos (100% de seguridad a la hora o más) y permanecen infectivos durante toda su vida (3 a 4 meses). No se ha probado la transmisión transovárica.

- **Transmisión por Injerto.**

Otra forma importante de diseminar el patógeno a grandes distancias es mediante el traslado de yemas y plantas infectadas, razón por la cual los países afectados han implementado programas de certificación de viveros, mediante los cuales garantizan que las plantas que llevan a campo van libres de éste y otros patógenos.

El Huanglongbing es una enfermedad transmitida por injerto lo que identifica la importancia del programa de certificación de viveros citrícolas, como programa necesario para eliminar las enfermedades citrícolas transmitidas por injertos en general y ésta en particular. A pesar de ello, no es 100 % seguro, por lo que es ideal hacer tratamientos como por ejemplo el microinjerto y la termoterapia. El principio se basa en que estas microyemas tienen un tejido meristemático que crece a una velocidad tan vertiginosa, que “escapa” al patógeno. Técnicas de indexado biológico y análisis de laboratorio son recomendados como programas complementarios de bioseguridad en el cuidado del Germoplasma.

La transmisión del HLB por injerto depende de varios factores, como por ejemplo, la parte de la planta usada para el injerto, cantidad de tejido usado y el tipo de patógeno. En África, con una sola yema, la transmisión del HLB varía de 0 a 50%. Los injertos laterales con ramas fueron los más eficientes en transmitir el patógeno, mientras que ramas frutales y yemas de tallos no fueron efectivas.



- **Transmisión por Semilla.**

Hay muy poca información sobre la transmisión del HLB por la semilla. La transmisión de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por la semilla ha sido reportado por Zhou et al, 2008 en una frecuencia por PCR de ~ 2% en frutos de cítricos, pero, la progenie de esas semillas no produjeron síntomas de moteados. La transmisión del HLB por semilla no ha sido demostrada. Bové, 2009, INRA-Francia. Puede que se transmita la bacteria pero no la enfermedad. Al principio los análisis pueden salir positivos por PCR, pero meses después salen negativos por PCR. Michael Irely, 2009. Southern Garden, Florida.

Para los países de la Región del OIRSA, más importante que saber si HLB se transmite o no por semilla, es proteger urgentemente las plantas madres con mallas antiáfidos, que permitan obtener de ellas “yemas sanas”, antes que sea demasiado tarde.

Algunos investigadores han observado que las semillas de forma y tamaño normal de frutas de árboles con HLB, producen árboles sanos, mientras que las semillas deformes o pequeñas, producen plantones raquíuticos y cloróticos. Asimismo, dado que muchas frutas se pierden y en las que no, la mayoría de las semillas son pequeñas, semi-desarrolladas y atrofiadas raramente se utilizarán para reproducir y como consecuencia, es mínima la probabilidad de diseminar el patógeno de esta forma. Es un hecho histológico que el sistema vascular de las semillas no está conectado con el sistema vascular de la planta madre, teóricamente sería imposible que la bacteria pasara vía intracelular al embrión 1) Si el árbol está afectado por HLB en una forma inicial o asintomática, sus frutos serán normales. Estos son destinados al consumo, así que no hay peligro en el remoto caso de que alguna semilla sea plantada y 2) Si está afectado con síntomas, o avanzado de HLB, o no produzca frutos normales, o sean deformes, con mal sabor, pequeños, que lógicamente no podrán ser comercializados, así que tampoco serán comercializados. Además, si se siguen las directivas de control del HLB, los árboles con síntomas serán eliminados, así que mal podrían producir frutas para el comercio. Eduardo Esquivel, 2009.

### **Otros métodos de transmisión.**

Se ha comprobado que la HLB, no se transmite mecánicamente (uso de herramientas: tijeras, cuchilla, machete y similares), ni en la ropa.

## IX. CONTROL DEL HLB.

### ▪ Control Químico.

No existe hasta el momento un método de control curativo con productos químicos o antibióticos para la bacteria. Las inyecciones de antibióticos como Tetracilina, además de ser costosas, detienen el crecimiento de la bacteria temporalmente y se han reportado efectos secundarios en la planta.

### ▪ Resistencia Genética.

Se proyecta que la resistencia al HLB puede ser desarrollada en 5 o 10 años.

### ▪ Evolución de la Enfermedad según la edad de la planta.

La severidad del HLB en un árbol está en función de la edad de la planta al momento de la infección. Entre más joven es el árbol en el momento de la infección la severidad es mucho mayor. Los árboles jóvenes tienen mayor cantidad de brotes durante todo el año, lo cual es atractivo para el vector. En este contexto es mucho más difícil el control del HLB si la infección se presenta en árboles nuevos.

### ▪ Estrategia: Prevención del contagio epidemiológico. Tecnología de Brasil (Fundecitrus).

En ausencia de tratamientos curativos para la bacteria, esta estrategia de control se basa en los principios básicos de epidemiología para prevenir el contagio de la bacteria asociada al HLB, ya que es la única manera de enfrentarse al HLB, una vez que la enfermedad ha comenzado a establecerse en una región.

El control es preventivo y está basado en tres medidas: 1) eliminación del inóculo de la bacteria removiendo los árboles sintomáticos (la planta removida no contiene tejido vegetal apropiado ni para la bacteria ni para el insecto), 2) tratamiento con insecticida para mantener al psílido vector en poblaciones tan bajas como sea posible y 3) producción de árboles sanos de cítricos en viveros cubiertos con mallas, para reemplazar los árboles removidos.



Platform with 4 inspectors for examination of large trees

Para poder remover todos los árboles sintomáticos, debe efectuarse una prospección exhaustiva en todas las plantaciones cítricas comerciales, no comerciales y traspatio, en eso se basa la técnica de control. Para una prospección segura, se recomiendan 4 inspecciones por año en cada plantación (una sola inspección por año no es suficiente), debido a que en países con clima tropical se presenta retoños de floración durante todo el año, al igual que el riego estimula la brotación y hay que tomar en cuenta que el

vector prefiere alimentarse de los retoños tiernos, aumentando la infección de la bacteria. Además entre inspecciones, los vectores escapan al control químico.

Se estima que un inspector cubre 400 árboles por jornada. Es importante recalcar que los síntomas se intensifican en el estrato superior del árbol, razón por la cual se hace necesario el uso de plataformas hidráulicas acopladas al tractor. El uso de caballos puede ser una alternativa económica, principalmente en plantaciones con topografías quebaradas y que permite observar también los síntomas en el estrato superior del árbol.

La Estrategia del Control efectivo del HLB se basa en detectar oportunamente la enfermedad (la bacteria) mediante los síntomas en las hojas (moteado asimétrico o blotchy mottle), síntomas en los frutos y la confirmación de muestras sospechosas por PCR. De esta manera, se pueden ubicar las fincas, las áreas y los árboles infectados y se recomienda la eliminación de estos árboles infectados lo más pronto posible. Si se encuentra una sola planta positiva en la finca, la bacteria ya llegó a la plantación y se estima que la finca está contaminada. En este caso, la planta infectada debe ser eliminada, lo más pronto posible (preferiblemente a las 48 horas después de haber sido diagnosticado el árbol como positivo) y deben hacerse aplicaciones de insecticida en toda el área y volver a hacerse una inspección, esta vez del 100% de los árboles. Entre las principales medidas fitosanitarias para el control del HLB es importante la eliminación de los árboles enfermos y la eliminación de las otras plantas Rutáceas hospedantes de *Diaphorina citri* dentro y en los alrededores de las plantaciones. Se estima que la remoción de árboles debe estar alrededor de 2 % por año. Las plantas de mayor edad (10 años o más) van a producir frutos, pero, las plantas deben ser removidas por constituirse en inóculos de la bacteria.

Dependiendo de la población de insectos vectores, se recomiendan 2 aplicaciones mensuales de insecticidas (pueden ser sistémicos en el invierno y de contacto en el verano). Una vez detectada la bacteria, no hay tolerancia para el insecto vector.

Las plantas eliminadas pueden reemplazarse de forma inmediata con plantas sanas si estas son procedentes de viveros certificados cubiertos con mallas antiáfidos. En Florida, los viveros antiguos han permanecido donde estaban, pero los viveros nuevos, deben estar ubicados a una milla de distancia de las plantaciones comerciales de cítricos. La reducción de los viveros en Florida ha sido muy marcada (de 1000 viveros han quedado alrededor de 42 activos).

Con esta estrategia, Brasil ha logrado controlar la prevalencia del HLB a **0.5%** lo cual es muy exitoso para esta enfermedad (Belasque, Información personal, 2009).



3. Closed nurseries for the production of HLB-free trees

Cuando la plantación tiene un 28% de infección, hay que eliminarla totalmente, debido a que se ha probado que epidemiológicamente que por cada planta positiva detectada hay tres más que no se detectaron (una enferma que no se detectó, otra que está infectada pero que no presenta síntomas (asintomática) y otra que será infectada próximamente) (FUNDECITRUS, 2009).

El HLB toma varios años para alcanzar niveles altos de incidencia. El avance de la incidencia del HLB es dependiente de a) las poblaciones del insecto vector, b) la extensión del inóculo y c) la edad del cultivo en la primera infección. En cultivos jóvenes (debajo de 3 años de edad) se ha requerido de 3 a 5 años para que la incidencia alcance niveles sintomáticos, mientras que en cultivos de mayor edad se requieren más de 5 años. Usualmente, las grandes concentraciones de árboles sintomáticos son encontradas en los bordes de las parcelas de cítricos (efecto de borde) Bové, 2009.

Aunque en un principio se pensó que la poda masiva de los árboles afectados podría tener algún efecto curativo o retrasar el desarrollo de la enfermedad, se ha comprobado que esta medida es inefectiva y hasta perjudicial, ya que proporciona fuentes activas de inóculo a los vectores, que dispersarán aún más la enfermedad. En África fue demostrado que la poda no funciona en el control del HLB. En Brasil el 90 % de los árboles podados, desarrolló síntomas en los rebrotes en 2007.

La eliminación de los árboles enfermos debe hacerse sacándolo de raíz o por medio de una tala al nivel del suelo (para que no queden yemas que ocasionen rebrotes). Si la eliminación de los árboles se da por una tala a nivel del suelo, se debe aplicar un herbicida (ejemplo glifosato), en el corte, para evitar rebrotes de yemas. Los árboles eliminados pueden ser reemplazados en forma inmediata, siempre y cuando sus reemplazos provengan de viveros cubiertos por mallas ó viveros certificados.

Es importante resaltar que para eliminar los árboles, primero hay que ubicarlos, por lo que, antes que todo, hay que hacer una prospección detallada del HLB en todo el país. Esto debe ser hecho paralelamente al desarrollo de un programa de capacidad de diagnóstico del HLB, con un laboratorio adecuado para el análisis del PCR o en su defecto acudir a los Laboratorios de Referencias.

Recientemente, en varios países, incluyendo los EEUU, se está probando una técnica de control natural descubierta en Viet-Nam, que consiste en intercalar árboles de guayaba (*Psidium guajaba*) con los de cítricos. La guayaba, al parecer produce una serie de compuestos volátiles que son repelentes a los psílidos vectores y se ha observado que las plantaciones que tienen este sistema permanecen libres de HLB o con muy bajas infecciones. En estos momentos, se está desarrollando la extracción de dichas sustancias volátiles para su aplicación por aspersión.

**Situaciones en que es más fácil o más difícil el control del HLB. Belasque,**

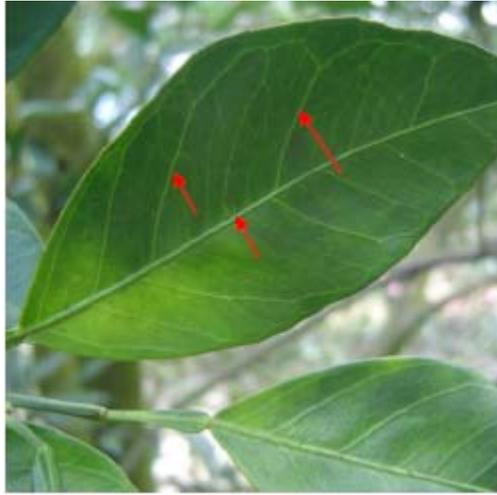
**Fundecitrus, 2009.**

<b>Situación</b>	<b>Más Fácil</b>	<b>Más Difícil</b>
Tamaño de la finca	Grande	Pequeña
Edad de los árboles	Viejos	Nuevos
Localización de la finca	Noroeste	Central
Fincas malas (sin control)	Lejos	Cerca
% árboles HLB (primera inspección)	Menos de 1%	Más de 10 %
Fecha de la 1ra Inspección	Temprana	Tarde
Número de inspectores	12 por año	4 por año
Número tratamientos con insecticidas	24/año	4/año

## FOTOGRAFÍAS DE SÍNTOMAS CLÁSICOS DEL HUANGLONGBING



**Fig.1** Hojas con amarillamiento o moteado en un solo lado.



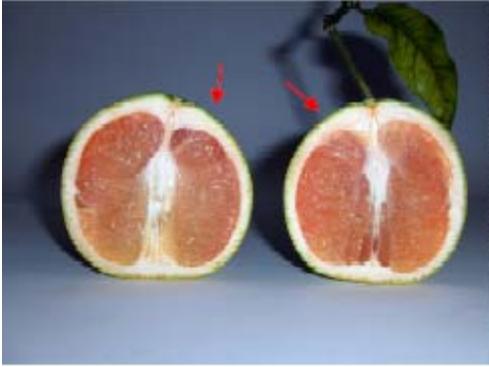
**Fig. 2** Hojas con aclaración de las nervaduras.



**Fig. 3.** Hojas con nervaduras gruesas y corchosas.



**Fig. 4** Brotes amarillos y muerte de ramas.



**Fig.5 .** Frutos deformes



**Fig. 6** Coloración amarilla de la región vascular.



**Fig.7** Inversión de color



**Fig. 8.** Semillas abortadas o atrofiadas

Observe los frutos de la foto a la izquierda. La inversión de color en naranjas dulces. Lo usual es que la maduración se inicie desde el ápice y no desde el pedúnculo. Son frutos infectados con HLB.